

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(研究機関別)

- 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(研究機関別)

- 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

ミトコンドリアは細胞のエネルギー生産工場であり、その内膜にある呼吸酵素がその役割を担っている。呼吸酵素として複合体I、複合体II、複合体III、複合体IVがある。そのうち複合体IIを除く3種の酵素は内膜のマトリックス側から膜間腔側にプロトンを能動輸送する。これらの酵素は単独で働くだけでなく、I:III:IVの超複合体を形成して働く場合もある。本研究では複合体IV(チトクロム酸化酵素)、複合体I(NADH-ユビキノン還元酵素)、超複合体を主要な研究対象にして呼吸の原子メカニズムの解明を目指している。

I. 複合体IVの精密結晶構造解析によるプロトンポンプ機構の解明

複合体IVの構造研究では幾つかの研究を同時に進めている。ひとつはプロトンポンプ機構の解明に重要な、水素原子位置の決定である。これまでに完全酸化型結晶の1.3Å分解能回折強度データを独立な2セット収集できた。現在、構造多型の同定と脂質構造の修正に重点を置いて精密化を進め、水素原子位置の決定を目指している。

酵素反応中間体およびそのモデル結晶の精密構造解析によってプロトンポンプを制御している因子の決定を行った。本酵素には活性中心として Cu_A 、 $\text{Heme}_a(\text{Fe}_a)$ 、 $\text{Heme}_{a3}(\text{Fe}_{a3})$ 、 Cu_B があり、酸素を水にまで還元し、それに同期してプロトンを能動輸送する。酸素還元は Heme_{a3} と Cu_B で構成される酸素還元中心で行われる。我々のこれまでの研究では、酸素還元反応サイクルで還元型 (Fe_{a3}^{2+} , Cu_B^{1+}) のときに、能動輸送するプロトンを4当量プロトンプールまでくみ上げ、その後の反応サイクルで電子が Cu_A から $\text{Heme}_a(\text{Fe}_a)$ を介して酸素還元中心に輸送される度に1当量のプロトンがプールから膜間腔にポンプされる。酸素還元中心にある配位子の状態によって Heme_{a3} がその位置をわずかに変化する。この変化がプロトンポンプの第1段階であるプロトンプールへのプロトンのくみ上げを制御していることが明らかになった。またプロトンプールから膜間腔へのプロトンの能動輸送は Cu_A と $\text{Heme}_a(\text{Fe}_a)$ の酸化還元に伴う構造変化によって制御されていることが明らかになった。

反応機構の解明に最も有効なのは高速時分割構造解析である。その第1歩となるX線自由電子レーザーによる無損傷構造解析に成功した。この構造解析で長年懸案であった完全酸化型の酸素還元中心に存在する化学種は過酸化物であると確定した。

II. 複合体Iの構造解析

ネガティブ染色法による電子顕微鏡2次元構造解析は低分解能の像を得るためには有効な方法になり得る。この方法を適用して、結晶の非対称単位中に2種類の構造が存在することを明らかにした。このことは、複合体Iの親水性領域は稼働性が高いことを示唆している(論文1)。

III-1. 超複合体の調製

ショウジョウバエ、ウシ心筋、マウス肝臓のミトコンドリア内膜から可溶化剤としてジギトニンを用いて、複合体I, III, IVからなる超複合体の精製を行った。マウスとウシで超複合体を同定したが、ショウジョウバエには超複合体は存在しなかった。

III-2. チトクロム酸化酵素-チトクロム c 複合体の結晶構造解析

3.5 Å分解能でチトクロム c が特異的に結合していることを確認した。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

論文詳細情報(国内)

該当なし

論文詳細情報(国際)

1. Shimada S, Shinzawa-Itoh K, Amano S, Akira Y, Miyazawa A, Tsukihara T, Tani K, Gerle C, Yoshikawa S. Three-dimensional structure of bovine heart NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) by electron microscopy of a single negatively stained two-dimensional crystal. *Microscopy(Oxf)*. 2014;63(2):167-74.(doi: 10.1093/jmicro/dft082.)