

令和元年6月11日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K05393

研究課題名(和文) 新規時間分解振動分光法によるチトクローム酸化酵素のプロトンポンプ共役機構の探究

研究課題名(英文) The study on the proton pump coupling mechanism of cytochrome c oxidase by new time-resolved vibrational spectroscopy

研究代表者

中島 聡 (Nakashima, Satoru)

奈良先端科学技術大学院大学・研究推進機構・URA (チーフ)

研究者番号：80263234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：チトクローム酸化酵素(CcO)は酸素の還元反応と共役したプロトン膜間輸送を行う。この共役機構の詳細を解明するため赤外吸収分光法で酸素還元反応ダイナミクスの追跡を行った。反応の観測を可能にするフローセルシステムを完成させ、時間分解赤外測定を行って、プロトン化残基を観察することに初めて成功した。詳細な解析の結果、反応過程で、1.プロトン供給部位がまず構造変化し、2.プロトン放出サイトでプロトンの逐次的脱着と、3.プロトン貯蔵部位での構造変化が反応と同期して起こることを見出した。これはCcOにおいて、緩衝溶液中生理条件下での反応でプロトンポンプ関連残基を実時間・直接観測した世界初の例である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアが生体エネルギー工場と呼ばれるのは、その中でチトクローム酸化酵素(CcO)が呼吸した酸素で燃焼させて生命活動のエネルギー源を得ているため、地球上のほとんどの生命体にとり必須の酵素である。しかしこの酵素反応の不具合は活性酸素種を発生させ、様々な疾病(癌、心筋梗塞、脳卒中、アルツハイマー等)の根本原因となる。その不具合は、酵素の内部のほんのわずかな水素結合の違いで起こると言われていて、原子レベルでの機構解明が必須である。本研究はその酵素反応を実際に起こっている状態で直接観測することに成功したもので、こうした原因解明や、燃料電池といった環境負荷の少ないデバイスへの展開も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Cytochrome c oxidase (CcO) carries proton pumping in the membrane coupled with the reduction reaction of oxygen. In order to clarify the details of this coupling mechanism, I traced the oxygen reduction reaction dynamics with time-resolved IR (TRIR) absorption spectroscopy. For the first time, we have developed a flow cell system that allows us to observe the reaction and perform TRIR measurements to observe protonated residues. As a result of detailed analysis, in the course of the reaction, 1. The proton supply site first undergoes structural change, 2. Sequential desorption of protons at the proton release site, 3. Structural change at the proton storage site occurs synchronously with the reaction. This is the world's first example of real-time, direct observation of proton pump related residues in CcO in a buffer solution under physiological conditions.

研究分野：生体分子分光学

キーワード：チトクローム酸化酵素 プロトンポンプ共役機構 時間分解赤外分光法 時間分解共鳴ラマン分光法  
反応中間体 酸素還元反応 プロトン放出サイト ダイナミクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

チトクロム *c*酸化酵素 (CcO) はミトコンドリア内膜に存在する呼吸鎖末端酵素で、酸素を水にまで還元することでプロトン膜間輸送しプロトン勾配をつくる機能をもつ。好気性条件下で生きる全ての生物は CcO の作るプロトン勾配を利用して ATP を合成することで生命活動のエネルギー源としており、地球上のほとんどの生命体にとり必須の酵素である。この酵素反応の際に不可避免的に発生する活性酸素種は、様々な疾病 (ガン、心筋梗塞、脳卒中、アルツハイマーなど) の根本原因となる。しかし、疫学的に、優れたアミノ酸配列を持っている酵素の場合にはこうした疾病にかかる確率が低下することが知られており、酵素の反応レベルにまで降りた原子レベルダイナミクスの解明が重要であることがわかってきている。また、酸素の水素と電子を用いた還元反応と共役して、プロトン勾配形成 (電気的エネルギーの蓄積) を行う機能は燃料電池そのものであり、将来的な環境負荷の少ないエネルギー創出源デバイスの開拓への展望も視野に入る。

