

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03171

研究課題名（和文）新規時間分解計測手法を用いた呼吸系エネルギー変換機構の解明

研究課題名（英文）Time-resolved study on the respiratory energy-conversion mechanism

研究代表者

久保 稔 (Minoru, Kubo)

兵庫県立大学・理学研究科・教授

研究者番号：90392878

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：チトクロム酸化酵素は、食物をO₂によって酸化する最終段階を触媒するとともに、それによって得られるエネルギーを使ってプロトンポンプしている。これは酸素呼吸による生体エネルギー変換の要であるが、その仕組みはまだ謎のままである。本研究ではチトクロム酸化酵素のプロトンポンプ機構を原子レベルで解明することを最終目標に、この酵素の反応を光で制御する手法、及びその手法を用いて反応を追跡できる測定装置を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

呼吸と生体エネルギー発生の機構は古くから人々の興味を惹きつけてきた生命科学の中心課題の一つであるが、その本質はミトコンドリアで行われているプロトンポンプにある。しかしその機構はまだ謎のままであり、教科書にも載っていない。本研究ではこの謎に挑む研究基盤を確立した。なお、近年、チトクロム酸化酵素の活性化因子が発見されており、ミトコンドリア病の治療薬開発の観点で注目されている。チトクロム酸化酵素の機構を原子レベルで解明しさらにそれを制御することは、将来社会の健康保持・増進に寄与するであろう。

研究成果の概要（英文）：Cytochrome c oxidase catalyzes the final step of food oxidation, coupled with proton pump to store the energy. This is one of the most important steps for the respiratory energy conversion; however, its mechanism is still mystery. In this study, to elucidate the proton-pump machinery of cytochrome c oxidase at the atomic level, we have developed the method that can control the enzymatic reaction by light and the instrument that can track the reaction in real time.

研究分野：生物物理学

キーワード：チトクロム酸化酵素 動的構造生物学 時間分解測定 ケージド化合物

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

チトクロム酸化酵素は、我々が呼吸で取り入れた酸素 (O_2) を水 (H_2O) にまで還元するとともに (O_2 還元反応) それによって得られる自由エネルギーを使ってプロトンをポンプしている (図1)。この酵素は、呼吸による生体エネルギー変換の要のタンパク質の一つであるため、1920年代に発見されて以来、光合成系と並んで注目されてきた。膨大な研究の歴史がある。今では本酵素の O_2 還元反応機構は、ほぼ分かっている。しかし、プロトンポンプ機構はまだ謎のままであり、教科書にも載っていない。

ウシ由来の酵素の高分解能 X 線構造解析では、“プロトンの通り道”になりえる水素結合ネットワークが3つ発見されている (H 経路、D 経路、K 経路) (図1)。K 経路と D 経路は、 O_2 還元反応 ($O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow H_2O$) で消費される $4H^+$ の輸送経路である。一方、H 経路の役割についてはまだコンセンサスが無い。H 経路がプロトンポンプとして働く主張するグループと D 経路が (O_2 還元反応のためのプロトン輸送に加えて) プロトンポンプとして働く主張するグループが、実に 20 年以上に渡り論争を続けている。興味深い事に、H 経路は動物の酵素にのみ保存されており、植物や細菌の酵素には無い。論争の解決に向けてこれまで変異体解析も行われてきたが、変異の効果の解釈を巡って決着の方向にない。プロトンポンプ経路を同定し、プロトンポンプ機構を解明するためには、変異体ではなく天然酵素を用いて、プロトンポンプが起こる際の構造変化を原子レベルで直接観測するといった決定的な実験データが必要である。

