

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：24506

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770152

研究課題名(和文)チトクロム酸化酵素反応機構全容の解明を目指す反応中間体の吸収スペクトルの決定

研究課題名(英文) Determination of absorption spectra of reaction intermediates to fully understand the reaction mechanism of cytochrome oxidase

研究代表者

柳澤 幸子 (YANAGISAWA, SACHIKO)

兵庫県立大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：60557982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは体の中で、食べたご飯を分解して電子を取り出し、この電子を酸素に渡して水にまで還元する。この酸素還元反応は、チトクロム酸化酵素が行い、それはプロトンポンプと共役している。生命現象そのものと言えるこれらの反応の共役機構は未だ不明で、解明するために種々の構造化学的手法による研究が行われている。それらの結果を有機的に結びつけて解釈するための基準となる「吸収スペクトル」を測定するための準備が整った。

研究成果の概要(英文)：We isolate electrons from food by digestion and transfer them to dioxygen, generating water molecules. This oxygen reduction reaction is catalyzed by cytochrome oxidase and coupled with proton pumping reaction. The coupling mechanism of these two reactions is still unknown and is investigated by various structural chemical techniques. To understand the mechanisms we need to link all those results in logical manner with a clear benchmark. Absorption spectra of those intermediates can be benchmarks and it is now ready to measure those of intermediates.

研究分野：生物学分野

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：金属タンパク質 生体エネルギー変換 振動分光法 酸素活性化

1. 研究開始当初の背景

チトクロム酸化酵素(CcO)はミトコンドリア内膜にある呼吸鎖電子伝達系末端において酸素分子を水にまで還元するとともに、プロトン膜の内側から外側へと能動輸送する。これら二つの反応の共役機構は不明である。CcOによって生成したプロトン濃度勾配はATP合成に不可欠であり、70~90%とも言われる効率の良いエネルギー変換機構の解明は、生体エネルギー分野の重要な課題である。CcOは4つの酸化還元中心をもち、電子供与体であるチトクロムcから受け取った電子は、Cu_A、ヘムaを経て酸素還元部位であるヘムa₃、Cu_B二核中心へと運ばれる。ウシ心筋由来CcOは13のサブユニットから成る巨大な膜タンパク質であるが、1995年に分解能2.8ÅのX線結晶構造が初めて報告されて以来(Tsukihara T. *et al.* Science, 269, 1069-1074, 1995)、分解能を高める努力が続けられ、現在では分解能1.8Åまで精度が高められている(Tsukihara T. *et al.* PNAS, 100, 15304-15309, 2003)。一方、CcOによる酸素還元反応過程の各段階について、X線結晶構造の報告に先立つ1990年代初頭から、時間分解可視共鳴ラマン分光法を用い、ヘムa₃とそこに配位した酸素の結合に由来するラマンバンドを元に同定された(Ogura T. *et al.* JACS, 112, 5630-5631, 1990 他)。すなわち、ヘムa₃において $\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} - \text{O}_2^- \rightarrow \text{Fe}^{5+} = \text{O}^{2-} \rightarrow \text{Fe}^{4+} = \text{O}^{2-} \rightarrow \text{Fe}^{3+} - \text{OH}^-$ のように酸素が還元されるのである。また、プロトンポンプについては、酸素還元反応に使われるプロトンの経路としてK-およびD-経路がミュータントを用いた実験から明らかにされた。X線結晶構造を元に提唱されているH-経路(Tsukihara T. *et al.* 2003)は、哺乳類のCcOにのみ見いだされる事と、前例のないペプチド結合を介する事から当初受け入れられなかったが、ミュータントを用いた実験はそれを支持する結果であった(Shimokata K. *et al.* PNAS, 104, 4200-4205, 2007)。また、プロトンの能動輸送がどのタイミングで起きるのかについて、CcOを人工リン脂質二重膜に取り込んだCOVを用い、反応サイクル中ではなく、人工的に反応中間体を模した状態を作り出して膜外の水素イオン濃度や電位の変化を検出する形で示されてきた(Verkhovskiy M. I. *et al.* BBA, 1757, 401-407, 2006 他)。これらの研究成果としていくつかの「CcO反応サイクルモデル」が提唱されているが実証はされておらず、酸素還元反応とプロトンポンプの共役機構は未だ不明である。また、CcOは元来ミトコンドリア内膜に有り膜電位存在下で機能している。膜電位の有無により活性が制御されている事は知られているが、その機構は不明である。

