

I ミトコンドリア呼吸鎖複合体IV（チトクロム酸化酵素）の 高分解能構造解析

High resolution X-ray structural analysis of mitochondrial complex IV
(cytochrome *c* oxidase)

島田敦広・伊藤(新澤)恭子・吉川信也・月原富武
Shimada, A., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Tsukihara, T.

チトクロム酸化酵素は1分子の酸素を還元するエネルギーを利用して4等量のプロトンをH-pathwayと呼ばれる経路を介してプロトンポンプする。本酵素は4つの金属酸化還元中心(Cu_A, Fe_a, Cu_B, Fe_{a3})を持っており、プロトンポンプ機構の解明には、これらの金属酸化還元中心の酸化状態および配位子結合状態の異なる様々な状態の構造を高分解能で解析することが必須である。そのため、配位子や活性中心の酸化還元状態の異なる条件の結晶を作製し、高分解能構造を決定すると共に構造の比較を行った。

SACLA のフェムト秒 X 線レーザーを用いた結晶構造解析で放射線損傷のない X 線結晶構造解析が可能であることを証明した。フェムト秒パルス X 線レーザーを用いたポンプ-プローブ法により、これまで捉えることのできなかった寿命の短い反応中間体の構造解明を行い、経時的な構造変化の追跡を開始した。

II チトクロム *c* と複合体IVの複合体の X 線結晶構造解析

X-ray structural analysis of cytochrome *c* and cytochrome *c* oxidase complex

島田悟・伊藤(新澤)恭子・吉川信也・月原富武
Shimada, S., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Tsukihara, T.

電子供与体であるチトクロム *c* と複合体IVの共結晶化に成功し 2.0Å分解能での構造解明を行った。その X 線結晶構造から電子伝達経路、結合様式を明らかにした。他のタンパク質の複合体の構造と比較すると、チトクロム *c* と複合体IVは、間に水を介した新しい様式で相互作用していることが明らか

となった。

III ミトコンドリア呼吸鎖超複合体の構造と機能

Structural and Functional Studies on Respiratory Supercomplex

島田悟・月原富武・伊藤(新澤)恭子
Shimada, S., Tsukihara, T., Shinzawa-Itoh, K.

ミトコンドリア内膜に於いて呼吸鎖の複合体 I,III,IVは超複合体を形成している。各複合体がどのように相互作用し機能しているのかを解明するために、超複合体を安定に単離・精製する方法を確立し、その組成を明らかにした。得られた標品は KCN 感受性の NADH 酸化活性を示した。

IV 複合体 V (F₀F₁-ATP 合成酵素) の構造研究

Structural Studies on complex V (F₀F₁-ATP synthase)

伊藤(新澤)恭子・島田悟・月原富武・Christoph Gerle
Shinzawa-Itoh, K., Shimada, S., Tsukihara, T., Gerle, C.

ウシ心筋ミトコンドリア膜から 17 種類全てのサブユニットを持ち、オリゴマイシンによる阻害を受ける構造の損傷を受けていない酵素を収率よく得る精製法を確立した。チューブ状結晶から、本酵素のダイマー形成が膜に曲率を与えることがわかった。界面活性剤を lauryl maltose-neopentyl glycol (LMNG)に置き換えると電子顕微鏡観察に於いてバックグラウンドを大きく下げることが出来たため、単粒子構造解析が可能な像を得ることが出来、11 Å分解能の立体構造を得ることに成功した。

発表論文 List of Publications

- 1 Shinzawa-Itoh, K., Shimomura, H., Yanagisawa, S., Shimada, S., Takahashi, R., Oosaki, M., Ogura, T. and Tsukihara, T., Purification of active respiratory supercomplex from bovine heart mitochondria enables functional studies. *J Biol Chem.* **291**, 4178-4184. (2016)
- 2 Osuda, Y., Shinzawa-Itoh, K., Tani, K., Maeda, S., Yoshikawa, S., Tsukihara, T. and Gerle, C. Two-dimensional crystallization of monomeric bovine cytochrome *c* oxidase with bound cytochrome *c* in

