

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23550022

研究課題名(和文) 時間分解振動分光法による膜蛋白質プロトン輸送ダイナミクスの解明

研究課題名(英文) Elucidation of membrane protein proton transfer dynamics by time-resolved vibrational spectroscopy

研究代表者

中島 聡 (Nakashima, Satoru)

兵庫県立大学・生命理学研究科・准教授

研究者番号：80263234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：チトクロムc酸化酵素(CcO)の酸素の水への還元反応とプロトンプロトンポンプの共役機構を解明するため、反応が観測できるフローシステムを開発した。その結果反応初期過程において、ヘムa3とHisの蛋白質-反応サイト間の相互作用が迅速に変化して酸素親和性を調整するとともに、プロトンポンプ経路上のゲートの開閉を同期して行っていることがわかった。これは実時間で共役機構が実験的に観測された初めての例である。また、酸素がヘムa3に配位する前にCuBに配位して、反応開始のタイミングを調整していることも明らかになった。これらのことは酸素還元反応自体がプロトンポンプ機構を制御していることを示している。

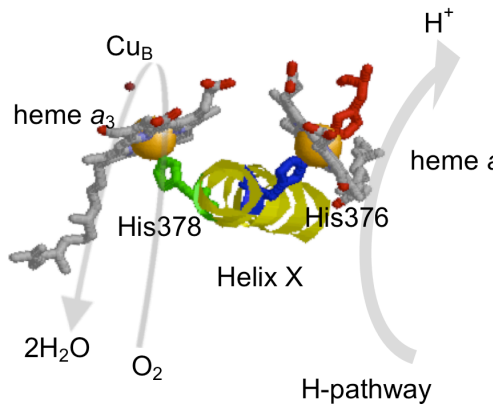
研究成果の概要(英文)：To investigate the coupling mechanism of the oxygen reduction reaction to water molecule and proton pumping in cytochrome c oxidase, new flow system that enable the time-resolved spectroscopy has been developed. By using this system, in the initial reaction process, heme a3 and His protein-reaction site interaction changed immediately changes to adjust the oxygen affinity. And it was also confirmed that it synchronizes with the open-close of the gate through water channel. This is the first example that observed the coupling mechanisms of the oxygen reduction reaction and the proton pumping in real time by the experimental observation. Furthermore, it was clarified that oxygen binds to CuB before ligate to heme a3, and it controlled the timing of the start of the oxygen reduction reaction. These observations exhibit that oxygen reduction reaction itself controlled the proton pumping mechanisms.

研究分野：生体分子分光学

キーワード：チトクロム酸化酵素 時間分解赤外分光法 共鳴ラマン分光法 プロトンポンプ 蛋白質ダイナミクス 膜蛋白質

1. 研究開始当初の背景

チトクローム酸化酵素 (以下 CcO : 分子量約 210kDa) はミトコンドリア内膜の呼吸鎖電子伝達系で電子伝達駆動性プロトンポンプとして機能する膜タンパク質で、エネルギー代謝に不可欠な役割を果たす。そのウシ心筋由来のものについて分解能 1.8Å で立体構造が決定されている[1]。(図 1)



CcO は 2 つの heme (6 配位の heme a と 5 配位の heme a<sub>3</sub>) と銅(Cu<sub>B</sub>)を活性中心に

もち、このうち heme a<sub>3</sub> が酸素の水への還元を行い、heme a がこの還元反応に共役してプロトンポンプを駆動していると考えられている。プロトンポンプに参与していると考えられる経路のうち H-pathway と呼ばれる経路が最も重要であることが示唆されている。heme a はこの H-pathway の途中にあり、その末端にはアスパラギン酸残基 (Asp51) がある。また、helix X と呼ばれる α-helix は His を介して heme a, heme a<sub>3</sub> と直接結合している上に、鍵となる Asp51 はこの helix X 上にあり、この残基のカルボキシル基の脱プロトン化過程が膜間空間側へのプロトン放出であると類推されている [2]。したがって heme a<sub>3</sub> の酸素還元反応過程と H-pathway 上の helix X や水素結合性アミノ酸残基の構造ダイナミクスがどう共役しているのかを明らかにすることが、プロトンポンプ機構の解明の鍵となる。