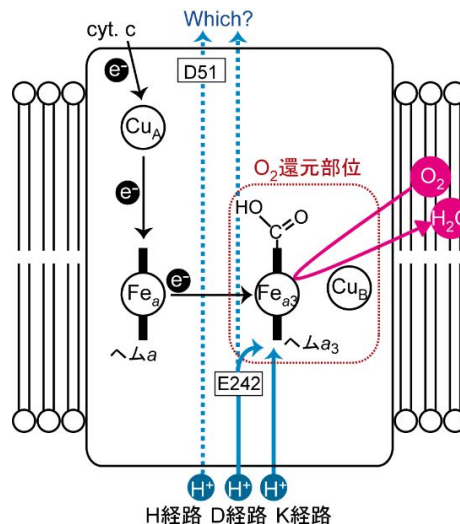


図1. チトクロム酸化酵素. O_2 還元部位はヘム鉄 (Fe_{a3}) と銅原子 (Cu_B) からなる。その他の金属部位は電子伝達を担う。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、X 線自由電子レーザー (XFEL) による時間分解結晶構造解析と時間分解赤外分光解析を組み合わせた先端的計測により、チトクロム酸化酵素のプロトンポンプ機構を原子レベルで解明することである。すなわち、時間分解結晶構造解析でプロトン輸送経路の構造変化を動画観察するとともに、時間分解赤外分光でプロトン移動を追跡する。本研究はそれらの測定に必要な手法開発・装置開発から取り掛かる。

3. 研究の方法

本研究では、ウシ心筋由来のチトクロム酸化酵素を扱う。時間分解結晶構造解析ならびに時間分解赤外分光測定では、UV 照射によって基質 O_2 を放出するケージド化合物 (ケージド O_2) をトリガーに用いる。即ち、ケージド O_2 を浸潤させた酵素試料 (結晶もしくは溶液) に UV パルス光を照射して反応を駆動し、その後の構造変化や反応過程をポンプ-プローブ法によって観測する。ケージド O_2 には、ペルオキシ $Co(III)$ 錯体を用いる。

時間分解結晶構造解析では、以前 SACLA で開発した実験装置 (*J. Synchrotron Rad.* **2017**, *24*, 1086) をベースに、嫌気条件等の必要な環境を整備して使用する。一方、時間分解赤外分光では、実験装置の開発が必要である。チトクロム酸化酵素の反応は基質 O_2 を消費するため (ケージド O_2 を消費するため) 一回一回のポンプ-プローブ測定毎に試料交換ができる装置が必要となる。本研究では赤外顕微鏡を導入し、チトクロム酸化酵素の反応を追跡できるポンプ-プローブ測定装置を開発した上で、それを適用する。

4. 研究成果

(1) ケージド O_2 の特性評価

時間分解紫外可視分光法により、まずはケージド O_2 の最適励起波長、量子効率、及び O_2 放出のタイムスケールを調べた (図2)。ポンプ光の照射には、ナノ秒波長可変 OPO レーザーを用いた。その結果、314 nm の励起波長で最も効率的に O_2 を放出し、その時の量子効率が 0.5 であることが分かった。また O_2 放出時間は 10 μs 以内であった (10 μs 以降の微細なバンド変形は光分解物の構造変化に由来)。この O_2 放出時間はチトクロム酸化酵素の反応を計測する上で十分に速い。また、ケージド O_2 の水への溶解度は 50 mM を超えることも確認された。チトクロム酸化酵素の結晶中濃度が 2 mM 程度であることを考えると、時間分解結

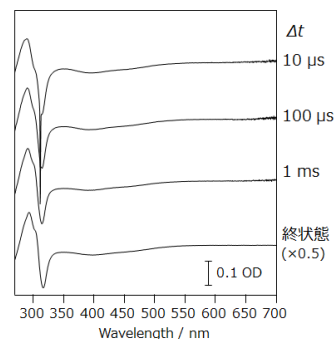


図2. UV 照射後のケージド O_2 の時間分解紫外可視差スペクトル。

晶構造解析ではケージド O₂ を 4 mM 浸潤させれば十分である。即ち、溶解度についても問題は無い。

以上、ケージド O₂ の時間分解測定トリガーとしての有用性が確認された。但し、10°C 以下、暗所で扱わないと、ケージド O₂ から O₂ がリークすることが判明し、時間分解結晶構造解析や時間分解赤外分光測定では温度コントロール・遮光条件が必須であることが分かった。また還元剤（ジチオナイト）との共存も避ける必要があり、測定プロトコルの確立も必要とされた。