- reconstituted lipid membranes. *Microscopy*. In press (2016)
- 3 Kim, H. R., Oh S. K., Lee, E. S., Choi, S. Y., Roh, S. E., Kim, S. J., Tsukihara, T., Lee, K. Y., Jeon, C. J. and Kim, U. K. The pathological effects of connexin 26 variants related to hearing loss by in silico and in vitro analysis. *Hum Genet.* **135**, 287-298 (2016)
 - 4 Hauer, F., Gerle, C., Fischer, N., Oshima, A., Shinzawa-Itoh, K., Shimada, S., Yokoyama, K., Fujiyoshi, Y. and Stark, H. GraDeR: Membrane Protein Complex Preparation for Single-Particle Cryo-EM. *Structure.* **23**, 1769-1775 (2015)
 - 5 Yano, N., Muramoto, K., Mochizuki, M., Shinzawa-Itoh, K., Yamashita, E., Yoshikawa, S. and Tsukihara, T. X-ray structure of cyanide-bound bovine heart cytochrome *c* oxidase in the fully oxidized state at 2.0 Å resolution. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* **71**, 726-730 (2015)
 - 6 Jiko, C., Davie, K. M., Shinzawa-Itoh, K., Tani, K., Maeda, S., Mills, D. J., Tsukihara, T., Fujiyoshi, Y., Kühlbrandt, W. and Gerle, C. Bovine F1Fo ATP synthase monomers bend the lipid bilayer in 2D membrane crystals. *Elife.* **4**, e06119 (2015)
 - 7 Hayashi, T., Asano, Y., Shintani, Y., Aoyama, H., Kioka, H., Tsukamoto, O., Hikita, M., Shinzawa-Itoh, K., Takafuji, K., Higo, S., Kato, H., Yamazaki, S., Matsuoka, K., Nakano, A., Asanuma, H., Asakura, M., Minamino, T., Goto, Y., Ogura, T., Kitakaze, M., Komuro, I., Sakata, Y., Tsukihara, T., Yoshikawa, S. and Takashima, S. Higd1a is a positive regulator of cytochrome *c* oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **112**, 1553-1558 (2015)
 - 8 Wallen, J. R., Mallett, T. C., Okuno, T., Parsonage, D., Sakai, H. and Tsukihara, T. Structural Analysis of *Streptococcus pyogenes* NADH Oxidase: Conformational Dynamics Involved in Formation of the C(4a)-Peroxyflavin Intermediate. *Claiborne A. Biochemistry.* **54**, 6815-6829 (2015)
 - 9 Chen, N. C., Yoshimura, M., Guan, H. H., Wang, T. Y., Misumi, Y., Lin, C. C., Chuankhayan, P., Nakagawa, A., Chan, S.I., Tsukihara, T., Chen, T. Y. and Chen, C. J. Crystal Structures of a Piscine Betanodavirus: Mechanisms of Capsid Assembly and Viral Infection. *PLoS Pathog.* **11**, e1005203 (2015)

総説、著書など

- 10 Yoshikawa, S. and Shimada, A. Reaction mechanism of cytochrome *c* oxidase. *Chem Rev.* **115**, 1936-1989 (2015)
- 11 Yoshikawa, S., Shimada, A. and Shinzawa-Itoh, K. Respiratory conservation of energy with dioxygen: cytochrome *c* oxidase. *Met. Ions Life Sci.* **15**, 89-130 (2015)

国際会議

- 12 C. Gerle: “Looking at “bad” 2D crystals can be good. Seminar Talk” LMB, Cambridge, U.K., May 7 (2015)
- 13 C. Gerle: “ In and out of the membrane: EM structure of the mammalian FoF1 ATP synthase ” Cold Spring Harbor Asia conference on Mitochondria, Suzhou, China, October 12-16 (2015)
- 14 C. Gerle: “Membrane protein complex preparation for single particle cryo-EM” Gordon Research Conference,

