

## 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)

伊藤(新澤)恭子・吉川信也・月原富武

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<sub>A</sub>, Fe<sub>a</sub>, Cu<sub>B</sub>, Fe<sub>a3</sub>)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。これまで得られた結晶構造はすべて、pHが6.0以下での構造であったが、フッ素化界面活性剤を用いることにより中性領域での結晶化が可能となり、そのpH領域での構造を酸化型及び還元型について明らかにし報告した。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となったので、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進めた。

## 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

伊藤(新澤)恭子・吉川信也・月原富武

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。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

月原富武・伊藤(新澤)恭子

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。一方で、超複合体をほとんど形成することなく効率の良い呼吸を可能としているショウジョウバエのミトコンドリアにおける適応を発見し論文としてまとめた。

### Ⅳ 複合体 V (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素) 複合体 I (NADH 還元酵素) の構造研究

#### Structural Studies on complex V (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase) and complex I (NADH reductase)

伊藤(新澤)恭子

Shinzawa-Itoh, K

ウシ心筋ミトコンドリア膜から複合体 I と複合体 V を選択的に可溶化し、精製する方法を確立し、論文としてまとめて報告した。両者ともに 45 種類、17 種類の全てのサブユニットを持ち、特異的阻害剤であるピエリシジン A と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。両者からは二次元結晶を得ることができた。これまでにまだ全体構造と膜中構造の詳細な報告がない、複合体 V については、凍結保存している標品から Fo 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. Li C, Nishiguchi T, Shinzawa-Itoh K, Yoshikawa S, Ogura T, Nakashima S. Performance of a time-resolved IR facility for assessment of protonation states and polarity changes in carboxyl groups in a large membrane protein, mammalian cytochrome c oxidase, under turnover conditions in a sub-millisecond time resolution. *Biochim Biophys Acta*. S0005-2728(18), 30131-30132. (2018)
2. Shimada S, Maeda S, Hikita M, Mieda-Higa K, Uene S, Nariai Y, Shinzawa-Itoh K. Solubilization conditions for bovine heart mitochondrial membranes allow selective purification of large quantities of respiratory complexes I, III, and V. *Protein Expr Purif*. 150, 33-43. (2018)
3. Luo F, Shinzawa-Itoh K, Hagimoto K, Shimada A, Shimada S, Yamashita E, Yoshikawa S, Tsukihara T. Structure of bovine cytochrome c oxidase in the ligand-free reduced state at neutral pH. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. 74(Pt 2), 92-98. (2018)
4. Shimada S, Oosaki M, Takahashi R, Uene S, Yanagisawa S, Tsukihara T, Shinzawa-Itoh K. A unique respiratory adaptation in *Drosophila* independent of supercomplex formation. *Biochim Biophys Acta*. 1859(2), 154-163. (2017)
5. 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)
6. 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)
7. 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)

## 国際会議

1. 伊藤-新澤恭子 : Complex structure of cytochrome c-cytochrome c oxidase reveals a novel interprotein interaction mode, 第 19 回国際生物物理学 (IUPAB) 大会, エジンバラ, ポスター, (2017)
2. 伊藤-新澤恭子 : Complex structure of mammalian cytochrome c-cytochrome c oxidase reveals a novel protein-protein interaction mode, 第 9 回国際構造生物学会 (9th International Conference on Structural Biology) , チューリッヒ, 口頭, (2017)

## 国内会議

3. 月原富武・吉川信也：X線自由電子レーザーを用いたチトクロム酸化酵素の時分割構造解析によって明らかとなった、リガンド結合に伴うプロトンポンプ経路の閉鎖機構、第17回日本蛋白質科学会年会（仙台市）、ポスター、2017
4. 月原富武・吉川信也：X線レーザーを用いた、チトクロム酸化酵素からの一酸化炭素解離に伴う構造変化の時分割結晶構造解析、第55回生物物理学会年会（熊本市）、ポスター、2017
5. 伊藤(新澤)恭子：ショウジョウバエのミトコンドリアにおける超複合体形成によらない独特の呼吸適応、第90回日本生化学会大会（神戸市）、口頭、ポスター、2017
6. 宮本朱梨：ウシ心筋チトクロム酸化酵素の常温還元型構造解析、第90回日本生化学会大会（神戸市）、ポスター、2017

## 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）

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 光・量子融合連携研究開発プログラム（平成25～29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
- 3 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（新澤）恭子