

1 研究の背景と目的

ミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系は、3種類の膜タンパク質超分子複合体 [NADH 脱水素酵素 (複合体 I)、シトクロム *c* 還元酵素 (複合体 III)、シトクロム酸化酵素 (複合体 IV、Cytochrome *c* Oxidase: CcO)] などによって構成され、NADH から酸素分子までの電子伝達と共役したプロトンポンプによりプロトン駆動力 (膜を介したプロトン勾配と膜電位) を形成する。形成されたプロトン駆動力は ATP 合成やイオン輸送、熱産生などの生命活動に必須のエネルギー源として利用される (図 1)。これら超分子複合体の構造に基づいたエネルギー変換機能のメカニズムは長年基礎科学の研究対象とされてきた。CcO の分子構造は、我々が SPring-8 を利用して行った X 線結晶解析により、膜タンパク質構造としては高精度の 1.3 Å 分解能で決定されている [Shinzawa-Itoh *et al.* (2021) *BBA Advances* 1, 100009]。

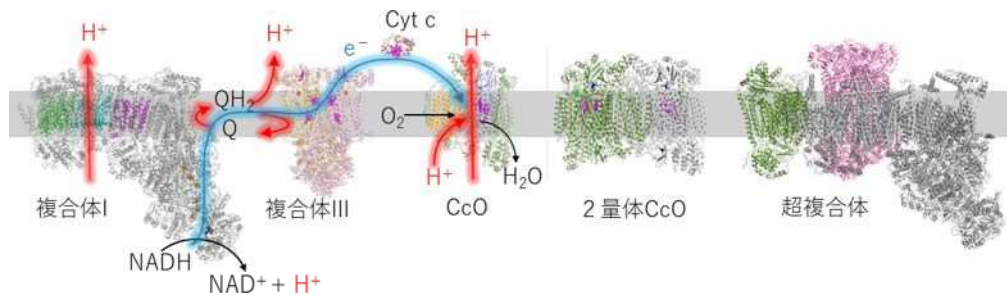


図1 ミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系 各複合体酵素、ユビキノロン (Q)、シトクロム *c* (Cyt *c*) により構成される。図中、プロトン H^+ 、電子を e^- で表す。各タンパク質構造は Protein Data Bank (PDB) に登録の原子座標に基づく。複合体 I (PDB ID: 5LNK)、複合体 III (PDB ID: 1NTM)、Cyt *c* (PDB ID: 5IY5)、CcO (PDB ID: 6JY3)、2 量体 CcO (PDB ID: 7COH)、超複合体 (PDB ID: 5J4Z)

CcO は 13 種類の異なるサブユニットにより構成され、酵素中の活性中心 (電子伝達経路、プロトン輸送経路、酸素還元反応の触媒部位) は 3 種類のサブユニットから成るコア構造中に存在する。これらのコアサブユニットはミトコンドリア DNA にコードされており、細菌が持つ呼吸鎖末端酵素の細胞内共生に由来すると考えられている。細菌酵素の場合、環境条件 (好気、微好気、嫌気等) に応じて、活性中心の酸素親和性が異なる複数のタイプの末端酵素を発現し、環境に適応した反応制御を行っている。それに対し、ミトコンドリア CcO では活性中心を含むコアサブユニットのタイプは 1 つのみである。その代わりに、コアサブユニットの周りを、呼吸酵素が分子進化していく過程で獲得してきた 10 種類の核 DNA にコードされたサブユニット (核由来サブユニット) が取り囲んでいる (図 2)。

核由来サブユニットは CcO の活性の異なる存在形態 (注 1) に関わることが、構造から明らかにされている。また、核サブユニットには CcO の活性制御に関わるタンパク質や薬剤も結合することが示唆されている。さらに、核由来サブユニットの幾つかは組織 (臓器) 特異的なアイソフォーム (一部の特定のアミノ酸が異なるもの) が存在することが分かっている。「なぜ進化の過程で 10 種類もの核由来サブユニットが付加されたのか?」「それらは、細胞環境に応じた CcO による呼吸活性制御にどのように影響を与えているのか?」は基礎研究から医学的研究まで幅広い分野で興味をもたれる課題である。