国内会議

- 15 島田悟・青江新平・伊藤-新澤恭子・島田敦広・馬場淳平・武村秀平・山下栄樹・吉川信也・月原富武:チトクロム *c* とチトクロム酸化酵素共結晶の高分解能 X 線結晶構造に基づく相互作用解明、第 15 回日本蛋白質科学会年会 (徳島市)、ポスター、2015
- 16 馬場淳平・島田敦広・山下栄樹・村本和優・伊藤-新澤恭子・月原富武・吉川信也:シアン結合完全還元型チトクロム酸化酵素の X 線結晶構造解析から明らかになった、活性中心を構成する heme a₃ の高い可動性、第 15 回日本蛋白質科学会年会 (徳島市)、ポスター、2015
- 17 波多野啓太・島田敦広・引田理英・蓼原瞳・山本旭麻・山下栄樹・前田友子・伊藤-新澤恭子・月原富武・吉川信也:チトクロム酸化酵素の真のアジ化物イオン結合型構造により明らかになった、酸素還元中心の構造変化とプロトンポンプ経路の関係性、第 15 回日本蛋白質科学会年会 (徳島市)、ポスター、2015
- 18 今井瑞依・斉尾智英・内田毅・伊藤-新澤恭子・吉川信也・石森浩一郎:ミトコンドリア呼吸鎖のシトクロム *c*-シトクロム *c* 酸化酵素複合体における電子伝達反応の 構造制御機構、第 15 回日本蛋白質科学会年会 (徳島市)、ポスター、2015
- 19 青江新平・島田悟・伊藤-新澤恭子・島田敦広・馬場淳平・武村秀平・山下栄樹・吉川信也・月原富武:第 2 のチトクロム *c* 結合部位を持つチトクロム *c*-チトクロム酸化酵素共結晶の X 線結晶構造解析、第 15 回日本蛋白質科学会年会 (徳島市)、ポスター、2015
- 20 萩本楓・伊藤-新澤恭子・島田敦広・島田悟・Luo Fangjia・山下栄樹・吉川信也・月原富武:中性領域(pH7.3)でのウシ心筋チトクロム酸化酵素の結晶化及び構造解明、第 15 回日本蛋白質科学会年会 (徳島市)、ポスター、2015
- 21 島田敦広・矢野直峰・武村秀平・村本和優・山下栄樹・伊藤-新澤恭子・前田友子・月原富武・吉川信也:チトクロム酸化酵素内の Mg を含む水クラスターが酸素取り込み前に 4 等量のプロトンを蓄積することで、高効率プロトンポンプ反応を可能にする、第 15 回日本蛋白質科学会年会 (徳島市)、ポスター、2015
- 22 江藤勇樹・島田敦広・前田友子・山下栄樹・村本和優・伊藤-新澤恭子・月原富武・吉川信也:チトクロム酸化酵素 F 型中間体の高分解能 X 線結晶構造解析、第 15 回日本蛋白質科学会年会 (徳島市)、ポスター、2015
- 23 伊藤-新澤恭子・下村陽信・柳澤幸子・島田悟・小倉尚志・月原富武:機能を保持したウシ心筋ミトコンドリア呼吸鎖超複合体の調製、第 15 回日本蛋白質科学会年会 (徳島市)、ポスター、2015
- 24 中島聡・西口達人・李辰・伊藤-新澤恭子・吉川信也・小倉尚志:チトクロム *c* 酸化酵素における酸素還元反応とプロトンポンプ共役機構、第 53 回日本生物物理学会年会 (金沢市)、口頭、2015
- 25 波多野啓太・宮本朱梨・島田敦広・馬場清喜・熊坂崇・伊藤-新澤恭子・月原富武・吉川信也:チトクロム酸化酵素を用いた常温高分解能 X 線回折実験法の確立、第 53 回日本生物物理学会年会 (金沢市)、ポスター、2015

- 26 江藤勇樹・島田敦広・原史剛・山下栄樹・伊藤-新澤恭子・月原富武・吉川信也：ウシ心筋チトクロム酸化酵素 O 型中間体の X 線結晶構造解析、第 53 回日本生物物理学会年会（金沢市）、ポスター、2015
- 27 島田悟・青江新平・伊藤-新澤恭子・馬場淳平・島田敦広・山下栄樹・吉川信也・月原富武：チトクロム酸化酵素に対するチトクロム c の 2 つの結合部位の X 線構造解析、第 53 回日本生物物理学会年会（金沢市）、ポスター、2015
- 28 伊藤-新澤恭子・下村陽信・柳沢幸子・島田悟・高橋涼子・上根滋史・小倉尚志・吉川信也・月原富武：Active supercomplex purified from bovine heart reveals the functional unit of the mitochondrial respiratory chain、第 53 回日本生物物理学会年会（金沢市）、ポスター、2015
- 29 伊藤-新澤恭子：ミトコンドリア呼吸鎖複合体の構造・機能研究の新展開、（第 88 回日本生化学会大会（BMB2015）（神戸市）、口頭、2015

大学院生命理学研究科

博士前期課程

江藤 勇樹：チトクロム酸化酵素の反応中間体の構造解析

波多野啓太：チトクロム酸化酵素の時分割構造解析

宮本 朱梨：チトクロム酸化酵素酸化型の構造精密化

博士課程（5 年一貫）

Luo Fang Jia：高分解能構造解析のためのデータ処理プログラム作製

科学研究費補助金等

1 戦略的創造研究推進事業（CREST）（平成 24～29 年度）

研究課題 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

研究代表者 月原富武

2 研究開発施設等共用促進費補助金 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業：創薬等支援技術基盤プラットフォーム（平成 25～28 年度）

研究課題 多様な顕微鏡技術による膜タンパク質複合体の多階層での機能構造研究

研究代表者 Christoph Gerle

3 光・量子融合連携研究開発プログラム（平成 25～28 年度）

研究課題 チトクロム c 酸化酵素の水素イオン能動輸送機構の解明

研究代表者 月原富武

4 科学研究費補助金（平成 26～28 年度）基盤研究 B

研究課題 水素原子レベルの時分割解析による呼吸鎖末端酸化酵素のプロトンポンプ機構の研究

研究代表者 吉川信也

5 科学研究費補助金（平成 27～29 年度）若手研究 B

研究課題 X 線自由電子レーザーを用いた、常温での高分解能無損傷 X 線結晶構造解析方法の開発

研究代表者 島田敦広

6 科学研究費補助金（平成 27～28 年度）挑戦的萌芽研究

研究課題 極低温単粒子時分割解析による F_0F_1 -ATP 合成酵素の F_0/F_1 共役機構の研究

研究代表者 Christoph Gerle