

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21570171

研究課題名（和文）共鳴ラマン分光法によるチトクロムC酸化酵素のプロトン輸送機構の解明

研究課題名（英文）Resonance Raman Study on the Proton Pumping Mechanism of Cytochrome c Oxidase

研究代表者

小倉 尚志（OGURA TAKASHI）

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授

研究者番号：70183770

研究成果の概要（和文）：細胞呼吸を担っていて生命の維持に不可欠の膜タンパク質の一つにチトクロムC酸化酵素がある。本酵素は酸素分子を水に変換するとともにプロトン（水素イオン）を膜の内側から外側へポンプする。本酵素のしくみを明らかにするためには共鳴ラマン分光法によりピコメートルレベルの微細構造を決定する必要がある。本研究ではプロトンのポンプを効率良く行うために必要な寿命の短い中間構造と2つのヘムの協同的構造変化を検出した。さらに、プロトンポンプに関わるいくつかのヘム側鎖のラマン信号の帰属決定を行った。

研究成果の概要（英文）：Cytochrome c oxidase plays an essentially important function in cell respiration to maintain life, and catalyzes dioxygen reduction to water, which is coupled with proton pumping across the membrane. In order to elucidate the mechanism of this enzyme, high resolution structures at a picometer level are to be determined by resonance Raman spectroscopy. In the present study, we have established assignments of some Raman signals. In addition, an intermediate conformational state and cooperative dynamics of the two hemes have been detected, which are essential for an efficient proton pump.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：好気呼吸、生体エネルギー変換、チトクロムC酸化酵素、酸素還元、プロトンポンプ、共鳴ラマン、部位特異的アミノ酸置換

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系では

チトクロムC酸化酵素（CcO）が重要な働きをしている。すなわち、電子を酸素分子に渡

して水を合成する。同時にプロトンミトコンドリア内膜を横切ってポンプする。こうしてできる膜を隔てたプロトン濃度勾配が細胞内エネルギー通貨であるATP合成を駆動する。このようなプロトン濃度勾配を介するATP合成のしくみは1962年にピーター・ミッチェルによって提案されたが、それを担う膜タンパク質複合体の反応機構は未解明である。

研究開始までに、共鳴ラマン分光法によりO₂還元反応の4つの反応中間体の構造が得られていた。また、結晶構造をもとにタンパク中のプロトン輸送経路がわかっていた。しかし、酸素還元反応とプロトンポンプ反応が如何にして共役するかは不明であった。この謎を解くためには構造ダイナミクスを明らかにする必要がある。分子量が大きいためNMR分光法は使えない。最適な方法の1つは共鳴ラマン分光法であり、CcOが持つ2つのヘム(ヘムaとa₃)の構造変化を鋭敏に反映する振動スペクトルが選択的に得られる。

2. 研究の目的

CcOのヘムa₃は酸素を還元する触媒部位であり、ヘムaはその酸化還元によりプロトンポンプを駆動する。本研究の目的は、(1)ヘムa₃に結合したCOを光解離したあとのヘムおよびその近傍構造の時間変化を調べる。特に①Fe-His結合の振動数と強度、②ヘムaのビニル基の振動数の2点に注目する。また、構造ダイナミクスを追跡するために帰属を決めなければならないラマン線がある。このため、(2)ヘムaの側鎖置換基のうちプロトン輸送経路に関わっているものの信号の帰属を行う。特に以下の振動モードを調べる。①2位ヒドロキシフェルネシルエチル(HFE)基、②7位プロピオン酸基。

3. 研究の方法

(1)パルスの時間幅10 nsの緑色光(波長532.0 nm)によりCOを光解離し、遅延時間10 ns~5 ms後に同じくパルス幅10 nsの藍色光(波長435.7 nm)によりヘムの共鳴ラマンスペクトルを測定する。このようにして、タンパク質構造のCO結合型から平衡状態還元型へのダイナミクスを追跡する。なお、解離したCOの再結合は10 msで起きるので測定した遅延時間内にCOの再結合は起こらない。(2)ヘムaのHFE基のOH基や7位プロピオン酸基と水素結合しているアミノ酸に変異を導入したCcOを細菌(*Paracoccus denitrificans*)を用いて作成する。その共鳴ラマンスペクトルを測定し、野生型(WT)と比較して変化のあったラマン線の帰属を決める。①T50とS417がHFE基のOH基に近いので、それぞれT50AとT417A変異体を作成する。②Y406が7位プロピオン酸基と水素結合を形成しているためY406F変異体を作成する。