インドールアミン2,3 ジオキシゲナーゼ(IDO)は、ヘムを活性中心に持つ二原子酸素添加酵素で、ヒトにおいてトリプトファンの

主要な代謝経路の最初の反応を触媒している。免疫抑制に関与している事が知られており、IDOの阻害剤が癌の治療薬になると期待されている。反応中間体の配位構造が報告されたものの反応機構全容は不明である。CcOとは異なり、二原子酸素添加反応以外の機能の報告はないが、基質阻害の性質が有る事、生理的に重要な酵素であるにもかかわらず酵素反応が遅い事等から、酵素反応中に比較的大きな構造変化を伴うと考えられ、酸素を基質とする点がCcOと共通するだけでなく、構造ダイナミクスに着目した研究が反応機構の解明に必要であることもCcOの反応機構研究と共通している。

2. 研究の目的

呼吸鎖電子伝達系末端において、酸素分子を水にまで還元する反応と共役してプロトン膜の内側から外側へと能動輸送するCcOの、酸素還元反応とプロトン輸送反応、およびそれらの共役の仕組みを解明する。このためには種々の構造化学的手法によるアプローチが不可欠で、結晶構造解析、赤外分光法、可視共鳴ラマン分光法、紫外共鳴ラマン分光法、理論計算等を用い構造ダイナミクス研究が多角的に進められている。これらの種々の実験手法は実験条件が異なるため、反応の速度定数が異なる。そのため、それぞれの手法で検出している状態が反応のどの段階であるのかを知る必要が有る。CcOの酸素還元反応中心における反応中間体構造が可視共鳴ラマン分光法により既に明らかにされているが、本研究ではそれらについて吸収スペクトルを確定する事を目的とする。吸収スペクトルの測定は他の手法と組み合わせる事が容易であるため、種々の手法において同時に吸収スペクトルを測定し、酸素還元反応のどの段階を検出しているのかを知る基準とする。このことは種々の手法による構造ダイナミクス研究の結果を有機的に繋ぎ合わせて解釈し、酸素還元反応とプロトン輸送反応の共役機構を明らかにする上で必須と言える。また、CcOを脂質二重膜に再構成したCOVではミトコンドリア内膜と同様に膜電位を作り出す事が可能であり、膜電位存在下におけるCcOの構造情報を得、膜電位がCcOの機能に及ぼす影響を調べる。IDOについては基質結合が酵素の構造に及ぼす影響を調べる。

3. 研究の方法

CcOの反応中間体の吸収スペクトルを決定する上で酵素反応追跡用人工心肺装置の使用が必要である。理由は、各反応中間体は可視共鳴ラマン分光法によってのみ検出可能な酸素還元中心(ヘムa₃)の配位構造によって決まるからである。すなわち、時間分解可視共鳴ラマン分光法によりウシ心筋由来CcOの

酸素還元反応を追跡し、同時刻の吸収スペクトルを測定する事により CcO の反応中間体の吸収スペクトルを決定する。反応中間体の配位構造を共鳴ラマン分光法で決定するためには、数分から 10 分程度以上の共鳴ラマン光の積算時間が必要で、それだけの長い時間の積算を、酵素反応開始から種々の時刻においてそれぞれ測定する事を可能にするためには、循環式で繰り返し測定が可能な酵素反応追跡用人工心肺装置が必須なのである。この装置を用いない場合には人工心肺装置を使う場合の少なくとも 25 倍以上の酵素量が必要となる。酵素反応追跡用人工心肺装置を用い、酸素存在下で CO 結合型 CcO に 590 nm のレーザー光を照射して CO を光解離して酸素還元反応を開始する。ラマン検出用レーザー光と同軸に吸収スペクトル測定用白色光を重ね、CO 光解離による酸素還元反応の開始後同時刻においてラマンスペクトルと吸収スペクトルを測定する。人工心肺装置は約 100 mL の酵素溶液が循環する過程で溶液を循環させる心臓部（ポンプ）、溶液中の酸素を取り除く酸素除去部、CO をとけ込ませる CO 肺、酸素を溶込ませる酸素肺、そして反応を開始、検出するセル部分を通過する。これらを連結しているため酸素の混入による自発的な反応の開始を防ぐために様々な工夫が必要になる。本研究では、反応開始を制御し、質の良いラマンスペクトルを得る為に人工心肺装置の改良、スペクトルを測定するための光源の検討、十分な強度を保持してサンプル測定点に光を導くための光学系の確立を行った。また、COV 中の CcO の機能解析のために、プロトンの漏れの少ない質の良い COV の調製法を確立し可視共鳴ラマンスペクトル測定を行った。さらに、酵素反応追跡用人工心肺装置を用いた実験の予備実験として種々の pH における静状態の還元型 CcO の可視共鳴ラマンスペクトル測定も行った。IDO については、種々の基質が結合したときの酵素の構造変化を調べるために、可視共鳴ラマンスペクトルを測定した。

