

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つ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行った。その結果は、*Science Advance* に論文として採択され掲載された。

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。この結果は、*EMBOJ* に論文として採択され掲載された。また、チトクロム *c* の電子伝達に

関わるサイトだけでなく、活性調節や複合体Ⅲとの間で効率よい電子伝達が可能とするための第二の結合サイトが存在することを明らかにした。

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。精製された超複合体のラマン分光法による解析外可能となり、複合体形成に伴う複合体Ⅳの構造に対する影響の検討を開始した。また、超複合体を形成する個々の複合体を精製し会合させ、結晶化を行う試みを開始した。

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。本酵素のプロトンポンプに伴う ATP 合成を理解するには、膜内部分、F_o 部分の高分解能構造解明は必須である。そのため、我々が精製し凍結保存している標品から F_o 部分の単離精製、そして 3 次元結晶化の試みを開始した。

発表論文 List of Publications

1. Shimada A, Kubo M, Baba S, Yamashita K, Hirata K, Ueno G, Nomura T, Kimura T, Shinzawa-Itoh K, Baba J, Hatano K, Eto Y, Miyamoto A, Murakami H, Kumasaka T, Owada S, Tono K, Yabashi M, Yamaguchi Y, Yanagisawa S, Sakaguchi M, Ogura T, Komiya R, Yan J, Yamashita E, Yamamoto M, Ago H, Yoshikawa S, Tsukihara T. A nanosecond time-resolved XFEL analysis of structural changes associated with CO release from cytochrome c oxidase. *Sci Adv.* **3(7)**, e1603042 (2017)
2. Luo F, Shinzawa-Itoh K, Hagimoto K, Shimada A, Shimada S, Yamashita E, Yoshikawa S, Tsukihara T. Structure of bovine cytochrome c oxidase crystallized at a neutral pH using a fluorinated detergent. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* **73(Pt 7)**, 416-422. (2017)
3. Shimada, S., Shinzawa-Itoh, K., Baba, J., Aoe, S., Shimada, A., Yamashita, E., Kang, J., Tateno, M., Yoshikawa, S., Tsukihara, T. Complex structure of cytochrome c-cytochrome c oxidase reveals a novel protein-protein interaction mode. *EMBO J.* **36(3)**, 291-300. (2017)
4. Yano, N., Muramoto, K., Shimada, A., Takemura, S., Baba, J., Fujisawa, H., Mochizuki, M., Shinzawa-Itoh, K., Yamashita, E., Tsukihara, T., Yoshikawa, S. The Mg²⁺-containing Water Cluster of Mammalian Cytochrome c Oxidase Collects Four Pumping Proton Equivalents in Each Catalytic Cycle. *J Biol Chem.* **291(46)**, 23882-23894. (2016)
5. Sato, W., Hitaoka, S., Inoue, K., Imai, M., Saio, T., Uchida, T., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Yoshizawa, K., Ishimori, K.: Energetic Mechanism of Cytochrome c-Cytochrome c Oxidase Electron Transfer Complex Formation under Turnover Conditions Revealed by Mutational Effects and Docking Simulation. *J Biol Chem.* **291(29)**, 15320-15331. (2016)
6. Shinzawa-Itoh, K., Shimomura, H., Yanagisawa, S., Shimada, S., Takahashi, R., Oosaki, M., Ogura, T., Tsukihara, T.: Purification of Active Respiratory Supercomplex from Bovine Heart Mitochondria Enables Functional Studies. *J Biol Chem.* **291(8)**, 4178-4184. (2016)
7. Osuda Y, Shinzawa-Itoh K, Tani K, Maeda S, Yoshikawa S, Tsukihara T, Gerle C.: Two-dimensional crystallization of monomeric bovine cytochrome c oxidase with bound cytochrome c in reconstituted lipid membranes. *Microscopy (Oxf).* **65(3)**, 263-267. (2016)

国際会議

1. 伊藤-新澤恭子 : X-ray structural analysis of mammal cytochrome c-cytochrome c oxidase complex at 2.0 Å resolution, 第 14 回アジア国際結晶学会, Hanoi University of Science and Technology, ベトナム, 口頭, (2016)
2. 伊藤-新澤恭子 : Complex Structure of Mammalian Cytochrome c-Cytochrome c Oxidase Reveals a Novel Protein-Protein Interaction Mode, BIT's 5th Annual Conference of AnalytiX 2017 ヒル

トン福岡シーホーク, 福岡市, 口頭, (2017)

