

## 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 14日現在

機関番号：35302

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770154

研究課題名（和文） 水溶液中におけるチトクロム c 酸化酵素の時間分解赤外分光法

研究課題名（英文） Time resolved infrared spectroscopy of cytochrome *c* oxidase in aqueous solution.

研究代表者

山口 悟（YAMAGUCHI SATORU）

岡山理科大学・理学部・講師

研究者番号：20347529

研究成果の概要（和文）：赤外白色レーザーを光源とし、回転セルをもちいた時間分解赤外分光光度計の試作/設計を行った。赤外白色レーザーのタイミング、積算効率と S/N 比を向上させるアルゴリズムおよびアミド領域、カルボキシル領域、CO 領域における最適光路長、試料濃度の最適化を行った。その結果、チトクロム c 酸化酵素が一酸化炭素結合型 CcO の CO 光乖離後における CO の再結合によって、蛋白質骨格の高次構造変化が ns ~  $\mu$ s の時間領域でおこる事をとらえる事に成功した。

研究成果の概要（英文）：The newly developed time-resolved infrared system was constructed using fs infrared laser for a light source to investigate a proton pumping mechanism of cytochrome *c* oxidase (CcO). The function of the O<sub>2</sub> reduction site using CO as an analogue of O<sub>2</sub> was investigated by this new system which is capable of analyzing CcO in H<sub>2</sub>O solution. The results indicate the existence of a conformational relay system which plays a key role in connecting the Cu<sub>B</sub> site and the water channel for efficient collection of protons being pumped. It was found that transient CO-binding to Cu<sub>B</sub>, after Fe<sub>a3</sub>-CO photolysis, opens the water-channel.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：膜蛋白質・生体エネルギー・赤外分光・プロトンポンプ

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは細胞内にある小さな器官で、呼吸によって生命活動に必要なエネルギー

を ATP という形で生成する。いわば「細胞内発電所」とも言うべき役割を持つ。各細胞にミトコンドリアは 300~400 個存在する

ので、人体全体では $10^{16}$ 個にも達する。

呼吸鎖電子伝達系は真核生物ではミトコンドリア内膜中に存在し、Complex I, II, III, IV と呼ばれる 4 つの膜タンパク質超分子複合体によって構成されている。電子 $e^-$ はミトコンドリアマトリックスのクエン酸回路で合成されたニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (nicotinamide adenine dinucleotide:NADH) もしくはコハク酸の酸化によって供与される。その後、呼吸鎖電子伝達系の酸化還元中心の還元電位勾配に従って NADH、Complex I、Complex III、Complex IV、酸素、またはコハク酸、Complex II、Complex III、Complex IV、酸素の順に電子伝達される。電子伝達に伴い放出されるエネルギーは膜を介したプロトンの電気化学ポテンシャルエネルギーに変換される。この電気化学ポテンシャルエネルギーは Complex V によって「生体のエネルギー通貨」と呼ばれる ATP 合成に使われる他に物質輸送、細胞運動など様々な生命維持活動に利用される。

Complex IV はチトクロム *c* 酸化酵素と呼ばれ、原核生物から真核生物まで普遍的に保持されている。その機能は呼吸鎖電子伝達系の末端酵素として分子状酵素を水にまで還元する役割を持つ。この時、それと共役してプロトンはミトコンドリア内膜の内側 (マトリクス側) から、電子は外側 (膜間腔側) に存在するチトクロム *c* からとり込まれるため、膜電位が内膜に生ずる。酸素還元反応とプロトン電気化学ポテンシャルのエネルギー変換効率はチトクロム *c* 酸化酵素においては約 70% にもなると考えられている。このエネルギー変換のメカニズムに関する物理化学的理解は古くからの生体エネルギー学分野における中心的な研究課題となっている。

ウシ心筋由来のチトクロム *c* 酸化酵素は、13 種のサブユニットからなる分子量が約 20 万の膜タンパク質である。この一連の反応には 4 ケ所の活性中心、CuA、CuB、 $\text{h}\mu\text{a}$ 、 $\text{h}\mu\text{a}_3$  を持ち、 $\text{h}\mu\text{a}_3$  と CuB の部位で酸素の還元反応が起きる。他に亜鉛やマグネシウムを金属中心として持っている。

ウシ心筋由来のチトクロム *c* 酸化酵素の立体構造は吉川 (兵庫県立大)-月原 (大阪大、(現 兵庫県立大)) らのグループによって X 線結晶構造解析から明らかにされた (Yoshikawa et. al., Science, 1998, 280, 1723-1729)。しかし、静的な立体構造では機能が予測できるもののような反応メカニズムで酸化還元反応が起こるのか? またどのようなメカニズムでプロトンポンプ機構が起こるのか? といった疑問は想像の域を出ない。この X 線結晶構造解析の酸化型と還元型の結果を詳細に検討した結果、51 番目のアスパラギン酸の側鎖カルボキシル基が構造変化を起こしていることが明らか