4. 研究成果

酵素反応中の CcO について質の良いラマンスペクトルを得るためには再現性の高いスペクトルを常に得る必要があり、酸素肺の改良を行った。すなわち、 $^{16}\text{O}_2$ または $^{18}\text{O}_2$ を溶液中に溶かす酸素肺の形を精度良く揃え、また、酸素との混合から反応開始までの時間が短くなるようにデザインを改良した。これにより、反応開始までに酸素と CO が自然に置き換わる事を防ぐ事が出来、反応開始からの遅延時間に対する誤差を小さくし、再現性良く同時刻のスペクトルを得られるようになった。また、共鳴ラマンスペクトルを測定する上で CcO の中間体を最も良く検出する波長が 423 nm である事が報告されているが、この波長を安定に発振するレーザーは

まれである。そのため、いくつかのレーザー（固体レーザー、赤外レーザーの倍波を使うシステム）について検討した。この結果、位置、波長、強度について十分長い時間安定に発振するレーザーは見いだせなかった。しかしながら、赤外レーザーの倍波を使うシステムについて、今後工夫すれば希望する波長を波長に関して安定にかつ強い強度を持って得られる事が示唆された。これは、一般のガスレーザーと共通する性質なので、測定方法を工夫する事で、解決できると考えられる。また、共鳴ラマンスペクトルと同時に吸収を測るために強度が十分に有り、かつ広い波長領域を持つ光源が必要であるが、これについて Xe ランプを使用し、光学系に用いるミラーを広帯域用にする事で、ラマン測定用レーザーと吸収測定用白色光をともに強度を保持したままサンプル点まで導く事が出来た。これにより大変質の高い吸収スペクトルの測定が可能になった。残念ながら、反応中間体の吸収スペクトルを決定するには至らなかったが、測定するための準備はほぼ整ったと言える。時間分解結晶構造解析や赤外分光解析がいよいよ現実味を帯びて来た今、まさに反応中間体の吸収スペクトルの決定は必須と言える。

COV については、その調製方法は既に報告されていたが、ラマンスペクトル測定の際にレーザー光による損傷が無視できない程度である事が判明した。このため調製方法を見直し、界面活性剤の取り除きを丁寧に行う事でレーザー耐性を持つ質の高い COV を調製する事に成功した。この COV について、膜電位が有るときとないときの電子伝達反応を共鳴ラマン分光法により調べたところ、膜電位があると 2 つのヘムのうち酸素還元中心であるヘム a_3 の還元が非常に遅くなる事が判明した。また、酵素反応追跡用人工心肺装置を用いた実験の予備実験として CcO 溶液の pH を変えて共鳴ラマンスペクトルを測定したところ、pH 8-9 の間で、酸素還元中心において酸素の反対側の軸配位子である His と Fe との伸縮振動（Fe-His 伸縮振動）に由来するラマンバンドが二本存在する事が示唆された。pH が高い時振動数が高い方のバンドが弱くなった。これらは、酸素還元中心がプロトン濃度を検知する事を意味するが、酸素還元反応とプロトンポンプの共役機構についての構造ダイナミクス研究に指針を与える結果と言える。

IDO に関しては異なる基質が結合するとヘム及びヘム側鎖の構造に違いが生じることが見いだされた。またヘムを挟んで基質結合部位の反対側にある His 軸配位子と鉄との結合にも影響が有る事がわかった。基質はヘムに直接結合しない事から、基質の結合によるタンパク質の構造変化がタンパク質とヘムとの相互作用に影響を及ぼし、反応性を制御する可能性が示唆された。特に、ヘム側鎖の構造は反応中間体ごとに異なっている事

がわかっているのです、反応中間体ごとに異なる中間生成物の構造が反応性を制御するいわゆる誘導適合が随時行われている可能性が見いだされた。この事は今後の反応機構研究に示唆を与えるものである。

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 5 件)