(2) ケージド O₂ を用いたチトクロム酸化酵素の反応制御

チトクロム酸化酵素の反応は、ヘムの可視吸収スペクトル変化で追跡可能である。ケージド O₂ を混合したチトクロム酸化酵素（溶液）の UV 照射後の時間分解紫外可視スペクトルを図 3 に示す。測定温度は 10°C とし、反応開始時点でのチトクロム酸化酵素は完全還元型とした。Global fit でスペクトル変化を解析した結果、ケージド O₂ からの O₂ 放出後、次のように酵素反応が進行することが分かった： 時定数 27 μs で基質 O₂ がヘム a₃ に結合した A 中間体が生成（Fe³⁺-O₂⁻...Cu_B¹⁺: Tyr244-OH）、360 μs で O=O が開裂した P 中間体が生成（Fe⁴⁺=O²⁻-HO-Cu_B²⁺: Tyr244-O⁻）、480 μs で F 中間体が生成（Fe⁴⁺=O²⁻-H₂O-Cu_B²⁺: Tyr244-O⁻）、2.3 ms で O 中間体が生成（Fe³⁺-OH⁻-H₂O-Cu_B²⁺: Tyr244-O⁻）。P 中間体・F 中間体・O 中間体の遷移過程においてプロトンがポンプされるので、ケージド O₂ を用いた反応系はプロトンポンプ機構の研究に有効であることが示された。

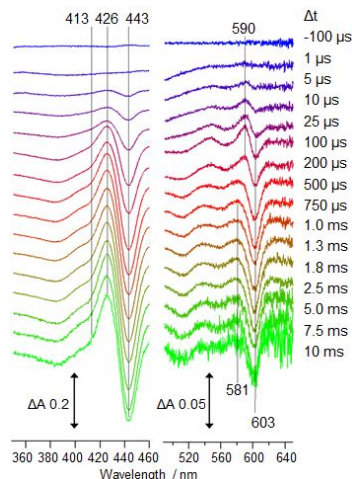


図 3. UV 照射後のチトクロム酸化酵素-ケージド O₂ 混合系の時間分解紫外可視差スペクトル。

(3) 時間分解結晶構造解析への取り組み

結晶相での反応を解析するために、ケージド O₂ を浸潤したチトクロム酸化酵素結晶の UV 照射後の時間分解紫外可視測定を試みた。試料内部の励起効率を損なわず、且つ十分な回折分解能を担保できる結晶サイズを選別した。測定セルには後述のマイクロチップを使用した。結晶相での反応を測定した結果、A 中間体と F 中間体の生成を確認することができた（その他の中間体の生成は現在確認中である）。結晶中でも反応が進行することを確認し、ケージド O₂ 濃度、励起条件、温度等の実験条件も決定した。

一方、SACLA の基盤開発もこの 3 年間で進展した。研究開始当時、SACLA での時間分解結晶構造解析では温度・嫌気環境の厳密な制御が難しかったが、それらの環境制御が可能になった。正に時間分解結晶構造解析を開始する準備が整ったと言える。

(4) 時間分解赤外分光への取り組み

時間分解 X 線結晶構造解析は、プロトンポンプ過程の構造変化を原子レベルで観測できる強力な手法であるが、プロトン移動を直接観測することは不可能である。そこで本研究では、時間分解赤外分光を使用し、時間分解結晶構造解析との相関解析を行う。但し、時間分解赤外分光をチトクロム酸化酵素に適用するためには、測定装置の開発が必要である。ケージド O₂ をトリガーに用いたポンプ-プローブ測定を実現するためには、一回の測定毎に試料交換が必要となる。