になり、このアミノ酸残基がプロトンポンプ機構に関与していると推定された (Yoshikawa et. al., PNAS, 2003, 26, 15304-15309)。

## 2. 研究の目的

プロトンポンプ機構を科学的に解明するためには 51 番目のアスパラギン酸の側鎖カルボキシル基の変化を観測し、その時の構造を決定する必要がある。これまでに時間分解共鳴ラマン分光法を用いて蛋白質の時間軸に沿った構造解析が行われてきた (Ogura and Kitagawa BBA, 2004, 1655, 290-297)。しかし、可視吸収をもたないアミノ酸残基の構造解析には共鳴ラマン分光法は利用できない。一般にこのような系の研究には赤外吸収分光法が利用され、報告例も多数存在する。しかしそれらは静的な条件での結果である。また一般に蛋白質の赤外分光法では巨大な水のバックグラウンドがあるために微小な蛋白質の信号を検出することは極めて難しい。極力水分を減らすために蛋白質を乾燥させ、ドライフィルムにした後に数  $\mu\text{l}$  の水を加えて水和した試料などを用いるのが常である。さらに光路長を数  $\mu\text{m}$  に設定し、徹底的に水の影響を減らす努力が行われる。このような測定法は酵素反応時に起きるアミノ酸側鎖の構造解析には用いる事はできない。

研究代表者はこれまでの研究で MCT 一次元検出器を用いて赤外分光装置を試作設計した。一酸化炭素 (CO) 結合型チトクロム *c* 酸化酵素中に存在する単一の  $\text{Fe}_{a_3}$ -CO 伸縮振動モードの検出と一酸化炭素の再結合過程の時間分解測定に成功している。そこでこの赤外分光光度計に赤外白色レーザーを組み合わせた赤外分光光度計の試作/設計を行い、 $\text{C}\alpha\text{O}$  の酸化/還元赤外差スペクトルから 51 番目のアスパラギン酸の側鎖カルボキシル基の検出にも成功している。これを発展させて時間分解赤外分光装置を作製する。そして 51 番目のアスパラギン酸の側鎖カルボキシル基の時間変化を追跡し、プロトンポンプの解明を行う。

## 3. 研究の方法

生体高分子の構造解析には X 線結晶構造解析法もしくは NMR 分光法が用いられるのが一般的である。しかし、これらの手法は時間軸に沿った分子構造変化の追跡は不得手である。赤外分光法はこの問題に対して可能性を持つ方法の一つである。これまで水溶液中の蛋白質に適用できる高感度且つ高精度の赤外分光装置は開発されてこなかった。なぜなら蛋白質の構造を反映するアミドバンドが観測される中赤外領域で十分な強度を持つ安定な赤外光源と巨大な水のバックグラウンドに埋もれた微小な蛋白質由来の信号を

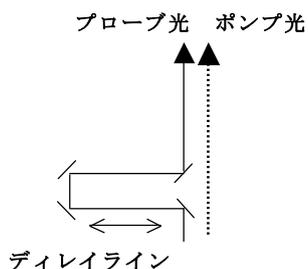
検出できるシステムが存在しなかったことが大きな理由である。研究代表者はこれまでにMCT一次元検出器とグローバーを光源として用いて新規赤外分光装置を試作設計し、一酸化炭素結合型チトクロムc酸化酵素中に存在する単一の $Fe_{a3}$ -CO伸縮振動モードの検出とCOの再結合過程の時間分解測定に成功している。本研究課題では、現有の装置に赤外レーザーを光源として用いる改良を加え、フェムト秒( $10^{-15}$ )～ミリ秒( $10^{-3}$ )にいたるまでの時間領域で蛋白質の時間分解赤外スペクトル測定を可能とする高感度時間分解赤外分光装置を完成させる。

まず現有の赤外分光光度計にフェムト秒赤外白色レーザーを組み合わせて高感度赤外分光装置を試作し、フェムト秒( $10^{-15}$ )～ミリ秒( $10^{-3}$ )の時間分解測定が行えるように装置のさらなる発展/改良を行う。