4. 研究成果

(1)CO結合型CcOのCO光解離後のヘムの構造ダイナミクスを $\Delta t = 10 \text{ ns} \sim 5 \text{ ms}$ の時間領域で共鳴ラマン分光法により追跡した。ヘムaとヘムa₃の2つのヘムの側鎖ビニル基が同じダイナミクスを示した。これは2つのヘムの協同的動きの存在を意味する。また、CO結合型が平衡状態還元型へと遷移する間の $\Delta t = 2 \mu\text{s} \sim 5 \text{ ms}$ の時間領域に中間的コンフォメーションを検出した。すなわち、ヘムa₃のFe-His伸縮振動モードの振動数は平衡状態還元型の振動数と同じ 215 cm^{-1} だが、強度は有意に低かった。Fe-His伸縮振動モードの振動数から考えてCcOのO₂に対する親和性がCO解離直後(Fe-His伸縮振動 221 cm^{-1})と比べて低いことが示唆される。つまり、O₂親和性が調節可能であることが見出された。この結果と前述の2つのヘムの協同性は、ポンプされるプロトンがプロトンポンプ部位を満たしたとき初めてO₂をヘムa₃に結合させて反応を始めることによる、効率的なプロトンポンプ機能のためのしくみであると考えられる。

(2)T50A、S417A、Y406F各変異体の可視吸収スペクトルおよび電子伝達活性を測定したところWTと比べて差がなかった。次に励起波長413.1 nmの共鳴ラマンスペクトルを還元型について測定し比較した。WTで 1251 cm^{-1} のラマン線はT50Aでは低波数シフトしたが、S417Aでは変化が検出されなかった。この結果から、 1251 cm^{-1} のラマン線をHFE基に由来すると帰属した。OH基はT50と水素結合していることがはっきりした。これは結晶構造の再検討を促す結果である。一方、WTで 364 cm^{-1} のラマン線はY406Fでは低波数シフトしたのでこれを7位のプロピオン酸基のC_βC_γC_δ変角振動に帰属した。これらの新規帰属決定はプロトンポンプ機構を解明するための強力な手掛かりを与える時間分解共鳴ラマンスペクトルを解釈するための基礎データである。

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4件)

1. Izumi Ishigami, Takeshi Nishigaki, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, Satoru Nakashima and Takashi Ogura, An intermediate conformational state during ligand binding to cytochrome c oxidase detected by time-resolved resonance Raman analyses of heme peripheral groups, *Chem. Lett.*, 2012, 2, 178-180, DOI: 10.1246/cl.2012.178.

2. Kenji Kanaori, Yusuke Tajiri, Antonio Tsuneshige, Izumi Ishigami, Takashi Ogura, Kunihiro Tajima, Saburo Neya and Takashi Yonetani, T-quaternary structure of oxy human adult hemoglobin in the presence of two allosteric effectors, L35 and IHP, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics*, 2011, 1807, 1253 - 1261, DOI:10.1016/j.bbabi.2011.06.004.
 3. Nobutaka Fujieda, Takuya Ikeda, Michiaki Murata, Sachiko Yanagisawa, Shigetoshi Aono, Kei Okubo, Satoshi Nagao, Takashi Ogura, Shun Hirota, Shunichi Fukuzumi, Yukihiro Nakamura, Yoji Hata, and Shinobu Itoh, Post-translational His-Cys Cross Linkage Formation in Tyrosinase Induced by Copper(II)-Peroxo Species, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 1180-1183, 10.1021/ja108280w.
 4. Sachiko Yanagisawa, Masaki Horitani, Hiroshi Sugimoto, Yoshitsugu Shiro, Norihiro Okada, and Takashi Ogura, Resonance Raman study on the oxygenated and the ferryl-oxo species of indoleamine 2, 3-dioxygenase during catalytic turnover, *Faraday Disc.*, 2011, 148, 239-247, DOI: 10.1039/c004552g.
- [学会発表] (計20件)
1. Takashi Ogura, Resonance Raman study on CO-bound indoleamine 2, 3-dioxygenase, The 3rd Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry, June 1, 2011, Stockey Centre, Parry Sound, Ontario, Canada.
 2. 西村 龍その他、ミオグロビンの機能調節機構の解明、第38回生体分子科学討論会、2011年6月23日、筑波大学、茨城県。
 3. 引田理英その他、共鳴ラマン分光法によるウシ心筋NADH-ユビキノン酸化還元酵素のFMNとFe-Sクラスターの構造解析、第38回生体分子科学討論会、2011年6月24日、筑波大学、茨城県。
 4. 柳澤幸子その他、共鳴ラマン分光法によるインドールアミン2,3ジオキシゲナーゼの光学異性依存的基質相互作用の検出、第38回生体分子科学討論会、2011年6月24日、筑波大学、茨城県。
 5. 中島 聡その他、チトクロム酸化酵素のリガンド解離構造ダイナミクス:新規高精度時間分解赤外分光装置を用いた追跡、第38回生体分子科学討論会、2011年6月24日、筑波大学、茨城県。
 6. 石上 泉その他、CO光解離をトリガーとしたチトクロムc酸化酵素の構造ダイナミクスの追跡、第38回生体分子科学討論会、2011年6月24日、筑波大学、茨城県。
 7. Takashi Nomura et al., Resonance Raman Study on Cytochrome c Oxidase Reconstituted in Phospholipid Vesicles, 第49回日本生物物理学会年会, 2011年9月17日, 兵庫県立大学、兵庫県。
 8. Izumi Ishigami et al., Protein Dynamics and Reaction Mechanism of Cytochrome c Oxidase: Resonance Raman Spectroscopy, 第49回日本生物物理学会年会, 2011年9月17日, 兵庫県立大学、兵庫県。
 9. Masayuki Hara et al., Resonance Raman Study on Ligand-Bound Forms of Indoleamine 2, 3-Dioxygenase, 第49回日本生物物理学会年会, 2011年9月17日, 兵庫県立大学、兵庫県。
 10. Sachiko Yanagisawa et al., Resonance Raman Study on CO-bound Indoleamine 2, 3-Dioxygenase with Tryptophan, 第49回日本生物物理学会年会, 2011年9月17日, 兵庫県立大学、兵庫県。
 11. Miyuki Sakaguchi et al., The chemical nature of the ligand at the oxygen reduction site of the resting oxidized cytochrome c oxidase, 第49回日本生物物理学会年会, 2011年9月17日, 兵庫県立大学、兵庫県。
 12. Takeshi Nishigaki et al., Protein Dynamics of Cytochrome c Oxidase upon CN⁻ Photolysis as Studied with Resonance Raman Spectroscopy, 第49回日本生物物理学会年会, 2011年9月17日, 兵庫県立大学、兵庫県。
 13. Hirohito Ishimaru et al., Resonance Raman study on the ferryl oxo hemes with imidazole as axial ligand having a bulky substituent, 第49回日本生物物理学会年会, 2011年9月17日, 兵庫県立大学、兵庫県。