一方、CcO は酸素還元反応と共役して膜間でプロトンを輸送しており、原子レベルダイナミクスの解明のためには、生理条件下で酸素還元反応の進行している状態で、プロトン ( $H^+$ ) の輸送されている状態を観測する必要がある。X線構造解析は非常に有効な手段であり、構造化学的観点から CcO に関して多くの詳細な研究がなされてきている。しかしこの手法では、測定を結晶状態の試料で行う必要があり、またプロトンは (原則的には) 観測されない。他方、緩衝溶液中で、プロトンの動きを直接かつ実時間で観測できる手法としては赤外分光法がある。このため、CcO の機構解明には最も適した手法と考えられるが、赤外分光法には水の持つ非常に強い吸収のため他の本来の試料由来の信号が隠されてしまい、水溶液中での測定は極めて困難であるという欠点があった。このため、反応している実時間で緩衝溶液中 (水溶液中) の測定の可能な赤外分光システムの開発が求められている状況であった。

### 2. 研究の目的

研究代表者は新規時間分解赤外分光システムを開発し、水溶液中での CcO 反応を時間分解測定することに成功した。そこで2つの相補的な振動分光法である赤外分光システムと時間分解共鳴ラマン分光法を駆使して CcO の酸素還元反応の経時変化を調べ、それと共役したこの酵素の機能である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的とする。水溶液中の酵素反応を赤外分光法でも測定できるような反応観測用フローシステムを新たに開発して、ナノ秒からミリ秒に至る CcO の酸素還元反応を実時間で観測することを目指す。特にプロトン輸送経路上にあり、プロトンを輸送することのできるアミノ酸 (グルタミン酸・アスパラギン酸) のプロトン化状態に注目して、そのダイナミクスの解明を行う。また、基質としての配位子 (酸素) の脱着を行い、電子状態変化を通して、酸素還元反応のエネルギーを転換する中心の役割を果たすヘムの構造ダイナミクスについても解明を進める。

### 3. 研究の方法

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  $1.8\text{\AA}$  で立体構造が決定されている。(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 ( $Cu_B$ ) 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。プロトンポンプに関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  $\alpha$ -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。

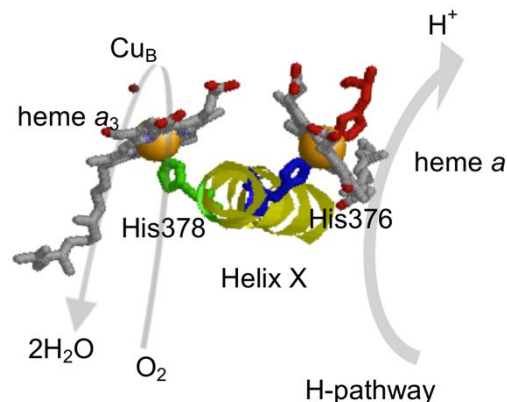


図1 CcOの活性中心の構造

したがって heme  $a_3$  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、プロトンポンプに関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。研究代表者は、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、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、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。そこで新規に開発したこの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にした。これらの振動分光法はお互いに相補的であり、それぞれ、蛋白質部分(赤外)と活性中心(ラマン)に関する情報をあたえるため、2つの振動分光法を併せて観測することで「反応」と「プロトンポンプ」の共役という極めて複雑で巧みな蛋白質機能が解明できる。

まず赤外でも測定可能なフローシステムを開発する。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、酸素輸送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する。特に既に観測できることがわかっている Asp51 と helix X に着目して、具体的な輸送経路やそれにともなう構造ダイナミクスについて明らかにする。

#### 4. 研究成果

この酸素還元反応とプロトンポンプに関して、その共役機構の詳細はいまだ明らかになっておらずその解明が最重要課題である。この共役機構を解明するために時間分解の共鳴ラマン分光法と赤外吸収分光法という振動分光法による酸素還元反応の追跡を行った。