時間分解測定は基本的にポンプ(可視光・反応開始)/プローブ(フェムト秒赤外白色レーザー・検出)法で行う。まずチトクロムc酸化酵素に反応阻害剤である一酸化炭素をあらかじめ結合させておく。これをCO結合型チトクロムc酸化酵素と呼ぶ。次に酵素で飽和した緩衝液と十分に混合する。この溶液にポンプ光(590 nmの可視光)を照射すると先に結合している一酸化炭素が光乖離する。酵素は一酸化炭素より1000倍親和性が高いので一酸化炭素が光乖離した瞬間に酵素がチトクロムc酸化酵素と反応する。ちょうど一酸化炭素と酵素が入れ替わった形となり酵素反応が開始される。ある1つの方法でフェムト秒( $10^{-15}$ )～ミリ秒( $10^{-3}$ )の全時間領域をカバーすることは不可能である。そこでそれぞれの時間領域に合わせた3つの方法を組み合わせて時間分解能を達成する。

(1)フェムト秒( $10^{-15}$ 秒)～ピコ秒( $10^{-12}$ 秒)領域

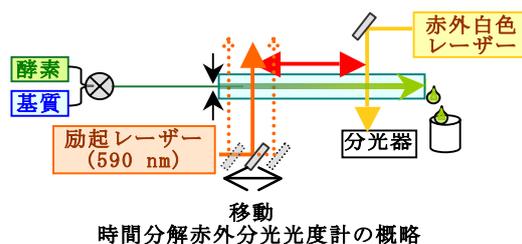
ポンプ光(反応開始の光)とプローブ光(検出する為の光)の同期を取り、同時にレーザーをパルス発信させる。光速は秒速30万キロメートル( $3 \times 10^8$  m/s)であるので、プローブ光の光学距離を1 mmだけ長くすると、プローブ光はポンプ光に比べて3.3 fs遅れて試料に照射される。プローブ光の光路の一部にディレイラインを挿入し、光路長を調節することで希望の遅延時間を設定することが出来る。



(2)ナノ秒( $10^{-9}$ 秒)～マイクロ秒( $10^{-6}$ 秒)領域  
ポンプ光(反応開始の光)とプローブ光(検出する為の光)のレーザーパルスのタイミングをコントロールするために外部からトリガーをかけて電氣的にパルスの同期を行う。外部トリガーはStanford Research Systems社のDG535型デジタルディレイジェネレータを用いる。

(3)マイクロ秒( $10^{-3}$ 秒)～ミリ秒( $10^{-3}$ 秒)領域

CO結合型チトクロムc酸化酵素と酵素飽和緩衝液をステップモーターを用いたシリジポンプを用いてマイクロミキサーで混合する。Stanford Research Systems社のDG535型デジタルディレイジェネレータを用いてシリジポンプ、励起レーザー、赤外白色レーザーの同期をとる。細い流路中に混合液を流



し、マイクロミキサーで上流で反応開始のポンプ光を照射し、下流でプローブ光を照射する。流路における二つのレーザーパルスの照射場所の距離で時間分解を達成する。流速、励起レーザーと赤外白色レーザーの距離を変化させることで時間分解能を行う。

どの時間領域においても注目する信号は51番目のアスパラギン酸の側鎖カルボキシル基である。この信号の時間分解測定を行う。小倉らの共鳴ラマンの研究から $10^{-3}$ 秒～ $10^{-3}$ 領域が重要と考えられる(Ogura and Kitagawa BBA, 2004, 1655, 290-297)。

プロトン放出基の一つと推定されているAsp51側鎖カルボキシル基のプロトンが酵素還元反応の「どの時点」で移動し、プロトンがポンプされるのかを明らかにする。静的な赤外吸収スペクトルにおいて $1738\text{cm}^{-1}$ に観測させる信号はプロトン化型のAsp51の側鎖カルボキシル基に帰属されている。この $1738\text{cm}^{-1}$ の信号に着目する。酵素還元反応開始後の時間を変化させて赤外スペクトルの測定を行う。酵素反応開始直後を $t=0$ として時間軸にそって時間分解赤外スペクトルの測定を行う。得られたスペクトルにおいて「Asp51のプロトン化型側鎖カルボキシル基」つまり「 $1738\text{cm}^{-1}$ の信号」の時間変化を解析する。脱プロトン化するとこの信号は消滅するので反応開始後いつプロトンがポンプされるのかがわかる。チトクロムc酸化酵素の $O_2$ 還元反応にはOxygenated、Perferryl、Ferryl、Hydroxyなどの中間体を形成することが共鳴

