

X線自由電子レーザー施設 SACLA による、哺乳動物が生きるためのエネルギーを獲得する仕組みの解明

要旨

兵庫県立大学大学院生命理学研究科月原富武、吉川信也、島田敦広、理化学研究所放射光科学総合研究センター吾郷日出夫、久保稔、高輝度光科学研究センター馬場清喜、他23名は、X線自由電子レーザー施設SACLA(BL3)を利用して、哺乳動物のチトクロム酸化酵素（呼吸酵素）の反応に伴う構造変化を精密に決定し、この酵素が食物から生命活動のための（生きるための）エネルギーを無駄なく獲得する仕組みを解明した。

哺乳動物（ヒトを含む）のチトクロム酸化酵素(以下 CcO と略記)は食物(エネルギー源)を酸素(O_2)によって酸化し、得られたエネルギーにより水素イオンを CcO (巨大なタンパク質分子)の一方から他方へ輸送し食物のエネルギーを集積する。このようにして集積(獲得)されたエネルギーにより生命活動のエネルギー源である ATP が合成される。水素イオンは CcO 内部にある H-経路とよばれる水素イオン輸送経路を経由して輸送される(図 1)。その時、その逆流が完全に防がれていることが無駄なく食物のエネルギーを集積するために必要である。しかし、この逆流防止の仕組みは CcO によるこのエネルギー集積(獲得)過程の最大の未解明の問題の一つとして残されていた。

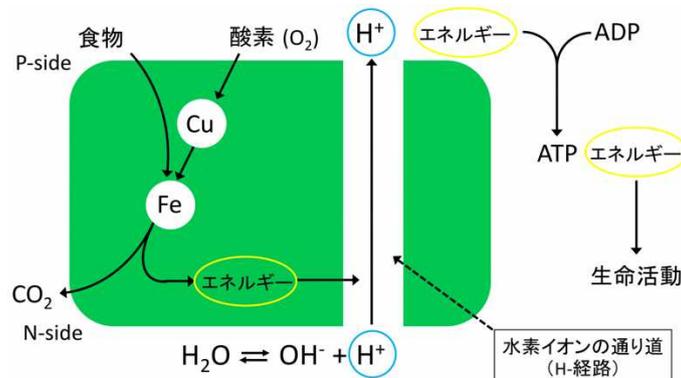


図 1. チトクロム酸化酵素によって生命活動エネルギーが作られる概要

本研究ではSACLAにより O_2 とほとんど同じ様式で CcO と反応する一酸化炭素(以下 CO と略記)と CcO との反応に伴う CcO の立体構造の時間変化を追跡し、水素イオンが H-経路に取り込まれた後に、 O_2 が活性中心に含まれている銅イオンに結合することにより H-経路を閉鎖することを明らかにした。このようにして、水素イオンの逆流が効率よく防止されるため、取り込みも促進される。このような発見はタンパク質の高速の立体構造変化を正確に追跡することのできる SACLA を利用することができてこそ可能であったと言える。

CcO のエネルギー集積効率が精妙に制御されて、組織や細胞の正常な活動(恒常性)が維持されていることが、最近の種々の CcO 活性制御因子(タンパク質)の発見により強く示唆されるようになっている。したがって、本研究による CcO のエネルギー集積(獲得)機構の

解明は生命現象の理解を深めることに貢献するだけでなく、CcO 活性制御因子による組織や細胞の活動の制御機構の解明、したがって疾病の機構の解明に大きく寄与する可能性がある。また、H-経路の構造と機能は動物にしか保存されていないことが本研究によりさらに確実になったので創薬のターゲットになる可能性もある。

本研究成果は世界主要科学雑誌の一つである Science Advances 最新号 (2017 年 7 月 14 日号) に発表される。

【用語】

チトクロム酸化酵素…チトクロムの一成分で、電子伝達系の末端で作用する酸化酵素。
シアン化物や一酸化炭素などは、この作用を阻害する。

チトクロム…生物の細胞内に存在するヘムたんぱく質。細胞呼吸において電子伝達体としての役目を果たす。

水素イオン (H^+) …水分子の解離 ($H_2O = H^+ + OH^-$) により生じる。細胞中は水で満たされているのでどこにでもある正イオン。

背景

ヒトを含む哺乳動物はエネルギー源となる食物を酸素(O_2)で完全に酸化して得られるエネルギーによりほとんどあらゆる生命活動のエネルギー源である ATP を合成している (酸素呼吸)。 O_2 により食物を完全に酸化すること (例えば炭水化物の場合は CO_2 にまで酸化すること) ができるようになり食物から取り出し生命活動に利用できるエネルギーが飛躍的に増大したことが、現在の地球上での生物多様性をもたらした主要因であると考えられている。

