

論文内容の要旨

共鳴ラマン分光法による Mixed-Valence 型

チトクロム *c* 酸化酵素の反応追跡

(Resonance Raman Characterization of Mixed-Valence Cytochrome *c* Oxidase in the Reaction with Dioxygen)

織田賢二

チトクロム *c* 酸化酵素 (CcO) は、ミトコンドリア電子伝達系にある膜タンパク質で、酸素分子を活性化して水にまで還元する。この電子伝達反応に共役してプロトンが膜の内から外へとポンプされる。ポンプしたプロトンの濃度勾配を利用して ATP が合成される。

CcO には、Cu_A、ヘム *a*、ヘム *a*₃、Cu_B の 4 つの酸化還元部位があり、ヘム *a*₃-Cu_B の二核部位で酸素分子の還元反応が起きる。CcO は、酸素分子が 4 電子還元されて 2 分子の水になる反応を触媒する。その反応機構に関して主に 2 つの問題点があった。1 つ目は酸素還元機構、2 つ目はプロトン輸送と電子伝達との共役機構である。

CcO の反応メカニズムを明らかにするには、構造を明らかにすることは極めて重要である。X線結晶構造解析などにより原子レベルの立体構造が明らかになっている。この立体構造の情報が反応機構の解明に役立っている。X線結晶構造解析などの静的な立体構造と機能発現の間をつなげているのは、動的構造変化である。完全還元型酵素 + O₂ の反応は、時間分解共鳴ラマン分光法により以下のように進行することが明らかとなっている。Fe²⁺ +

$O_2 \rightarrow Fe^{3+}-O_2^-$ (1 電子還元型 “oxy 中間体”) $\rightarrow Fe^{5+=O}$ または $Fe^{4+=O} +$ ラジカル (2 電子還元型 “P 中間体”) $\rightarrow Fe^{4+=O}$ (3 電子還元型 “F 中間体”) $\rightarrow Fe^{3+}-OH^-$ (4 電子還元型の “H 中間体”) である。

酸化型 CcO に CO を加えると Mixed-Valence 型(MVCcO)ができる。これは酸化型に比べ 2 電子余分に持つと考えられている。このものに O_2 を加えると 607 nm の吸収帯を持つ P 中間体ができ、それは時間と共に減少するが、減少が止まった 8 時間後にも P 中間体が残っている。測定のしやすさからこれまで 8 時間後の P 中間体が調べられてきたが、はっきりとした構造はわかってない。

本研究では、この P 中間体の構造を明らかにし、どのような過程で反応が進むのかをはっきりさせるため MVCcO と O_2 の反応開始 100 μ s ~ 2 ms、1 分後、8 時間後の時間分解共鳴ラマンスペクトルを測定した。

共鳴ラマン分光法は、CcO の P 中間体におけるヘム a_3 の構造を明らかにする手法として有力である。共鳴ラマン分光法を用いると、ある特定の振動モードのみが観測される。励起レーザーを 420 nm のヘムの Soret 帯にあわせることによってヘムおよびその近傍の振動スペクトルのみを選択的に観測できる。また、時間分解能が高いという利点もある。これらの利点は、共鳴ラマン分光法の特長である。

・ Mixed-Valence 型 CcO と酸素との反応開始 8 時間後

MVCcO に酸素を加えると 607 nm 付近に吸収帯を与える複合体ができ、次に pH 6.0、8.0 ともに吸収が減少した。吸収の減少速度は pH によって違い、半減期は pH 8.0 では $t_{1/2}=70$ min、pH 6.0 のでは $t_{1/2}=8$ min であった。

MVCcO と酸素との反応において、pH の違いによって吸収スペクトルのふるまいが異なることがわかった。次に安定に存在する反応開始 8 時間後の構造を明らかにするために共鳴ラマンスペクトルを測定した。

完全酸化型との差吸収スペクトルは、pH 8.0では607 nmに吸収ピークがあり、pH 7.4、6.0へとpHを下げると607 nmの吸収が小さくなり、pH 6.0では観測されなかった。反応開始8時間後、pH 8.0の423.0 nm励起の共鳴ラマンスペクトルには、804 cm^{-1} と356 cm^{-1} にラマンバンドが現れ、 $^{18}\text{O}_2$ を用いるとこれらはそれぞれ768 cm^{-1} と342 cm^{-1} に低波数シフトした。 $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ を用いたときの結果を含めて解析し、P中間体はFe=O型であると帰属した。一方、pH 6.0では607 nmの吸収帯と同様に804, 356 cm^{-1} のラマンバンドも観測されなかったので酸性条件ではFe=O型は存在しないことが明らかとなった。