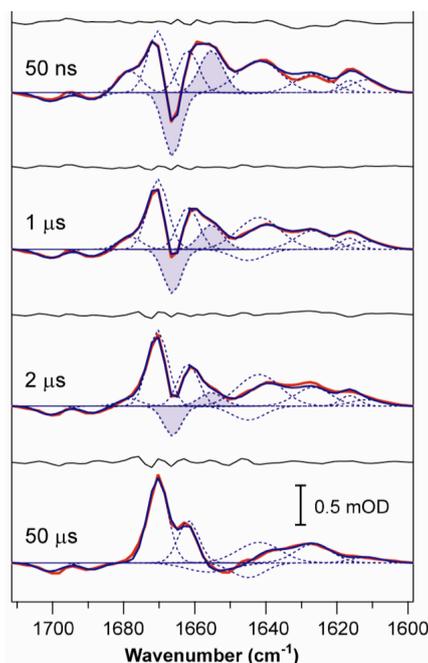
ラマン分光法により明らかにされている (Ogura and Kitagawa BBA, 2004, 1655, 290-297) ので、プロトンの移動がどの中間体の生成と減衰に共役しているのかを明らかにする。

チトクロム c 酸化酵素は本来ミトコンドリア内膜中に存在する膜内在性蛋白質である。研究代表者の所属する研究室では一つのベシクルにチトクロム c 酸化酵素一分子を向きをそろえて再構成する技術をすでに確立している。チトクロム c 酸化酵素再構成ベシクル (COV) を用いてポンプ機構と  $\Delta$ pH および膜電位の相互作用の効果を明らかにすることを次のステップとする。

#### 4. 研究成果

まず最初に赤外白色レーザーを光源とし、これまでに時間分解共鳴ラマン分光法で実績がある回転セルをもちいた時間分解赤外分光光度計の試作/設計を行った。反応開始に用いる励起光と反応検出に用いる赤外白色レーザーのタイミングは Stanford Research Systems 社の DG535 型デジタルディレイジェネレータを用いて電氣的に同期させた。分散型分光器を使用したのでスペクトルを掃引するためにはグレーティングを回転させる必要があった。そこで分光器にステッピングモーターを取り付け、励起、検出パルスに同期出来るようにした。さらに、積算効率、S/N 比を向上させるためにこれらすべてを同期させ、自動測定を可能とするプログラムのアルゴリズムを刷新した。これによりこれまで一つ一つ手作業で行なってきた作業が全て自動で行えるようになった。アミド領域、カルボキシル領域、CO 領域における最適光路長、試料濃度をそれぞれ決定した。また、一回の測定位は試料調製から測定終了に 30 時間を要したが、実験における全ての手順、方法を見直し 20 時間ほどで終了するように最適化を行った。その結果、蛋白質へのダメージ、レーザーの時間安定性が格段に向上し、質の高い時間分解赤外スペクトルが測定できるようになった。その結果、一酸化炭素結合型チトクロム c 酸化酵素の CO 光乖離後における CO の再結合によって、蛋白質骨格の高次構造変化が ns $\sim$  $\mu$ s の時間領域でおこる事を時間分解赤外分光法でとらえる事に初めて成功した。Fe<sub>a3</sub>-CO 光解離後のナノ秒領域の時間分解赤外スペクトルを解析すると、382 番目のセリン残基の bulge 構造を変化させることでウォーターチャンネルの開閉が可能となり、過渡的に一酸化炭素が CuB に結合することが明らかになった。これらの結果は、CuB、O<sub>2</sub>、Fe<sub>a3</sub> と Ser382 に伸びる 2 本の  $\alpha$ -ヘリックスを含む水素結合ネットワークがシステムのプロトン化状態を感知し、プロトン収集と反応と同期した水チャンネルの開鎖を可能にするにすることが示唆された。この一

酸化炭素再結合過程は酵素が本来酸素と結合する反応を模倣していると考えられている。この結果は X 線結晶構造解析の結果と照らし合わせるにより、主鎖の水素結合の架け替えが起きている事を示唆している。



アミド領域における ns $\sim$  $\mu$ s の時間分解赤外スペクトル

#### 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)

[学会発表] (計 2 件)

① Minoru Kubo, Satoru Yamaguchi, Masao Mochizuki, Shinua Yoshikawa, Takashi Ogura, Satoru Nakashima  
Femtosecond-Laser-Based Highly-Sensitive Time-Resolved IR Spectrometer for Studying Enzyme Reactions under Physiological Conditions  
第 48 回日本生物物理学会年会、平成 22 年 9 月 20 日 $\sim$ 22 日、宮城県

② 久保 稔、山口 悟、望月正雄、吉川信也、小倉尚志、中島 聡  
高輝度フェムト秒レーザーを用いた時間分解赤外分光装置の開発  
分子科学討論会 2010、平成 22 年 9 月 14 日 $\sim$ 17 日、大阪府

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 悟 (YAMAGUCHI SATORU)  
岡山理科大学・理学部・講師  
研究者番号：20347529