赤外分光法では水素結合に関連した結合やヘリックスの状態を詳細に検出できるため、プロトンポンプに参与する蛋白質部位のダイナミクスの検出には時間分解の赤外分光測定が重要である。しかしこれまで従来の FT-IR 法では装置的な制約から限られた系にしか適用できず、CcO のような巨大な膜蛋白質の時間分解赤外測定は行われていなかった。こういった観点から申請者は、高輝度赤外光源をもちいた新規赤外分光法の開拓を行って、ごく最近目標としていた性能を満たす新規の赤外分光装置を完成させた。この装置を用いて CcO の CO 光解離過程の時間分解

測定に成功した[3]。この測定では、上記のプロトン輸送系路上の helix X や Asp などのアミノ酸残基のダイナミクスを観測できた。この結果から酸素還元反応の初期過程において heme a<sub>3</sub> や Cu<sub>B</sub> の配位子結合状態がプロトンポンプ経路の動的揺らぎ・開閉をリレー的に制御していることが強く示唆された。さらに進んで CcO の酸素還元反応中のプロトンポンプを観測することが求められた。

2. 研究の目的

新規に開発した時間分解赤外吸収測定装置と既設の時間分解共鳴ラマン分光法を駆使して実際の酸素還元反応を観測し、蛋白質プロトンポンプにおける蛋白質構造ダイナミクスの詳細を解明することを目指した。特に酸素還元反応とプロトンポンプの共役機構を明らかにするためには、反応中の様子を吸収分光で測定できるようなフローセルシステムの開発が必須である。そこで赤外分光にも適応可能なフローシステムを開発し、プロトンポンプ過程の直接観測を行った。

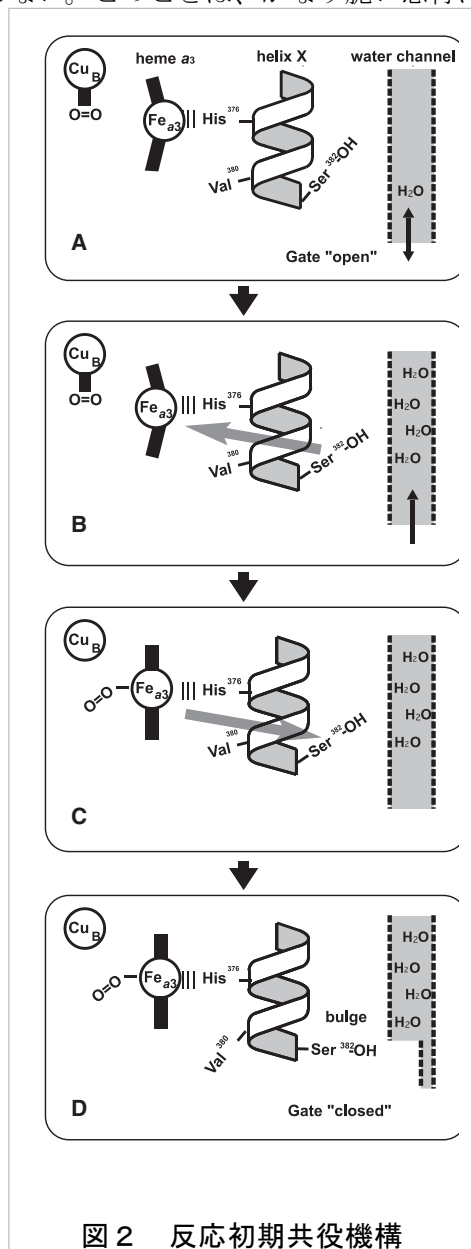
3. 研究の方法

本研究では新規開発した赤外分光法と時間分解共鳴ラマン分光法を駆使して CcO の酸素還元反応を時間分解測定することでプロトンポンプ機構を構造ダイナミクスの観点から解明することを目的としている。そのためまず赤外でも測定可能なフローシステムを開発した。酸素還元反応を観測するためには、CO が活性中心に結合した酵素を酸素雰囲気化の溶液に溶け込ませ、パルスレーザーにより CO を光解離させることで反応を開始させる。そのあと遅延時間を赤外レーザーパルスにより酸素との反応過程を追跡する。この反応を行うための、酸素肺システムとレーザーと同期したフローシステムを低温下で可能にする測定系を構築した。また、周波数可変の励起レーザーを導入し、CcO の異なった中間体からの反応を誘起し、電子移動過程や酸素活性化過程とプロトン輸送過程の関連についても調べて、ナノ秒からミリ秒に至る CcO の酸素還元反応と共役したプロトンポンプ機構全体の詳細を解析した。