- 011年9月17日、兵庫県立大学、兵庫県。
14. Masahide Hikita et al., Structural analysis of FMN and iron-sulfur clusters of bovine heart NADH-ubiquinone oxidoreductase by resonance Raman spectroscopy, 第49回日本生物物理学会年会, 2011年9月17日, 兵庫県立大学、兵庫県。
 15. 西村 龍その他、ヘム鉄の電子密度がミオグロビンの自動酸化反応に与える影響の解明、錯体化学会第61回討論会、2011年9月18日、岡山理科大学、岡山県。
 16. 久保 稔その他、水溶液中のタンパク質の高感度時間分解赤外分光測定、第5回分子科学討論会、2011年9月20日、札幌コンベンションセンター、北海道。
 17. Takashi Ogura et al., Microsecond Protein Dynamics of Cytochrome *c* Oxidase as Studied with Resonance Raman Spectroscopy, The 3rd Asian Spectroscopy Conference, November 29, 2011, Xiamen University, China.
 18. Izumi Ishigami et al., Protein Dynamics of and Reaction Mechanism of Cytochrome *c* Oxidase as Studied with Resonance Raman Spectroscopy, The 3rd Asian Spectroscopy Conference, November 30, 2011, Xiamen University, China.
 19. 久保 稔その他、フェムト秒レーザーを用いた高感度時間分解赤外分光装置の開発と蛋白質水溶液への応用、日本分光学会年次講演会、2011年12月2日、理化学研究所、神奈川県。
 20. 坂口美幸その他、チトクロム*c*酸化酵素におけるヘム*a*側鎖ヒドロキシフェルネシルエチル基の共鳴ラマン線の帰属、日本化学会第92春季年会、2012年3月27日、慶応大学、神奈川県。

[その他]

ホームページ：(研究一覧：
http://lib.laic.u-hyogo.ac.jp/laic/2/annual_list.html
<http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/GCOE/index-j.html>

市民講演会開催「ピコバイオロジー：原子レベルの生命科学」「ナノ」よりマイクロな「ピコ」、「ピコバイオロジー」ってなんだろう。第49回日本生物物理学会年会実

行委員会主催、平成23年9月19日、姫路商工会議所、兵庫県。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小倉 尚志 (Ogura Takashi)
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授
研究者番号：70183770

(2) 研究協力者

柳澤 幸子 (Yanagisawa Sachiko)
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教
研究者番号：60557982

(3) 研究協力者

中島 聡 (Nakashima Satoru)
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・特任准教授
研究者番号：80263234

(4) 研究協力者

久保 稔 (Kubo Minoru)
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・特任助教
研究者番号：90392878