まず、ラマン分光法では酸素のモデルとして CO を用い、その光解離過程を追跡することで還元反応サイトの配位子脱着に伴う蛋白質のダイナミクスを調べた。その結果以下の点を明らかにした。まずプロトンポンプ経路に直結したヘリックスに heme  $a_3$  が配位した残基が緩和し、続いて heme  $a_3$  の位置がシフトすることが起こる。また、このシフトはプロトンポンプ経路の水素結合状態によって影響され、プロトンが少ない状況(反応の後期過程に相当)では、シフトは小さくかつ遅く起こることがわかった。さらにかなり遅れて、heme  $a$  のヘリックスに相互作用する部位が動くことも観測された。これらのことは、反応の基質である酸素が heme  $a_3$  に配位することで、単に heme  $a_3$  の構造を変化させるだけでなく、プロトンポンプに関連したタンパク質部位にも影響を及ぼし、プロトンポンプを容易にかつ反応と共役できるように制御していることを示している。具体的には heme  $a_3$  の位置のシフトは、プロピオン酸基で起こり、そのプロピオン酸基は輸送するプロトンを蓄積していると提唱されている Water pool と相互作用しているため、heme  $a, a_3$  の位置のシフトは、プロトンの蓄積状況を判断してダイナミクスを制御していることが示唆された。プロトンポンプ経路に関して、特に出口サイトについて未だ多くの議論がなされているが、H pathway での制御を議論する上で強い証拠となった。

また赤外分光法では、酸素還元反応の観測を可能にするフローセルシステムが完成し、それを用いた時間分解可視・赤外測定を行い、プロトン化したサイトを観察できる領域を測定することに初めて成功した。こうした反応過程を実時間の赤外吸収での測定が可能になった最初の例である。この中でプロトン放出サイトなどのカルボキシル基のバンドが時間発展にともない、強度変調と波数シフトすることが見いだされた。詳細な解析を行なった結果、反応過程で、(1)プロトン供給部位がまず構造変化し、(2)プロトン放出サイトでプロトンの逐次的脱着と(3)プロトンを貯蔵している Water pool での構造変化が反応と同期して起こることを見出した。それぞれの過程が、段階的に起こっておりかつ反応中心での電荷状態と共役して起こっていることも確認できた。この成果は CcO において、緩衝溶液中生理条件下で反応を実時間でプロトンポンプ関連残基を直接観測した世界初の例である。ここで特筆すべきは、H pathway の出口サイトに位置している D51 の振る舞いである。ここでは逐次的脱着が観測されたのだが、それは P state と F state の間でプロトン化が観測されていて、反応に置ける heme  $a$  から heme  $a_3$  への電子移動に共役しているのではないかというこれまでの仮説を実証し、プロトンポンプの現場を直接観測できたことになった。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

### 原著論文

1. Yuka Kawahara-Nakagawa, Koji Nishikawa, Satoru Nakashima, Shota Inoue, Takehiro Ohta, Takashi Ogura, Yasuteru Shigeta, Katsuyuki Fukutani, Tatsuhiko Yagi, and Yoshiki Higuchi\*, “New assay method based on Raman spectroscopy for enzymes reacting with gaseous substrates”, *Protein Science*, **28**, (2019) 663-670. DOI : 10.1002/pro.3569 査読有り
2. Chen Li, Tatsuhito Nishiguchi, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, Takashi Ogura, Satoru Nakashima\*, “Performance of a time-resolved IR facility for assessment of protonation T 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”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1859**, (2018) 1045-1050. DOI : 10.1016/j.bbabi.2018.05.015 査読有り
3. Satoru Nakashima, Takashi Ogura and Teizo Kitagawa, "Infrared and Raman spectroscopic studies on the reaction mechanism of cytochrome c oxidase", *Biochim. Biophys. Acta*, **1847**, (2015) 86-97. DOI : 10.1016/j.bbabi.2014.08.002 査読有り

〔学会発表〕(計 18 件)

1. Satoru Nakashima “Proton pumping mechanism of cytochrome c oxidase by time-resolved vibrational spectroscopy” on Symposium “Developments and future of microbiology”, 第 5 6 回日本生物物理学会年会、2018年9月15 - 17日、岡山大学(招待講演)
2. Satoru Nakashima, Chen Li, Tatsuhito Nishiguchi, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, Takashi Ogura, “Proton Pumping Dynamics during Catalytic Cycle in Cytochrome c Oxidase Revealed by Time-Resolved IR Spectroscopy”, *ICPP-10* (10th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines) Munich, Germany, July 1-6 2018. (Invited)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。