1. Sachiko Yanagisawa, Masayuki Hara, Hiroshi Sugimoto, Yoshitsugu Shiro and Takashi Ogura ‘Resonance Raman Study on Indoleamine 2,3-Dioxygenase: Control of Reactivity by Substrate-Binding,’ *Chem. Phys.*, [査読あり] 2013, 419, 178-183.
2. Ari Dwi Nugraheni, Satoshi Nagao, Sachiko Yanagisawa, Takashi Ogura and Shun Hirota ‘Interaction of dimeric horse cytochrome *c* with cyanide ion,’ *J. Biol. Inorg. Chem.*, [査読あり] 2013, 18, 383-390.
3. Zhiqi Cong, Sachiko Yanagisawa, Takuya Kurahashi, Takashi Ogura, Satoru Nakashima and Hiroshi Fujii ‘Synthesis, Characterization, and Reactivity of Hypochlorito-Iron(III) Porphyrin Complexes,’ *J. Am. Chem. Soc.*, [査読あり] 2012, 134, 20617-20620.
4. Stefano Monari, Gianantonio Battistuzzi, Carlo A. Bortolotti, Sachiko Yanagisawa, Katsuko Sato, Chan Li, Isabelle Salard, Dorota Kostrz, Marco Borsari, Antonio Ranieri, Christopher Dennison, and Marco Sola ‘Understanding the Mechanism of Short-Range Electron Transfer Using an Immobilized Cupredoxin.’ *J. Am. Chem. Soc.*, [査読あり] 2012, 134, 11848-11851.
5. Rita Guzzi, Luigi Sportelli, Sachiko Yanagisawa, Chan Li, Dorota Kostrz, Christopher Dennison ‘The influence of active site loop mutations on the thermal stability of azurin from *Pseudomonas aeruginosa*,’ [査読あり] *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2012, 521, 18-23.

[学会発表] (計 11 件)

1. 柳澤幸子、原雅行、杉本宏、城宜嗣、小倉尚志「基質結合型インドールアミン 2,3 ジオキシゲナーゼの基質の検出-紫外共鳴ラマン分光法」第 40 回生体分子科学討論会、2013 年 6 月 7、8 日、大阪、大阪大学吹田キャンパス
2. Sachiko Yanagisawa, Masayuki Hara,

- Hiroshi Sugimoto, Yoshitsugu Shiro and Takashi Ogura ‘Detection of tryptophan as bound substrate in indoleamine 2,3-dioxygenase’ 4th Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry, 2013 年 5 月 21 日~25 日、Ontario, Canada (招待講演)
3. 柳澤幸子、原 雅行、杉本 宏、城 宜嗣、小倉尚志「インドールアミン 2,3 ジオキシゲナーゼの共鳴ラマンスペクトル: 基質結合による反応性の調節」日本化学会第 93 春季年会、2013 年 3 月 22~25 日、滋賀県、立命館大学 くさつ・びわこキャンパス
4. Sachiko Yanagisawa, Hiroshi Fujii, Saburo Neya, Takashi Ogura and Teizo Kitagawa, “Effects of Heme Rotation around the Heme Normal by 90° on Resonance Raman Spectra of Heme Proteins; Observation for Heme Oxygenase” 「へみをへム垂線のまわりに 90° 回転した時の共鳴ラマンスペクトル変化: へムオキシゲナーゼ」 第 50 回生物物理学会年会、2012 年 9 月 22~24 日、名古屋、名古屋大学東山キャンパス
5. Sachiko Yanagisawa, Hiroshi Fujii, Saburo Neya, Takashi Ogura, and Teizo Kitagawa “Effects of Heme Rotation around the Heme Normal by 90° on Resonance Raman Spectra of Heme Proteins; Observation for Heme Oxygenase,” ICORS 2012, 2012 年 8 月 12~17 日、インド・バンガロール (招待講演)
6. Sachiko Yanagisawa, Masayuki Hara, Hiroshi Sugimoto, Yoshitsugu Shiro and Takashi Ogura “Dioxygenation reaction of indoleamine 2,3-dioxygenase as studied by resonance Raman spectroscopy,” ICPP-7, 2012 年 7 月 1 日~6 日、韓国・チェジュ島 (招待講演)
7. 柳澤 幸子、原 雅行、杉本 宏、城 宜嗣、小倉 尚志「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反応機構の研究」第 39 回生体分子科学討論会、2012 年 6 月 8~9 日、仙台、東北大学
8. Sachiko Yanagisawa, Hiroshi Sugimoto, Yoshitsugu Shiro, Takashi Ogura “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 16~18 日、姫路
9. Masayuki Hara, Sachiko Yanagisawa, Hiroshi Sugimoto, Yoshitsugu Shiro, Takashi Ogura “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 16~18 日、姫路
10. Takashi Nomura, Sachiko Yanagisawa,

Kyoko Shinzawa-Ito, Shinya Yoshikawa,
Takashi Ogura “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 16～18
日、姫路

11. 柳澤幸子、杉本宏、城宜嗣、小倉尚志「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 23～24 日、筑波

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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