この酸素呼吸の中心として機能するチトクロム酸化酵素は約 90 年前に発見されて以来、その機能の仕組みの解明は生命科学の最重要課題の一つであり続けている。しかし、この酵素の機能を化学反応として捉えようとする研究は 1995 年に X 線結晶構造解析法により CcO の立体構造が決定されてから本格的になったと言える。CcO はその酸素受容部位 (Fe イオンと Cu イオンを含む) が取り込んだ O_2 により食物を酸化し生じたエネルギーにより水素イオンを CcO (巨大なタンパク質) 分子の一方から他方へ (それぞれ N-side, P-side と命名されている) H-経路と呼ばれる水素イオン輸送経路を経由して輸送される。その結果食物のエネルギーは P-side に輸送された水素イオンに移送集積される。このようにしてエネルギーを集積された水素イオンによって ATP 合成酵素という別の巨大なタンパク質が ATP を合成する (この P-side への水素イオン輸送までが CcO の役割である)。この水素イオン輸送過程において、N-side へ水素イオンが逆流すると水素イオンのエネルギーは散逸し ATP 合成に利用不可能になる。したがって、精緻な水素イオン逆流防止機構を CcO は具備しているはずである。しかし、X 線結晶構造解析法により H-経路の立体構造が高分解能

で決定されているにもかかわらずこの逆流防止機構は CcO の機能の仕組みの最大の未解明の問題の一つとして残されていた。その最大の原因は、従来の X 線結晶構造解析は結晶中で静止しているタンパク質にしか適用できなかったことにある。CcO の水素イオン逆流防止機構はその反応中に機能しているため、反応中の立体構造の時間変化を追跡する必要があるが CcO のようにミリ秒の速さで進行する酵素反応に伴う酵素の立体構造変化を追跡することは全く不可能であった。

研究手法

CcO に限らず、タンパク質の機能解明のためにはその駆動する化学反応の進行に伴う立体構造変化を解析することが不可欠である。したがって、蛋白質の駆動する化学反応よりはるかに高速で立体構造を決定することが可能な X 線自由電子レーザー施設 SACLA は多くの生命科学研究者の夢の実現を期待させるものである。本研究では SACLA を利用した立体構造の時間変化の解析（時分割 X 線構造解析）により水素イオン逆流防止機構の解明を試みた。上記防止機構は O₂ が CcO に取り込まれて食物のエネルギーを取り出す前に機能すると考えられるので、O₂ と CcO との反応に伴う立体構造の時間変化を解析した。このとき O₂ とほとんど同じ様式で CcO と反応することが知られている CO との反応を解析した。また、結晶中での CO 結合反応を、新規に開発された超高感度時間分解赤外分光装置でも測定し、反応中間体分子種の増減を精密に追跡した。

成果

実験結果

- 1) 結晶中でも溶液中と同様に CO は酸素受容部位の Fe イオンに最終的に結合する前に Cu イオンに一時的に結合することが時分割 X 線構造および赤外分光解析により確かめられた。この CO の Cu イオンへの滞留時間は約 100 ナノ(10⁻⁹)秒であるからこの中間体の立体構造は SACLA でしか決定することができない。
- 2) CO が Cu イオンに結合したとき（上述の中間体が形成された時）H-経路の立体構造変化により、N-side の水分子の H-経路への可逆的侵入がその中間点付近で遮断された（図 2 参照）。これにより H-経路に輸送された水素イオンの水分子による N-side への逆流は防止される（図 2 参照）（CO 結合前の構造を”Open 構造”、CO 結合後の構造を”Closed 構造”と命名する）。
- 3) CO が Fe イオンに移動しても H-経路の立体構造は変化せず Closed 構造のままであった。
- 4) H-経路の開閉を制御する構造が検出された。時分割 X 線結晶構造解析による立体構造変化の解析により Cu イオンと H-経路を構成するアミノ酸側鎖の一つである S382 を連結する以下のリレーシステムにより H-経路の開閉は制御されていた。