4. 研究成果

① CO 光解離反応の時間分解振動分光法測定の結果、以下のような点が明らかになった。heme a<sub>3</sub> の Fe<sup>2+</sup> から光解離した CO は即座にその対面にある Cu<sub>B</sub> に配位するが、2 μsec 以内に蛋白質外部に逃げていく。この過程にほぼ同期して heme a<sub>3</sub> に配位している His376 の ν<sub>Fe-His</sub> が 221 cm<sup>-1</sup> から 215 cm<sup>-1</sup> へと大きく低波数シフトし酸素親和性が低下した。さらに主鎖構造の経時変化の解析から helix X の bulge 構造が極めて速く変化し過渡的に通常の α-helix 様の構造をとり、これがまた上記過程と同期して bulge 構造へと緩和していくことがわかった。

② 目的としているフローシステムの開発に成功した。反応はCO型のCcOを酸素肺と呼んでいる酸素を供給する部分を通り、溶液内に酸素を充分溶解させた後、励起用レーザーパルスでCOの光解離を起こして酸素との反応を開始させ、遅延時間をおいた赤外パルス光で構造ダイナミクスを観測する。また十分に低温(<5°C)でないと光解離による反応開始以前に酸素との反応が始まってしまうので送出力のシリジポンプからフローセルに至る試料溶液が通過する経路はすべて冷却を行った。可視領域の場合と異なり、赤外領域でのフローセルの作製はいくつかの問題点がある。まず、赤外光が透過するためには窓材がCaF<sub>2</sub>のような脆いものしかない。水溶液は非常に強い赤外吸収があるので透過厚を最大でも50 μm以下にしなければならない。レーザーの繰り返しは1kHzなので、その間に次の試料が来る程度の流速は確保しなければならない。このことは、かなり脆い窓材に強



い圧力をかけて非常に薄い流路を粘性の強い試料を流さなければならないことを意味している。これらの問題点を克服できるよう、セルの設計や素材-特にスペーサに関して検討し作成した。実際に酸素還元反応の様子を詳細に観測したところ、このフローシステムを用いてR->A->P->F->Oと呼ばれる各中間体を精度良く捕捉することに成功した。

③ このフローシステムを用いた酸素還元反応の過渡吸収測定により、酸素がheme a<sub>3</sub>に配位する前にCu<sub>B</sub>に配位する過渡種が存在することがわかった。これは従来の手法では観測できなかった過渡種であり、本研究により初めて明らかにされた物である。

これらの結果をもとに図2に示すような反応初期過程における酸素還元反応とプロトンポンプの共役機構を提唱する。反応開始前はプロトンポンプ経路のゲートは開いている状態で、水分子が自由に行き来している。この段階で酸素分子が2核中心にやってきたとき、まずCu<sub>B</sub>に配位する。この状態で経路上に充分水(プロトン)が供給されているとheme a<sub>3</sub>の酸素親和性が上がり、酸素分子が配位して反応が開始され、それと同期してゲートが閉まり、逆流を防ぐというものがある。つまりbulge構造はゲートおよびセンサーとして働き、状態に応じてFe-Hisの強さを調整することで、反応開始とプロトンの流れを制御するような共役機構が存在すると考えられる。残念ながらプロトンポンプ共役機構の全容の解明には至っていないが、今回の結果により従来は推測の域を出なかった共役機構に関して、実際の過渡種の観測に成功してその詳細が明らかになった。

#### <引用文献>

- [1] Shimokata, Y. Katayama, H. Murayama, M. Suematsu, T. Tsukihara, K. Muramoto, H. Aoyama, S. Yoshikawa and H. Shimada (2007) *PNAS, USA* **104**, 4200-4205.
- [2] T. Tsukihara, K. Shimokata, Y. Katayama, H. Shimada, K. Muramoto, H. Aoyama, M. Mochizuki, K. Shinzawa-Itoh, E. Yamashita, M. Yao, Y. Ishimura and S. Yoshikawa (2003) *PNAS, USA* **100**, 15304-15309.
- [3] M. Kubo, S. Nakashima, et al. *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 30259-30269.
- [4] S. Nakashima, T. Ogura, T. Kitagawa, *Biophys. Biochim. Acta* 1837 (2015) 86-97.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

- ① "Infrared and Raman spectroscopic investigation of the reaction mechanism of

cytochrome c oxidase” Satoru Nakashima, Takashi Ogura, Teizo Kitagawa, *Biochim. Biophys. Acta*, 査読有り。1847 (2015) 86-97. DOI: [10.1016/j.bbabi.2014.08.002](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.08.002)

② “High-sensitivity Nanosecond Time-resolved IR Spectrometer for Studying Protein Dynamics in Aqueous Solution”, S. Nakashima, M. Kubo, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Ogura\*, *Rev. Sci. Instr.* 査読有り (2015) in press.

