

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)は長大な(分子量100万)膜タンパク質であり電子伝達とプロトンポンプ部位はタンパク質の両端に配置されている。この結晶構造解析により球状である複合体 IV と全く異なる”正確さ・高効率“実現の構造的基盤を解明する。

・ミトコンドリア呼吸系構成タンパク質(チトクロムc、複合体 I, III, IV)間の相互作用がどのように”正確さ・高効率“に寄与しているかをそれらの超複合体結晶の構造解析により解明する。

(2)「理研」グループ

① 主たる共同研究者: 平田 邦生 (独立行政法人理化学研究所播磨研究所・生命系放射光利用システム開発ユニット、技師)

② 研究項目

・自由電子レーザーX 線を用いて、チトクロム酸化酵素ナノ秒時分割結晶構造解析を行うための技術開発及び回折実験を行う。

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

I-1. チトクロム酸化酵素の精密 X 線結晶構造解析

完全酸化型及び酵素反応中間体結晶の非水素原子の精密構造解析

チトクロム酸化酵素(以下 CcO)の酸素還元反応サイクルは次のように要約できる。酸素還元中心(Fea₃と CuB で構成されている)が還元型(R 型)(Fea₃²⁺, CuB¹⁺)のとき、分子状酸素(O₂)を受容し酸素化型(A 型)(Fea₃²⁺-O₂, CuB¹⁺)を形成する。次に分子内 4 電子還元により O-O 結合が切断され P 型(Fea₃⁵⁺=O, CuB²⁺-OH)となる。これにチトクロムc(以下 cyt.c)から 4 電子が 1 電子ずつ順次供与され、F 型(Fea₃⁴⁺=O, CuB²⁺-OH), O 型(Fea₃³⁺-OH, CuB²⁺-OH), E 型(Fea₃³⁺-OH, CuB¹⁺-OH)を経由して R 型(Fea₃²⁺, CuB¹⁺)が再生される。(またこの各 1 電子還元過程に共役して1当量のプロトンがポンプされる。)これらは主に共鳴ラマン分光解析結果から導かれたものであり、各中間体の構造は本質的に未解明である。A 型以外のこれら各反応中間体を結晶中で捕捉することに成功し 1.8Å 分解能での構造決定にほぼ成功した。またプロトンポンプ経路(H-pathway)はプロトン能動輸送が行われる水素結合ネットワークとミトコンドリア内膜内側から水分子がプロトンの水素結合ネットワークに輸送するための水チャネルから構成されている。この水チャネルが R 型のとき以外は閉鎖されていることも明らかにされた。現在論文投稿のための構造精密化の最終段階に到達している。

R 型のとき 4 当量のプロトンがプロトン能動輸送系(水素結合ネットワーク)に蓄積されなくてはならない。完全酸化型および完全還元型の 1.6Å 分解能の非水素原子の X 線構造はポンプ用プロトンの保管が可能な構造と、長年機能が未解明であった Mg²⁺部位が、保管されたプロトンのプロトン能動輸送系への輸送に関与していることを明確に示していた。現在投稿準備中である。

I-2. チトクロム酸化酵素のナノ秒時分割結晶構造解析

SACLA で20フェムト秒X線照射によるX線無損傷構造解析

ウシ心筋 CcO の休止酸化型の酸素還元中心には過酸化(O₂²⁻)が架橋していることが SPring-8 によるX線構造解析から明らかにされている。しかしその O-O 原子間距離は 1.7Å と標準的な過酸化物の原子間距離 1.5Å より明らかに長い。このX線構造解析結果は X 線損傷の可能性を示唆している。そこで多数の同型結晶を用いて十分照射点間隔をとり、SACLA の20フェムト秒パルスX線による多数の静止写真から構造決定を行っている。

時分割赤外分光解析

4 当量のプロトン、R 型が形成されてから O₂ が結合して A 型になるまでの間に蓄積しなければならない。その機構の解明のために O₂ の基質類似体である CO の光解離後の赤外吸収スペクトル変化を時分割赤外分光装置によりナノ秒レベルの時分割計測した。その結果、水チャネルの開閉に中間状態があることを見出した。SACLA によるこの中間状態の結晶構造解析により本酵素の機能の本質に迫る情報が得られることが期待される。

Caged O₂ 及び時分割赤外分光装置の開発

CcO の酸素還元反応過程の時分割解析では以下の 2 方法により O₂ と酵素との反応を開始させる。

(1) O₂ 存在下で CO 結合型酵素から CO を光解離させる。

(2) Caged O₂ 化合物を光解離させ O₂ を瞬間的に発生させる。

方法(2)は Caged O₂ 化合物と酵素との副反応の可能性がある。一方、方法(1)では Caged O₂ 化合物は不必要であるが CO が O₂ と酸素還元中心との反応に影響を与える可能性がある。どちらの方法も新規の装置方法の開発が必要であり、それらの開発には相当の困難が予想される。そこで、本年度よりこれら2方法の開発を並行して推進している。本年度の検討の結果、方法(1)は温度を精密に制御することにより時分割赤外分光解析に利用できることが明らかになった。方法(2)に必要な Caged O₂ 化合物のこれまでに報告されている最も高性能の化合物合成には成功したが CcO の時分割解析には量子収率の改善が必要であることが明らかになった。

II. 複合体Iの2次元及び3次元高分解能結晶構造解析

複合体Iは膜外部分が巨大であり、長年2次元結晶化に取り組んできた。2次元結晶が重なることがよくあり、そのように重なった2次元結晶は重なっていないものより結晶中での分子配列の規則性は明らかに高まることが認められた。そこで重層した2次元結晶の構造解析にも取り組むことにした。

複合体Iの機能解析のため、共鳴ラマン分光法によりFMNの機能、特に活性酸素生成防御機構について解析した。X線構造解析と振動分光解析の相補性を明確に示す例として重要な結果である。

III. ミトコンドリア呼吸系構成蛋白質間の相互作用の解析

チトクロムcとチトクロム酸化酵素複合体の2次元結晶化による電子伝達機構の解析

両者の複合体の2次元結晶化に成功し、結晶化条件の最適化のため種々の条件を検討した結果、チトクロムc結合がチトクロム酸化酵素の膜貫通領域の立体構造変化を誘起し2次元結晶化が可能になることが明らかになった。この膜貫通領域の立体構造変化はチトクロムcとの結合を安定化し電子伝達速度を制御していることを示唆している。

超複合体の調製

本年度はミトコンドリア内膜から複合体 I, III, IV 以外の膜蛋白質を穏和な条件で可溶化し除去する条件について主に検討した。除去すべき膜蛋白質で最も含量の高い複合体Vをほぼ特異的に可溶化する条件が発見されたため純度は相当に高まった。来年度は主にこの方法の検討を行う。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Ryu Nshimura, Tomokazu Shibata, Hulin Tai, Izumi Ishigami, Takashi Ogura, Satoshi Nagao, Takashi Matsuo, Shun Hirota, Kiyohiro Imai, Saburo Neya, Akihiro Suzuki and Yasuhiko Yamamoto, “Relationship between the Electron Density of the Heme Fe Atom and the Vibrational Frequencies of the Fe-bound Carbon Monoxide in Myoglobin”, *Inorganic Chemistry*, 2013, 52, 3349–3355. (DOI: 10.1021/ic3028447)