heme vinyl group と L381 との 20 pm (10^{-12}m)程度の微小な相対距離の変化によりこのリレーは機能していた。

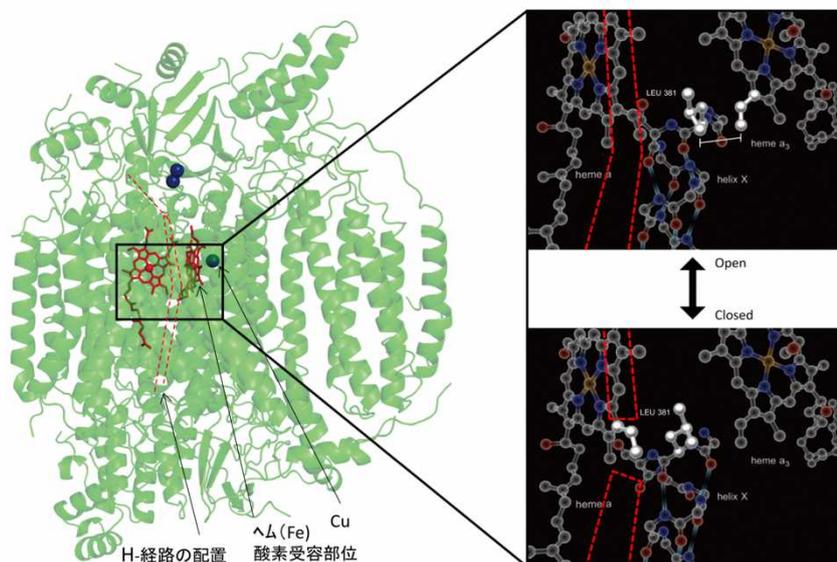


図2 H-経路の開閉

ウシ心筋チトクロム酸化酵素のリボンモデル図に酸素受容部位と H-経路（赤破線）の配置を示す。H-経路の開閉を誘起する立体構造変化を拡大図として示す。

実験結果に基づく水素イオン逆流防止機構

本研究により以下のような機構が明らかになった。

- i) 水素イオンが H-経路に取り込まれたことが酸素受容部位の Cu イオンにより感知される。
- ii) Cu イオンの O₂ 親和性が高まり、O₂ を取り込む。
- iii) O₂ の Cu イオンへの結合がトリガーとなり上述のリレーシステムが機能し H-経路は Closed 構造をとる。
- iv) O₂ が Fe イオンへ移動し、食物分子を酸化しエネルギーを取り出す。
- v) このエネルギーにより H-経路に輸送保管されている水素イオンを P-side にまで輸送し、食物のエネルギーを P-side の水素イオンに集積する。このとき H-経路は Closed 構造をとっているため水素イオンの逆流は防止される。

今後の期待

本研究では O₂ と同様の様式で CcO に結合する CO と CcO との反応の解析により水素イオン逆流防止機構を解明した (O₂ と CcO との反応では、O₂ が結合した後の O₂ 還元反応が重複するため O₂ の CcO への結合反応経過を高精度で検出することが実験的に困難である)。しかし、CO は食物分子を酸化することができないため、食物分子の酸化によって得られたエネルギーによって水素イオンを P-side に輸送し、エネルギーを集積する機構の研究は不可能である。今後は O₂ と CcO との反応の SACLA による解析により CcO 本来の反応を原

子の挙動として追跡し反応機構を解明することを計画している。上述の通り本酵素は酸素呼吸の中心酵素であるため、生命現象の理解を深めることに大きく貢献する。しかし、最近 CcO の活性調節因子タンパク質が続々と発見されており、CcO は生命活動の恒常性の維持にも重要な役割をもつことが示唆されている。したがって本研究のような CcO の反応機構の基礎的理解を深める研究成果は疾病の機構の解明にも役立つ可能性がある。また本研究をはじめとして水素イオン能動輸送機構の多様性（生物種によって機構したがってそれを駆動する構造が異なる）を強く示唆する研究成果が蓄積している。さらに上述の通り CcO は細胞エネルギー産生の根幹の酵素であるため、重要な創薬のターゲットになり得ることが示唆される。

本研究経費の一部は JST CREST Grant Number JPMJCR12M3 から援助された。

論文情報

原論文情報

タイトル

A nanosecond time-resolved XFEL analysis of structural changes associated with CO release from cytochrome c oxidase

著者名

Atsushi Shimada, Minoru Kubo, Seiki Baba, Keitaro Yamashita, Kunio Hirata, Go Ueno, Takashi Nomura, Tetsunari Kimura, Kyoko Shinzawa-Itoh, Junpei Baba, Keita Hatano, Yuki Eto, Akari Miyamoto, Hironori Murakami, Takashi Kumasaka, Shigeki Owada, Kensuke Tono, Makina Yabashi, Yoshihiro Yamaguchi, Sachiko Yanagisawa, Miyuki Sakaguchi, Takashi Ogura, Ryo Komiya, Jiwang Yan, Eiki Yamashita, Masaki Yamamoto, Hideo Ago, Shinya Yoshikawa, Tomitake Tsukihara

雑誌

Science Advances 2017;3: e1603042 14 July 2017

【研究に関する問い合わせ先】

理化学研究所 放射光科学総合研究センター
ビームライン基盤研究部 生命系放射光利用システム開発ユニット
吾郷日出夫
電話：0791-58-0802（内線 3641） FAX：0791-58-2834
e-mail: ago@spring8.or.jp

兵庫県立大学生命理学研究科

吉川 信也

電話:0791-58-0345 e-mail : yoshi@sci.u-hyogo.ac.jp

【機関窓口】

理化学研究所 広報室 報道担当
TEL : 048-467-9272 FAX : 048-462-4715
E-mail : ex-press@riken.jp

公益財団法人高輝度光科学研究センター(JASRI)
利用推進部普及情報課
電話:0791-58-2785 e-mail : kouhou@spring8.or.jp

公立大学法人兵庫県立大学播磨理学キャンパス
経営部総務課 神頭(かんと) e-mail : u_hyogo_harima@ofc.u-hyogo.ac.jp
電話:0791-58-0101 FAX:0791-58-0131