トピックス
新進気鋭
シリーズ

第56回 日本生物物理学会年会 若手招待講演

チトクロム酸化酵素によるプロトンポンプは、
酸素結合によって誘起されるタンパク質内部の
構造変化によって厳密に制御されている

島田敦広 岐阜大学応用生物科学部

1. チトクロム酸化酵素 (CcO) とは

チトクロム酸化酵素 (CcO) は電子伝達系の末端酸化酵素であり、上流のタンパク質複合体から受け取った電子を利用して酸素を水へと還元する反応と共役し、プロトンをマトリクスから膜外へと輸送 (ポンプ) する¹⁾。このプロトンポンプによって形成されるプロトン濃度勾配と膜電位を利用して、 F_0F_1 ATP 合成酵素による高効率 ATP 合成が行われている。つまり、CcO は好気呼吸の中心タンパク質であり、その反応機構解明は生体エネルギー分野における最重要課題であり続けている。ウシ心筋由来 CcO の X 線結晶構造が 1995 年に 2.8 Å 分解能で報告されて以来、CcO によるプロトンポンプ機構の理解は飛躍的に進歩したが、プロトンの逆流防止機構についてはいまだ未解明であった²⁾。

2. CcO のプロトンポンプ経路

プロトンは CcO 内部の H-pathway と呼ばれる水チャネルと水素結合ネットワークから成る経路を通して輸送され、1 反応サイクルあたり 4 等量のプロトンが膜外へとポンプされる (図 1)。高効率なプロトンポンプを可能とするために、CcO は 4 等量のプロトン全てを水チャネル上流に存在する水クラスターに一度に取り込み、チトクロム *c* からの電子伝達によって生じる静電的な相互作用によって 1 等量ずつ膜外へポンプすると考えられている³⁾。近年、H-pathway の水チャネルに存在するキャビティの 1 つが、近傍のヘリックス (helix X) 構造の変化によって消失することが明らかとなり、H-pathway の開閉構造はこの構造変化によって制御されていることが強く示唆されている。

Cu_B と heme a_3 から成る酸素還元中心の Fe_{a_3} (heme a_3 の鉄) ヘリガンドが結合している状態では、キャビティが消失する (閉構造となる) ことがわかっている。 Fe_{a_3} へ結合した酸素は直ちに還元されチトクロム *c* か

図 1

CcO と H-pathway の全体構造 (PDB ID: 5B1A を元に作成)。

ら電子が供給されるため、酸素が Fe_{a_3} へ結合する前に H-pathway は閉じていなければ、チトクロム *c* からの電子伝達に共役してプロトンが水クラスターから逆流する可能性がある。しかし、厳密にいつ H-pathway が閉じているのかは未解明であった。

3. X 線自由電子レーザー (XFEL) による
時分割構造解析

酸素アナログである一酸化炭素 (CO) が結合した CcO へ励起光を照射すると、CO は Fe_{a_3} から Cu_B を経て酸素還元中心外へと移動する。この過程での H-pathway の構造変化を時分割構造解析法によって追跡することで、H-pathway の閉構造から開構造への構造変化機構を解析することが可能である。しかし、CO の解離速度は非常に速く、励起光照射 1 μ sec 後には完全に酸素還元中心から解離し、100 msec 後には Fe_{a_3} へ再結合する。この短時間に起きる構造変化の瞬間を捉えるため、極短パルスかつ高輝度な特徴を持つ X 線自由電子レーザー (XFEL) を使用し、大型の CO 結合型 CcO 結晶を用いて照射位置をずらしながらデータ収集を行う SF-ROX 法を採用した⁴⁾。励起光照射前、CO が Fe_{a_3} から Cu_B へ移動する励起光照射 20 nsec 後および、酸素還元中心から解離した 100 μ sec 後の構造をそれぞれ分解能 2.2, 2.4, 2.2 Å で決定し、酸素還元中心と H-pathway の構造変化を解析した⁵⁾。

Structure Changes Induced by O_2 -binding Tightly Regulate the Proton-pumping of Cytochrome *c* Oxidase