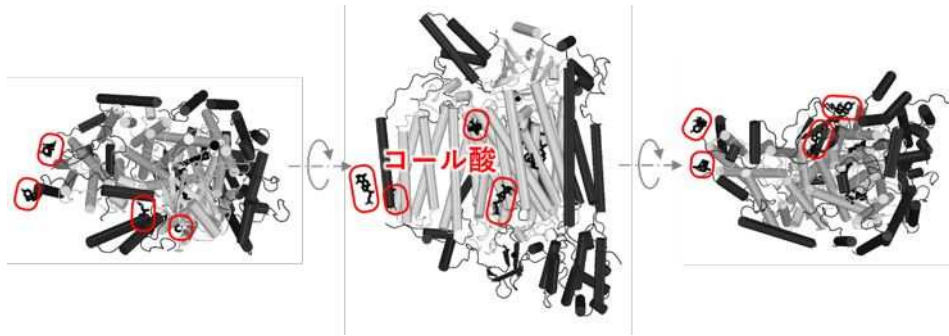


図 2 CcO の核由来サブユニットとコール酸結合部位 コアサブユニットを灰色、核由来サブユニットを黒で表す。コール酸結合部位を赤枠で囲んで表す。

しかしながらこれまでの研究では、CcO を単離精製する過程で使用するコール酸 (注 2) が核由来サブユニットに結合し、活性制御のしくみの全容解明の妨げになっていた (図 2)。本研究では、CcO の活性制御のしくみと核サブユニットの役割を分子構造に基づいて理解することを目的として、新規開発された精製法により得られる CcO を用いた結晶解析の確立に取り組むとともに、従来の結晶を用いた活性制御物質結合構造の高分解能解析に取り組んだ。

(注 1) ミトコンドリア膜中での CcO の存在形態として、単量体、2 量体、超複合体が知られている (図 1)。CcO の機能単位は単量体である。2 量体化により CcO の活性が抑制されることが、近年我々の研究により明らかになった [Shinzawa-Itoh *et al. Proc Natl Acad Sci USA* (2019) 116: 19945–19951]。超複合体は複合体 I と複合体 III と CcO 単量体との会合体である。会合状態をつくることにより、電子伝達の効率化を担うことが示唆されている。

(注 2) ミトコンドリア膜から選択的に CcO を可溶化するためのイオン性界面活性剤。良質な CcO 2 量体結晶を形成させ、これまでの CcO の構造研究を進めるうえで有効であった。しかし、CcO に強く結合し活性を部分阻害するとともに CcO の 2 量体化を引き起こす。

(注 3) 本研究の共同研究者により新規開発された精製法。非イオン性界面活性剤のみを使用し、塩析は用いないこれまでとは原理的に異なる精製手法を用いることで、部分阻害を受けていない CcO を調製することが可能となった。

2 研究方法・研究内容

心臓はエネルギー生産のための呼吸鎖酵素を大量に含む組織である。そこで、ウシ心臓を本学播磨理学キャンパス近隣の食肉卸業者から購入し、心筋ミトコンドリアの内膜に含まれる CcO を可溶化、精製し本研究で使用した。

コール酸フリーCcO の結晶解析 CcO の活性阻害剤であるコール酸が含まれていない CcO 標品を用いて CcO の活性制御のしくみと核サブユニットの役割を解明するため、新規開発されたコール酸フリー精製法 (注 3) により CcO の調製を行った。精製過程で使用する非イオン性界面活性剤や、結晶化において添加する塩の種類や濃度などについて様々な条件検討を行った。得られた結晶を凍結保存し、本学播磨理学キャンパスに近接する大型放射光施設 SPring-8 の BL44XU ビームラインにおいて X 線回折測定を行い、結晶の空間群および格子定数を求めた。

カルシウム結合 CcO の結晶解析 CcO の活性制御のしくみに関わる活性制御物質を明らかにするため、活性抑制効果を示すことがこれまでに報告されているカルシウムイオン (Ca^{2+}) [Vygodina *et al. Biochim Biophys Acta Bioenerg* (2017) 1858: 982–990] の CcO への結合構造の決定を行った。 Ca^{2+} の結合に対してコール酸は影響しないことが予想されたため、従来の精製法で調製された CcO 結晶を用いた。 Ca^{2+} はナトリウムイオン (Na^+) と競合して CcO へ結合することが報告されているため、 Ca^{2+} 存在下 Na^+ 非存在下で CcO 結晶を調製する条件検討を行った。得られた結晶を凍結保存し、SPring-8 の BL44XU ビームラインにおいて X 線回折測定を行い、構造を決定した。

3 研究成果

コール酸フリーCcO の結晶解析 コール酸フリー精製法 (注3) により調製された CcO を結晶化した結果、数種類の結晶化条件において単結晶が得られた。図 3A にそれらのうちの一例を示す。X 線回折測定の結果、最高分解能で 6 Å 程度の回折斑点が観測された。図 3B に回折像の一例を示す。複数の異なる結晶化条件で得られた結晶について、約 8 Å 分解能のデータセットから空間群と格子定数を決定した結果、いずれもほぼ同等の値が得られた。表 1 に値の一例を示す。さらに、従来得られてきたコール酸含有結晶と比較した場合、コール酸フリー結晶は従来とは異なる空間群に属することが分かった (表 1)。この結果は、コール酸フリー結晶中での CcO は、これまでに決定された構造とは異なる様式で会合していることを示している。さらに、CcO の新たな存在形態が明らかになる可能性を示唆している。