次に804 / 768 cm^{-1} と356 / 342 cm^{-1} のラマンバンドの励起波長依存性を調べるためMVCcOと酸素との反応における423.0 ~ 441.6 nm励起の共鳴ラマンスペクトルを測定した。441.6 nm励起では、356 cm^{-1} のラマンバンドが観測されなかったが、420 ~ 430 nmの範囲の励起波長では356 cm^{-1} のラマンバンドが観測された。したがって356 cm^{-1} のラマンバンドは804 cm^{-1} のものに比べて幅の狭い励起波長依存性を示すことがわかった。

MVCcOと酸素との反応で生じるP中間体はFe=O型になることがわかった。次にヘムに結合している酸素原子が水素結合しているかどうかを調べた。水素結合しているかどうかは、酵素反応機構を明らかにする上で重要であり、水素結合の有無の重要性は、西洋ワサビペルオキシダーゼの例でよく知られており、 D_2O 中で測定したときFe=O伸縮振動が高波数シフトすることからわかる。そこで D_2O 中のラマンスペクトルを測定した。結果は D_2O 中で測定するとFe=O伸縮振動が2 cm^{-1} 高波数シフトした。このことからヘムに結合した酸素原子は水素結合していることが明らかとなった。水素結合の相手は $\text{Cu}_B\text{-OH}$ であると考えられる。

MVCcOと酸素との反応において反応開始8時間後のヘムの幾何学的な構造が明らかとなった。しかし、P中間体はFe=O型かつ2電子還元状態であるので、 $\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}$ 、 $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O} +$ ポルフィリン π カチオンラジカル、 $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O} +$ アミノ酸ラジカル、 $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O} + \text{Cu}_B^{3+}$ の4つの可能性が考えられ、はっきりとしてない。そこでヘムの構造を敏感に反映する高波数のラマン

スペクトルを測定した。酸化型では酸化還元マーカーバンドと呼ばれる ν_4 が 1371 cm^{-1} に観測され、P 中間体と完全酸化型との差スペクトルを計算したところ 1377 cm^{-1} に ν_4 の強度変化が観測された。P 中間体のみの高波数のラマンスペクトルは、いままでにないデータである。今後モデル化合物のラマンスペクトルが測定されることにより、P 中間体における酸化当量の局在位置が明らかになることが期待される。

・ Mixed-Valence 型 CcO と酸素との反応開始 1 分後のラマンスペクトル

反応開始 8 時間後の安定な中間体の構造は明らかになったが、 607 nm の吸収が減少する前の構造はわかっていない。そこで、反応開始 1 分後の吸収、ラマンスペクトルを測定した。

反応開始 1 分後の吸収およびラマンスペクトルは、pH 8.0, 6.0 とともに 607 nm に吸収ピークを示し、 804 と 356 cm^{-1} にラマンバンドを示し、酸性条件下でも P 中間体が存在することが明らかとなった。反応開始 8 時間後の結果とあわせて考慮すると、酸性条件下では P 中間体ができた後に消失していくことを示している。

・ Mixed-Valence 型 CcO と酸素との反応開始 $100\text{ }\mu\text{s}\sim 2\text{ ms}$ 後のラマンスペクトル

pH に関係なく、反応 1 分後に P 中間体ができることが明らかとなった。次にどのような中間体を経て P 中間体ができるかをはっきりさせるため、pH 6.8, 8.0 の条件下での反応開始 $100\text{ }\mu\text{s}\sim 2\text{ ms}$ 後の共鳴ラマンスペクトルを測定した。

反応開始 $100\text{ }\mu\text{s}\sim 1\text{ ms}$ の共鳴ラマンスペクトル(pH 6.8)には、まず oxy 中間体に由来する 571 cm^{-1} のラマン線が現れ、その減衰に同期して P 中間体由来の 804 および 356 cm^{-1} のラマン線が現れた。一方、pH 8.0 では oxy 中間体が減衰し P 中間体が生成する速度がおよそ半分低下した。すなわち、oxy 中間体の減衰とそれに同期した P 中間体の生成が pH 依存性を示すことが明らかとなった。以前の時間分解吸収分光法による報告では pH 6~9

で上述の速度は変化しないとされていた。共鳴ラマン分光法により、この過程が pH 依存性を示すことがはっきりとした。

X 線結晶構造解析によりヘムから 5Å の位置に Y244 が存在することがわかっているが、pH 8.0 ではそれが脱プロトン化している可能性が高い。pH 8.0 では Y244 は脱プロトン化している状態であり H₂O が生成するときの H⁺ を供給することができなく、反応が遅くなったと考えられる。

本研究より、MVCcO と酸素との反応で生じる P 中間体のヘム a₃ の構造、P 中間体までの酸素還元反応は明らかとなった。今後はタンパク部分の構造変化に目を転じる必要がある。酸素還元の各過程ごとにタンパク部分がどのような構造変化を起こすのかを、紫外共鳴ラマン分光法、赤外分光法などの手法により突き止めることが次の課題である。そのとき、本研究で明らかになった安定な P 中間体の調製法が役立つと考えられる。