Atsuhiko SHIMADA

Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University

4. CcO によるプロトンポンプ機構

励起光照射前および照射 20 nsec 後では、H-pathway の構造はともに閉構造であった。一方で、励起光照射 100 μ sec 後では、H-pathway は閉構造と開構造がそれぞれ 55% と 45% の占有率で混在していた。このことから、Cu_B へのリガンド結合が H-pathway の開構造から閉構造への構造変化を誘起していることが明らかとなった。また、CO が Cu_B へ結合している際、Cu_B と周囲のヒスチジンの N 原子で形成されている平面 3 配位構造が大きく歪んでおり、CO の Cu_B に対する親和性上昇も確認された。

酸素還元中心の heme a₃ に注目したところ、CO の解離に伴って heme a₃ がわずかに helix X 側から離れる方向へシフトすることがわかった。このシフトによって helix X の周囲に空間的余裕ができ、helix X が構造変化を起こすことで、閉構造時には消失していたキャビティが現れることが確認された。したがって、酸素結合に伴う以下のような構造変化が推察される。まず、酸素の Cu_B への結合が Cu_B と相互作用している heme a₃ の helix X 側へのシフトを誘起する。次に、helix X と heme a₃ との立体障害を解消するために helix X がキャビティを消失するように構造変化し、H-pathway を閉じる (図 2)。

以上の結果から、XFEL 時分割解析によって図 3 に示すような、酸素の結合→heme a₃ のシフト→helix X の構造変化→H-pathway が閉じる、という構造変化のリレーシステムが明らかとなった。本研究で明らかになった H-pathway の構造変化によって、プロトンが逆方向へ流れないようにしていると推察される。

図 2 H-pathway 開閉構造。(a) 励起光照射 100 μ sec 後の構造。(b) heme a および helix X は励起光照射 100 μ sec 後の構造、heme a₃ は励起光照射 20 nsec 後の構造。Heme a₃ のビニル基と helix X の L381 の距離が 3.13 Å と近すぎるため立体障害が生じる。(c) 励起光照射 20 nsec 後の構造。立体障害を解消するために helix X が構造変化を起こし、キャビティが消失する。文献 5 の図を改変。

図 3 構造変化リレーシステムの模式図。酸素が Cu_B へ結合することで (i) heme a₃ がシフトし、(ii) helix X との間で立体障害が生じる。(iii) 立体障害解消のために helix X の構造が変化し、キャビティが消失することで H-pathway が閉じる。文献 5 の図を改変。

5. おわりに

CO を使った時分割解析ではプロトン逆流防止機構の解明という重要な知見が得られたが、今後は、生理学的な基質である酸素を使い、酸素の還元反応と共役したプロトンポンプ機構を解明したい。

謝 辞

本研究は、兵庫県立大学の久保稔教授、伊藤-新澤恭子博士、JASRI の馬場清喜博士らとの共同研究である。この場を借りて深く感謝いたします。

文 献

- Yoshikawa, S., Shimada, A. (2015) Chem. Rev. **115**, 1936-1989. DOI: 10.1021/cr500266a.
- Tsukihara, T. *et al.* (1995) Science **272**, 1136-1144. DOI: 10.1126/science.272.5265.1136.
- Yano, N. *et al.* (2016) J. Biol. Chem. **291**, 23882-23894. DOI: 10.1074/jbc.M115.711770.
- Hirata, K. *et al.* (2014) Nat. Methods **11**, 734-736. DOI: 10.1038/nmeth.2962.
- Shimada, A. *et al.* (2017) Sci. Adv. **3**, e1603042. DOI: 10.1126/sciadv.1603042.

島田敦広

島田敦広 (しまだ あつひろ)

岐阜大学応用生物科学部助教
2013 年大阪大学大学院理学研究科博士後期課程単位取得退学後、同年理学博士 (大阪大学) 取得。
兵庫県立大学特任助教を経て 2017 年より現職。
研究内容: タンパク質の結晶構造解析
連絡先: 〒501-1112 岐阜市柳戸 1-1
E-mail: ashima@gifu-u.ac.jp
URL: <http://www.abios.gifu-u.ac.jp/nakagawa/>