

「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術」
平成24年度採択研究代表者

H27 年度
実績報告書

月原 富武

兵庫県立大学 大学院生命理学研究科
特任教授

ミトコンドリア呼吸鎖の構造生命科学－構造がもたらす正確さ

§ 1. 研究実施体制

(1) 兵庫県立大グループ

- ① 研究代表者: 月原 富武 (兵庫県立大学大学院生命理学研究科、特任教授)
- ② 研究項目
 - ・チトクロム酸化酵素(複合体 IV)の水素原子を同定できる X 線結晶構造解析とナノ秒時分割結晶構造解析によって、酸素還元とプロトンポンプ機構を原子の挙動として解明する。
 - ・NADH-ユビキノン還元酵素(複合体I)の2次元及び3次元構造解析
 - ・ミトコンドリア呼吸系構成蛋白質間の相互作用の解析

(2) 理研グループ

- ① 主たる共同研究者: 上野 剛
(独立行政法人理化学研究所放射光科学総合研究センター、専任技師)
- ② 研究項目
 - ・X 線自由電子レーザーを用いて、チトクロム酸化酵素のナノ秒時分割構造解析を行うための技術開発及び回折実験を行う。

§ 2. 研究実施の概要

I. 複合体 IV (チトクロム酸化酵素) の精密構造解析によるプロトンポンプ機構の解明

チトクロム酸化酵素は酸素を水に還元することによってエネルギーを獲得する呼吸酵素である。酸素還元反応の反応サイクルで H-パスと呼ばれる経路を介して4プロトンが能動輸送される。この H-パスは図1で下部は水色、上部は赤色の線で模式的に示している。下部は複数の水を含むことのできる幾つかの空洞などで構成されていて、水チャンネルと呼ぶ。一方上部は水素結合ネットワークと呼ぶ。

水チャンネルはヘム a₃ が還元状態でかつ酸素などリグランドがない R 状態の時のみ開いており N 側からプロトンを通すことができる。反応サイクルで酸素分子がヘム a₃ のところで順次還元される際に、1電子ずつ4回 Cu_A からヘム a を介してヘム a₃ に移動する。それに同期してプロトンが P 側に能動輸送される。その間水チャンネルは閉じた構造のままになっていてプロトンの逆流を止めている。即ち R 状態で4プロトンを蓄積することになる。

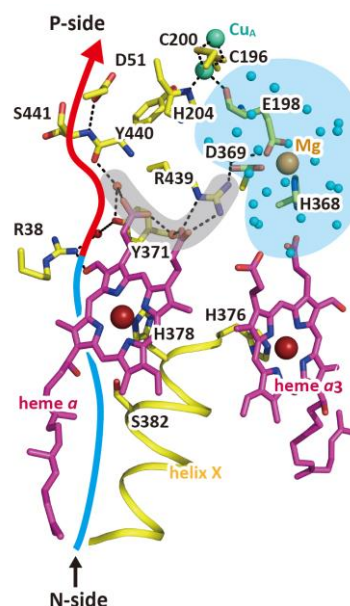


図1

酸化型 1.5 Å、還元型 1.6 Å 分解能の構造解析によって、4プロトンを蓄積できる領域として、Mg とその周辺に20カ所以上の水や親水性アミノ酸残基からなる構造が明らかになった。ここではこの領域を Mg 含有水クラスターと呼び、図1の水色で塗られた部分である。さらに両者の構造を比較することによって水チャンネルの開閉機構を明らかにした。ヘム a₃ へ配位子が結合することによってヘム a₃ がスライドして、そのビニル基がヘリックス X と近接して、その構造変化を誘起し水チャンネルを閉じるのである(現在、論文投稿・審査中)。

II. 複合体 I, III, IV 超複合体の調製

呼吸鎖複合体 I, III, IV はミトコンドリア内膜において互いに集合して機能していると言われている。これらの超複合体を大量に精製する方法を構築することができた。

図2は I, III, IV 超複合体とそれらの混合物の活性をして

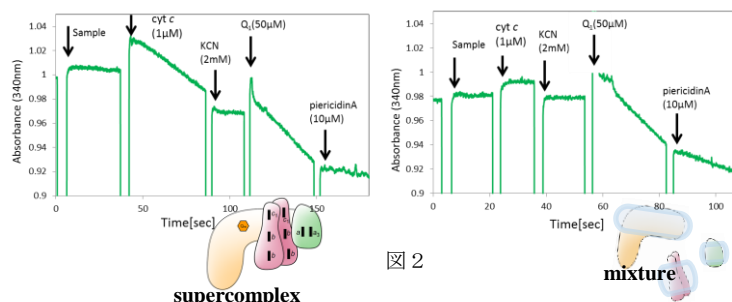


図2

いる。超複体内では I, III, IV が連携して機能していることを示している (Shinzawa-Itoh K, Shimomura H, Yanagisawa S, Shimada S, Takahashi R, Oosaki M, Ogura T, Tsukihara T, “Purification of Active Respiratory Supercomplex from Bovine Heart Mitochondria Enables Functional Studies.”, J Biol Chem. 291, 4178-84, 2016)。