本研究では、多数の微小ウェルを集積したマイクロチップを作製し、赤外顕微鏡に導入した（図 4）。一つ一つのウェルに保持された溶液（もしくは結晶）に対して、ポンプ光を照射し、時間分解測定を実施する。チップを自動走査することで試料交換がなされる。ポンプ光には、ナノ秒波長可変 OPO レーザーを使用し、赤外光と同軸に入射した。最初の動作確認には、嫌気環境を必要としない一酸化窒素還元酵素（P450_{nor}）をモデル試料に用いた。この酵素の基質は NO なので、ケージド NO をトリガーに用いたポンプ-プローブ測定を行った。その結果、中間体の捕捉に成功し、NO 伸縮振動数の解析から反応活性種のプロトン化状態が解明された（*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2021 118, e2101481118）。本装置の威力が十分に示された。その後、嫌気環境の整備も終え、チトクロム酸化酵素の測定の準備が整った所である。プロトンポンプの過程で、H 経路にある Asp51 ($\nu_{C=O}$ 1738 cm⁻¹)、D 経路にある Glu242 ($\nu_{C=O}$ 1748 cm⁻¹) やヘムプロピオン酸 ($\nu_{C=O}$ 1676 cm⁻¹) がどう振舞うのか大いに興味を持たれる。