③ “Effective pumping-proton collection facilitated by a copper site ( $Cu_B$ ) of bovine heart cytochrome c oxidase, revealed by a newly developed time-resolved infrared system”, Minoru Kubo, Satoru Nakashima, Satoru Yamaguchi, Takashi Ogura, Masao Mochizuki, Jiyoung Kang, Masaru Tateno, Kyoko Shinzawa-Itoh, Koji Kato and Shinya Yoshikawa, *J. Biol. Chem.*, 査読有り。288, 30259-30269 (2013). DOI: [10.1074/jbc.M113.473983](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.473983)

④ “Synthesis, Characterization, and Reactivity of Hypochloritoiron(III) Porphyrin Complexes”, Zhiqi Cong, Sachiko Yanagisawa, Takuya Kurahashi, Takashi Ogura, Satoru Nakashima, and Hiroshi Fujii, *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有り 134, 20617-21620 (2012) DOI: [10.1021/ja3108774](https://doi.org/10.1021/ja3108774)

⑤ “Development of Highly Sensitive Nanosecond Time-Resolved IR Apparatus Applicable to Protein System in  $H_2O$ ” Satoru Nakashima, Minoru Kubo, Satoru Yamaguchi, Takashi Ogura, Masao Mochizuki, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, *Biochem. Biophys. Acta* 査読有り。1817, 150 (2012).

⑥ “Site-specific Protein Dynamics in Communication Pathway from Sensor to Signaling Domain of Oxygen Sensor Protein, HemAT-Bs TIME-RESOLVED ULTRAVIOLET RESONANCE RAMAN STUDY” Samir F. El-Mashtoly, Minoru Kubo, Yuzong Gu, Hitomi Sawai, Satoru Nakashima, Takashi Ogura, Shigetoshi Aono, and Teizo Kitagawa\*, *J. Biol. Chem.*, 査読有り。287, 19973-19984 (2012) DOI: [10.1074/jbc.M112.357855](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.357855)

⑦ “An Intermediate Conformational State during Ligand Binding to Cytochrome c Oxidase Detected by Time-resolved Resonance Raman Analyses of Heme Peripheral Groups” Izumi Ishigami, Takeshi Nishigaki, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, Satoru Nakashima, and

Takashi Ogura, *Chem. Lett.*, 査読有り。41, 178-180 (2012).

[学会発表] (計 25 件)

① 中島 聡・久保 稔・石上 泉・新澤-伊藤 恭子・吉川 信也・小倉 尚志「時間分解振動分光法でみたチトクローム酸化酵素の反応初期過程での共役機構」第 4 1 回生体分子科学討論会 2014.6.6 九州大学西新プラザ (福岡県福岡市)

② 中島 聡・久保 稔・石上 泉・新澤-伊藤 恭子・吉川 信也・小倉 尚志「チトクローム酸化酵素の反応初期過程における共役機構の解明」第 5 2 回日本生物物理学会年会 2014.9.27 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

③ Takashi Ogura, Satoru Nakashima, Minoru Kubo, Satoru Yamaguchi, Masao Mochizuki, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, “Cooperative Structural Dynamics of Proton Pumping Elements in Cytochrome c Oxidase as Studied by Innovative Infrared Spectroscopy”, 招待講演 8th International Conference of Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-8) June 22 - 27, 2014 Istanbul, Turkey

④ 中島 聡、「振動分光法による蛋白質機能の研究 -チトクローム酸化酵素を題材に-」招待講演、第 27 回生物無機化学夏期セミナー 2014.8.30 圓教寺 (兵庫県姫路市)

⑤ Satoru Nakashima, Minoru Kubo, Satoru Yamaguchi, Takashi Ogura, Masao Mochizuki, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, “Proton Pump Mechanism of Cytochrome c Oxidase Elucidated by Highly Sensitive Time-Resolved IR Spectroscopy” 招待講演 7th International Conference of Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-7) July 2012, Jeju, Korea.

他 20 件

[その他]

ホームページ等

[http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/biophys2/biophys2\\_2013/main\\_japanese.htm](http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/biophys2/biophys2_2013/main_japanese.htm)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 聡 (NAKASHIMA, Satoru)

兵庫県立大・大学院生命理学研究科・特任准教授

研究者番号 : 80263234