

氏名	島田 悟
学位の種類	博士（理学）
学位記番号	博理第79号
学位記授与年月日	平成26年3月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当（課程博士）
論文題目	「ミトコンドリア呼吸鎖の構造解析」
論文審査委員	（主査）教授 城 宜嗣 （副査）教授 宮澤 淳夫 （副査）教授 水島 恒裕 （副査）教授 安永 卓生 （九州工業大学情報工学部生命情報工学科） （副査）特任教授 吉川 信也 （兵庫県立大学大学院生命理学研究科）

## 1. 論文内容の要旨

ミトコンドリア呼吸の全容の解明のためには、電子伝達反応共役プロトンポンプ（複合体 I, III, IV）及び加水分解反応共役プロトンポンプ（複合体 V）個々のポンプの構造機能解明と共に、それらの相互作用機構の解明も必要である。本研究では、ミトコンドリア呼吸系で最も研究の進んでいない複合体 I (NADH-ユビキノン還元酵素) の 2 次元結晶構造解析と、ポンプ複合体相互作用解明の第一歩として、電子伝達共役複合体 3 者超複合体形成の生物種、臓器特異性を検討した。

複合体 I の 2 次元結晶化と構造解析 複合体 I は最大の呼吸鎖複合体であり、ウシ複合体は分子量 100 万で 44 種のサブユニットを含む。申請者所属研究室で開発された方法で精製された酵素標品を用いて、2 次元結晶化条件を詳細に検討した結果、結晶化に用いる精製標品の品質と再現性が不十分であることが明らかになった。そこで、精製条件の組織的な再検討を開始した。その結果、(1) 出発物質のミトコンドリア画分の定量法の開発、(2) カラムクロマトグラフィー後の酵素画分の硫安分画操作の密度勾配遠心操作への変更、(3) カラムクロマトグラフィーでの酵素画分溶離条件の改良による本酵素固有の脂質の脱落の防止等により最終酵素標品の収量、活性、安定性を大きく向上させることに成功した。この改良精製法によって得られ

た酵素標品から、改良前の標品よりはるかに高品質の2次元結晶が得られるようになった。結晶の出現頻度、再現性がまだ不十分である上に多種類の異なる晶系の結晶が混在していたが、一枚の負染色結晶の傾斜像から3次元再構成に成功した。その結果、単位格子中に2つの異なる立体構造(コンフォーマー)を持つタンパク質分子が充填されていることが明らかになった。複合体Iは長大なL字型分子で一辺が膜に埋め込まれ、他辺は水相に突出していることが知られている。細菌複合体Iの親水性部分のX線構造との比較により、本研究で発見された2つのコンフォーマーでは親水性部位の膜面に対する傾斜角に明確な差があった。この立体構造の違いは酸化型結晶で初めて認められたもので、以前単粒子解析結果から提唱された酸化還元に共役する構造変化とは異なる。長大な親水性部分は、マルチプルコンフォーマーを持つことから、何らかの生理機能を発揮していると考えられる。これまでの細菌酵素での3Å分解能レベルのX線構造解析では、このようなマルチプルコンフォーマーは発見されていない。おそらく3次元結晶格子中では、タンパク質間相互作用により一方のコンフォーマーに固定されているためと推定でき、このようなマルチプルコンフォーマーは2次元結晶解析によってこそ発見できたといえる。これらの成果は、2次元構造解析の可能性、必要性を具体的に実証するものであると同時に、複合体Iの親水部分がなぜこのような長大な構造をもつかという長年の疑問に一石を投ずるものである。

電子伝達反応共役プロトンポンプ複合体超複合体形成の生物種、臓器特異性 ミトコンドリア内膜中に存在する電子伝達反応共役プロトンポンプ複合体I, III, IVが超複合体を構成する事が、単粒子解析により報告されている。この機能を解明するためには高分解能での立体構造解析が不可欠である。そこで、安定で均一な超複合体の探索のため、マウス(心臓、肝臓)、ウシ、ショウジョウバエの超複合体形成状況を比較検討した。その結果マウスミトコンドリアには単独の複合体Iは検出されず、全ての複合体が超複合体に組み込まれていた。また、超複合体形成に臓器特異性は認められなかった。しかし、飛翔に多大なエネルギーを必要としているショウジョウバエのミトコンドリアには、超複合体は検出されなかった。このようにエネルギー要求性と超複合体形成に相関は認められなかった。これらの結果は、超複合体は単に電子伝達効率の向上のためだけではなく、電子伝達の調節にも寄与していることを示唆している。

## 2. 論文審査結果

複合体Iのプロトンポンプ機構は未解明であるが、チトクロム酸化酵素と同様に細菌とウシとでは大きく異なる可能性があるために、ウシ複合体Iの結晶構造解析が必要である。複合体Iは長大なL字型構造を持つため、3次元結晶格子への充填による、立体構造制約が非常に強

いと推定される。したがってこのような制約がはるかに軽微であると考えられる2次元構造解析は、複合体Iについては特に必要であると考えられる。

本論文には、3Å分解能レベルのX線構造解析にも発見されていない大きなマルチプルコンフォマーが複合体Iの親水部分に発見された経緯が詳細に記載されている。これは2次元構造解析の可能性を具体的に示すものであり、またこの親水部分の柔軟性に関連して本酵素の反応機構解析がさらに活性化されると期待される。また、本論文記載の超複合体に関する成果は、超複合体の意義に関して新たな視点を導入するものであり、意義深い。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。

また、平成26年1月31日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。