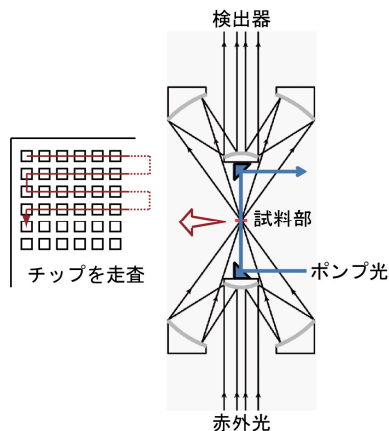


図 4. 時間分解赤外分光測定。マイクロチップを走査しながら各試料ウェルでポンプ-プローブ測定を行う。カセグレン式の対物鏡で赤外光を集光。

(6) まとめ

長年議論されてきたチトクロム酸化酵素のプロトンポンプ機構の解明という大きな目標に向けて、手法開発・基盤開発から取り掛かった。時間分解結晶構造解析・時間分解赤外分光を用いてプロトンポンプを追跡する所までは期間内に至らなかったが、それに向けた準備は十分に整えることができ、まさに期待が高まった所にある。一方、本研究で開発された基盤や手法は他の酵素にも応用可能であり、実際に一酸化窒素還元酵素(嫌気呼吸酵素)の中間体の解析に成功した。その他、ケージド O_2 は酸素添加酵素の解析にも有効であることが見出されており、多様な発展研究が見込まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nomura, T., Kimura, T., Kanematsu, Y., Yamada, D., Yamashita, K., Hirata, K., Ueno, G., Murakami, H., Hisano, T., Yamagiwa, R., Takeda, H., Gopalasingam, C., Kousaka, R., Yanagisawa, S., Shoji, O., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Takano, Y., Sugimoto, H., Tosha, T., Kubo, M., Shiro, Y.	4. 巻 118
2. 論文標題 Short-lived intermediate in N2O generation by P450 NO reductase captured by time-resolved IR spectroscopy and XFEL crystallography.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. USA	6. 最初と最後の頁 e2101481118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2101481118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shinke, T., Itoh, M., Wada, T., Morimoto, Y., Yanagisawa, S., Sugimoto, H., Kubo, M., Itoh S.	4. 巻 27
2. 論文標題 Revisiting alkane hydroxylation with m-CPBA (m-chloroperbenzoic acid) catalyzed by nickel(II) complexes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chem. Eur. J.	6. 最初と最後の頁 14730-14737
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202102532	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mikata, Y., Aono, Y., Yamamoto, C., Nakayama, H., Matsumoto, A., Kotegawa, F., Harada, M., Katano, H., Kobayashi, Y., Yanagisawa, S., Kubo, M., Kajiwar, A., Koder, M.	4. 巻 61
2. 論文標題 A synthetic model for the possible FeIV(μ-O)2 core of methane monooxygenase intermediate Q derived from a structurally characterized FeIII/FeIV(μ-O)2 complex.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Inorg. Chem.	6. 最初と最後の頁 786-790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.inorgchem.1c02699	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takeda, H., Kimura, T., Nomura, T., Horitani, M., Yokota, A., Matsubayashi, A., Ishii, S., Shiro, Y., Kubo, M., Tosha, T.	4. 巻 93
2. 論文標題 Timing of NO binding and protonation in the catalytic reaction of bacterial nitric oxide reductase as established by time-resolved spectroscopy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bull. Chem. Soc. Japan	6. 最初と最後の頁 825-833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20200038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 久保 稔	4. 巻 33
2. 論文標題 SACLA時分割結晶構造解析による動的構造生物学研究～酵素反応の可視化に向けた分子動画～.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 放射光	6. 最初と最後の頁 266-270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kokubo, Y., Wasada-Tsutsui, Y., Yomura, S., Yanagisawa, S., Kubo, M., Kugimiya, S., Kajita, Y., Ozawa, T., Masuda, H.	4. 巻 2020
2. 論文標題 Syntheses, characterizations, and crystal Structures of dinitrogen-divanadium complexes bearing triamidoamine ligands	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Eur. J. Inorg. Chem.	6. 最初と最後の頁 1456-1464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ejic.201901123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kadoya, Y., Fukui, K., Hata, M., Miyano, R., Hitomi, Y., Yanagisawa, S., Kubo, M., Kodera, M.	4. 巻 58
2. 論文標題 Oxidative DNA cleavage, formation of μ -1,1-hydroperoxo species, and cytotoxicity of dicopper(II) complex supported by a p-cresol-derived amide-tether ligand	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Inorg. Chem.	6. 最初と最後の頁 14294-14298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.inorgchem.9b02093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kotani, H., Shimomura, H., Horimoto, M., Ishizuka, T., Shiota, Y., Yoshizawa, K., Yanagisawa, S., Kawahara-Nakagawa, Y., Kubo, M., Kojima, T.	4. 巻 48
2. 論文標題 Fundamental electron-transfer and proton-coupled electron-transfer properties of Ru(IV)-oxo complexes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dalton Trans.	6. 最初と最後の頁 13154-13161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9DT02734C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kubo, M.
2. 発表標題 Time-resolved infrared and XFEL analyses of P450nor reaction intermediates using caged-substrate.
3. 学会等名 Pacifichem2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kubo, M.
2. 発表標題 Combining time-resolved XFEL crystallography with IR spectroscopy for capturing P450nor reaction intermediates.
3. 学会等名 Pacifichem2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松村和香, 柳澤幸子, 西田優也, 長尾壮将, 新谷泰範, 久保稔
2. 発表標題 Spectroscopic study on the action mechanism of Higd1a for activating cytochrome c oxidase
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桑野わ子, 長尾聡, 當舎武彦, Joshua Kyle Stanfield, 笠井千枝, 有安真也, 莊司長三, 杉本宏, 久保稔
2. 発表標題 Structure of a heme-oxy intermediate of cytochrome P450BM3 catalyzing a non-natural substrate
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会 (学生発表賞)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保稔
2. 発表標題 SACLAを用いたタンパク質の動的構造生物学
3. 学会等名 光・量子デバイス研究会 "医療・バイオ応用を目指したナノ構造・ナノ界面", 姫路・西はりま地場産業センター(兵庫県・姫路市), 2020年1月8日(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久保稔
2. 発表標題 XFELと赤外レーザーを用いた酵素反応中間体の時間分解計測
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム "フォーカスセッション：先端分光分析・計算科学を活用したバイオ関連化学最前線", 東北大学青葉山東キャンパス(宮城県・仙台市), 2019年9月5日(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 久保稔	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス(城宣嗣、青野重利、齋藤正男監修)	5. 総ページ数 472 (193-201)
3. 書名 ヘムタンパク質の科学(第1編第5章第2節「反応ダイナミクスの時間分解測定」)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------