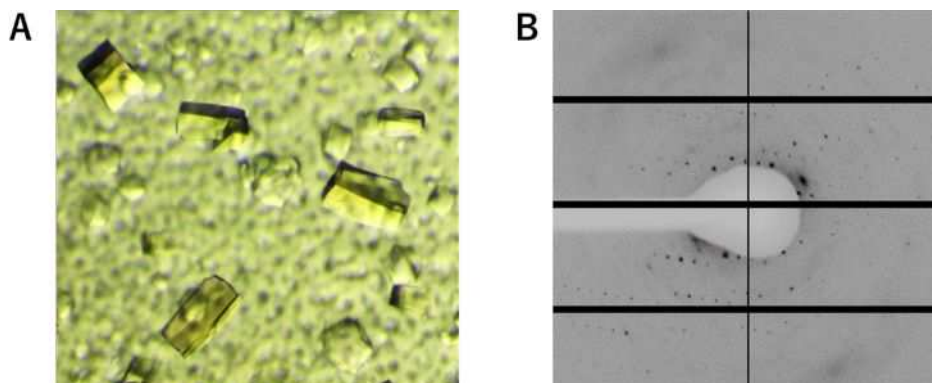


図 3 コール酸フリーCcO 結晶 (パネル A) と X 線回折像の解析 (パネル B)

表 1 CcO 結晶の空間群と格子定数

CcO 結晶	空間群	格子定数
コール酸フリー標品	$I222$ または $I2_12_12_1$	184, 176, 211
コール酸含有標品	$P2_12_12_1$	182, 204, 178

カルシウム結合 CcO の結晶解析 Ca^{2+} 存在下 Na^+ 非存在下での CcO 結晶の調製条件を検討し、X 線回折測定を行った結果、1.7 Å 分解能のデータセットの収集に成功した。構造解析の結果、1 個の Ca^{2+} が CcO 膜貫通領域境界付近の親水性分子表面に結合していることが確認された (図 4A)。 Ca^{2+} と Na^+ は異なる配位様式 (Ca^{2+} : 五方両錐形、 Na^+ : 三方両錐形) で CcO の共通の部位に結合することが明らかになった (図 4B)。 Ca^{2+} 結合構造と Na^+ 結合構造とでは CcO 中の電子伝達経路を構成するヘム分子付近に僅かな構造変化が観測され、この構造変化が CcO の活性に影響することが示唆される (図 4C)。

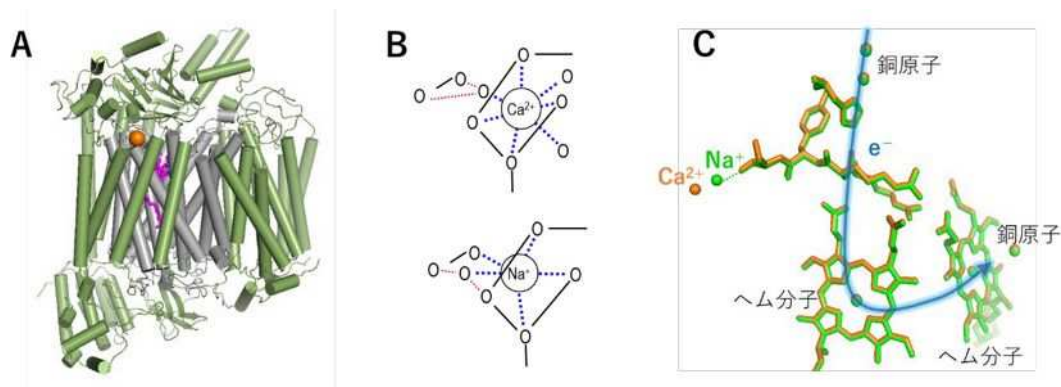


図4 CcOのCa²⁺結合構造とNa⁺結合構造 (A) Ca²⁺をオレンジの球、ヘム分子をマゼンタ、コアサブユニットをのり棒で表す。コアサブユニットを灰色、核由来サブユニットを緑で表す。(B) Ca²⁺とNa⁺の配位構造。アミノ酸および水分子に含まれる酸素原子をOで記す。共有結合を黒の実線、配位結合を青の点線、水素結合を赤の点線で表す。(C) Ca²⁺結合構造(オレンジ)とNa⁺結合構造(緑)の重ね合わせ。Na⁺とアミノ酸との間の配位結合を緑の点線で表す。各構造はPDB登録の原子座標に基づく。Ca²⁺結合構造(PDB ID: 8H8R)、Na⁺結合構造(PDB ID: 6JY3)

本助成を受けた発表論文

Kazumasa Muramoto, Kyoko Shinzawa-Itoh

Calcium-bound structure of bovine cytochrome *c* oxidase.

Biochim Biophys Acta Bioenerg (2023) **1864**, 148956.

<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2023.148956>

4 生活や産業への貢献および波及効果

呼吸鎖の活性制御は、活性酸素の生成抑制やミトコンドリア病、アポトーシスなどとも関連する。CcOの活性制御のしくみと核由来サブユニットの役割の解明は、これらの生理現象や疾病のメカニズムの理解につながるるとともに、核由来サブユニットをターゲットとしたCcOの反応を制御する薬剤の開発につながる。今後、コール酸フリーCcOの高分解能での構造を決定することにより、CcOの活性制御のしくみと核由来サブユニットの役割を分子構造に基づいて理解できることが期待される。