国内会議

3. 伊藤-新澤恭子: ウシ心筋ミトコンドリア呼吸鎖複合体の精製法 (Purification of respiratory complexes from bovine heart mitochondria)、第 16 回日本蛋白質科学会年化 (福岡市)、ポスター、2016
4. Luo Fangjia、Atsuhiko Shimada、Keitaro Yamashita、Kunio Hirata、Kyoko Shinzawa-itoh、Tomitake Tsukihara、Shinya Yoshikawa : Processing of XFEL still images with a reference oscillation data set for crystal structural analyses of cytochrome c oxidase、第 16 回日本蛋白質科学会年化 (福岡市)、ポスター、2016
5. 島田悟・青江新平・伊藤-新澤恭子・馬場淳平・島田敦広・Jiyoung Kang・舘野賢・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の複合体での結晶構造が示す新しい蛋白質間相互作用様式 (Structure of complex of cytochrome c and cytochrome c oxidase shows the novel protein-protein interaction style)、第 16 回日本蛋白質科学会年化 (福岡市)、ポスター、2016
6. 波多野啓太・島田敦広・宮本朱梨・馬場清喜・山下恵太郎・久保稔・吾郷日出夫・平田邦生・上野剛・村上博則・山本雅貴・熊坂崇・山下栄樹・小倉尚志・伊藤-新澤恭子・月原富武・吉川信也: X 線自由電子レーザーを用いた、ポンプ・プローブ法によるチトクロム酸化酵素の時分割結晶構造解析 Time-resolved crystallographic analysis of cytochrome c oxidase using X-ray free electron laser、第 16 回日本蛋白質科学会年化 (福岡市)、ポスター、2016
7. 宮本朱梨・島田敦広・波多野啓太・馬場清喜・熊坂崇・伊藤-新澤恭子・月原富武・吉川信也: 常温での高分解能データ収集に必要なチトクロム酸化酵素結晶の凍結解凍法の確立 (Development of thawing method of frozen protein crystal for high-resolution crystal structure analysis at room temperature)、第 16 回日本蛋白質科学会年化 (福岡市)、ポスター、2016
8. 江藤勇樹・島田敦広・山下栄樹・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 1.6Å 分解能 X 線結晶構造解析 (X-ray crystal structure analysis of F intermediate of cytochrome c oxidase at 1.6 angstrom resolution)、第 16 回日本蛋白質科学会年化 (福岡市)、ポスター、2016
9. 中島聡・中川善之・伊藤-新澤恭子・吉川信也・小倉尚志: チトクロム酸化酵素の反応サイトの時間分解ラマン分光法による動的構造解析 (Dynamics at the reaction site of cytochrome c oxidase studied by time-resolved resonance Raman spectroscopy)、第 16 回日本蛋白質科学会年化 (福岡市)、ポスター、2016
10. 島田敦広・馬場淳平・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の様々な反応中間体及び反応中間体類似物の構造から提唱されるプロト

- ンポンプ機構 (The proton-pump mechanism suggested from the crystal structures of cytochrome c oxidase intermediates and their derivatives)、第 16 回日本蛋白質科学会年会 (福岡市)、ポスター、2016
11. Satoru Shimada, Kyoko Shinzawa-Itoh, Junpei Baba, Shimpei Aoe, Atsuhiko Shimada¹, Eiki Yamashita, Jiyoung Kang, Masaru Tateno, Shinya Yoshikawa, Tomitake Tsukihara : チトクロム c とチトクロム酸化酵素の複合体構造が示す新しいタンパク質間相互作用様式 (Complex structure of cytochrome c and cytochrome c oxidase shows a novel inter-protein interaction mode)、第 54 回生物物理学会年会 (つくば市)、ポスター、2016
 12. Yudai Aoyagi, Tatsuhito Nishiguchi, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, Satoru Nakashima, Takashi Ogur : チトクロム c 酸化酵素の水素結合状態変化の酸素還元反応への影響 (The effect of the hydrogen bond network on the oxygen reduction of cytochrome c oxidase)、第 54 回生物物理学会年会 (つくば市)、ポスター、2016
 13. Atsuhiko Shimada, Naomine Yano, Kazumasa Muramoto, Eiki Yamashita, Kyoko Shinzawa-Itoh, Tomitake Tsukihar, Shinya Yoshikaw : チトクロム酸化酵素の高分解能結晶構造から明らかとなった高効率プロトンポンプ機構 (High-resolution crystal structure of cytochrome c oxidase reveals the mechanism of highly efficient proton pumping)、第 54 回生物物理学会年会 (つくば市)、ポスター、2016
 14. Satoru Shimada, Shigefumi Uene, Marika Oosaki, Ryoko Takahashi, Harunobu Shimomura, Kaoru Mieda, Shintaro Maeda, Masahide Hikita, Kyoko Shinzawa-Itoh : 本来の構造と機能を保持したウシミトコンドリア呼吸鎖複合体の精製 (Purification of native mitochondrial respiratory complexes from bovine heart)、第 54 回生物物理学会年会 (つくば市)、ポスター、2016
 15. Christoph Gerle, Florian Hauer, Niels Fischer, Kyoko Shinzawa-Itoh, Satoru Shimada, Ken Yokoyama, Atsunori Oshima, Yoshinori Fujiyoshi, Holger Stark : GraDeR : 単粒子解析等の膜タンパク質資料調整 (GraDeR: membrane protein preparation for single particle cryoEM & more)、第 54 回生物物理学会年会 (つくば市)、ポスター、2016
 16. 月原富武・島田敦広・矢野直峰・村本和優・新澤-伊藤恭子・山下栄樹・吉川信也 : 精密 X 線結晶構造解析によるチトクロム酸化酵素の酵素還元・プロトンポンプ機構(Detailed crystal structural studies of bovine cytochrome oxidase to elucidate the coupling mechanism of dioxygen reduction and proton pump)、第 54 回生物物理学会年会 (つくば市)、ポスター、2016

大学院生命理学研究科

博士前期課程

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)

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ー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_0F_1 共役機構の研究
研究代表者 Christoph Gerle
- 7 科学研究費補助金 (平成 29~31 年度) 基盤研究 B
研究課題 ATP 合成に関わるミトコンドリア呼吸鎖超複合体と ATP 合成酵素の高分解能構造解析
研究代表者 伊藤恭子