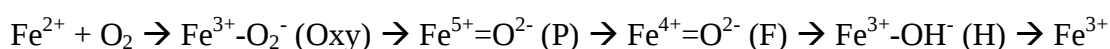


## 再構成ベシクル中のチトクロム *c* 酸化酵素の構造ダイナミクス解析

山田真実、○小倉尚志、山口 悟、新澤伊藤恭子、吉川信也

兵庫県立大学・院・生命理学、ogura@sci.u-hyogo.ac.jp

チトクロム *c* 酸化酵素（以下、CcO と略す）は、ミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系の最下流にあり、分子状酸素を水にまで還元する。さらに、この電子伝達反応に共役してプロトンをマトリクスから膜間空間へ汲み出す。こうしてできた電気化学ポテンシャルによりアデノシン 3 リン酸が合成される。ウシ心筋 CcO は、分子量 210 kD の機能単位中に 2 つのヘム（heme *a* と heme *a*<sub>3</sub>）と 2 つの銅部位（Cu<sub>A</sub> と Cu<sub>B</sub>）を酸化還元中心として持つ。heme *a* は 6 配位であり、電子伝達を行うが、その酸化還元がプロトン輸送反応の引き金になると指摘されている[1]。一方、heme *a*<sub>3</sub> は 5 配位であり、酸素分子還元反応の活性部位である。我々は、酸素分子の還元反応のしくみを明らかにするためには、反応中間体の構造を決定することが不可欠と考え、CcO と酸素との反応を時間分解共鳴ラマン分光法で追跡した。共鳴ラマン分光法により、ヘムおよびその近傍の振動スペクトルが選択的に得られる。その結果、CcO と酸素分子との反応は次のように進行することを突き止めた。



ここで、Fe や O などの価数は形式的なものである。上に示す Oxy、P、F、H の 4 つの反応中間体の配位構造は、以下の酸素同位体敏感ラマン線の検出に基づいて決定した。すなわち、Oxy: 571 cm<sup>-1</sup> (ν<sub>Fe-O<sub>2</sub></sub>), 435 cm<sup>-1</sup> (δ<sub>Fe-O-O</sub>), P: 804 cm<sup>-1</sup> (ν<sub>Fe=O</sub>), 356 cm<sup>-1</sup> (δ<sub>N(His)-Fe=O</sub>), F: 785 cm<sup>-1</sup> (ν<sub>Fe=O</sub>), H: 450 cm<sup>-1</sup> (ν<sub>Fe-OH</sub>)である[2]。さらに、P 中間体は高酸化状態であるにもかかわらず安定であって、それはプロトン輸送反応のために重要であると指摘した[3]。さらに、ミトコンドリアそのものに共鳴ラマン分光法を適用し、上記の反応中間体を生理的条件下で検出した[4]。本研究では、単離した CcO をリン脂質二重膜に再構成し、膜中にある状態の CcO の活性部位構造を共鳴ラマン分光法により調べた。

「実験法」 CcO はウシ心筋より単離し、結晶化により精製した。フォスファチジルコリンの懸濁液に CcO を加え、透析によりコール酸を除くことにより再構成ベシクルを調製した。これを COV と呼ぶ。pH 電極によりプロトン輸送活性を測定したところ、H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup>比として、0.5–1.0 の値を得た。呼吸調節率は、FCCP（プロトノフォア）存在下の酸素消費速度を、非存在下の速度で除した商として計算し、5 前後の値を得た。共鳴ラマン散乱の励起波長は、441.6 nm または 423.0 nm とした。試料は内径 5 mm の石英製回転セルに入れ、1200 rpm で回転させた。

「結果と考察」 COV の休止酸化型の共鳴ラマンスペクトルに現れる 1650 cm<sup>-1</sup> のラマ

ン線強度は CcO (可溶化状態) のそれより大きかった。1650  $\text{cm}^{-1}$  のラマン線は、heme *a* の側鎖フォルミル基の  $\nu_{\text{CH=O}}$  であることが知られている。このラマン線がヘムの共鳴ラマンスペクトルに現れることは、フォルミル基が  $\pi$  共役系に参加していることを意味する。結晶構造から、-CH=O はヘム面と 20 度の角度をなすことがわかっているが、上の結果は、COV ではその角度が小さくなることを意味する。このフォルミル基はアルギニン残基と水素結合しており、プロトン輸送に重要であると考えられており、COV におけるプロトン輸送反応の調節機構を考える上で興味深い。

図 1 に、COV に還元剤を加えて、反応の定常状態とした時の共鳴ラマンスペクトルを示す。反応開始 750 秒以降 1377、1591、1654  $\text{cm}^{-1}$  の山と 1570  $\text{cm}^{-1}$  の谷がはっきりする。これらの強度は 1750 秒から 4750 秒まではほぼ一定で、その後わずかに減少する。このスペクトルパターンは、P 中間体のそれに一致する。FCCP 存在下で還元剤を加えても図 1 に示すスペクトル変化は見られなかった。また、CcO (可溶化) に還元剤を加えても変化は見られなかった。したがって、P 中間体が安定化されるのは、膜中において  $\Delta\text{pH}$  が存在する時である

ことがはっきりした。 $\Delta\text{pH}$  が存在する時に P 中間体が安定化されて、反応が遅くなることは、生理的に意味のあることである。このような安定化がどのようにして起きるのかを分子構造をもとに明らかにすることが次の課題である。

文献 [1] T. Tsukihara, K. Shimokata, Y. Katayama, H. Shimada, K. Muramoto, H. Aoyama, M. Mochizuki, K. Shinzawa-Itoh, E. Yamashita, M. Yao, Y. Ishimura and S. Yoshikawa (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 15304-15309. [2] T. Kitagawa and T. Ogura (1997) Prog. Inorg. Chem., 45, 431-479. [3] K. Oda, T. Ogura, E. H. Appelman and S. Yoshikawa (2004) FEBS Letts., 570, 161-165. [4] T. Takahashi, S. Kuroiwa, T. Ogura and S. Yoshikawa (2005) J. Am. Chem. Soc., 127, 9970-9971.

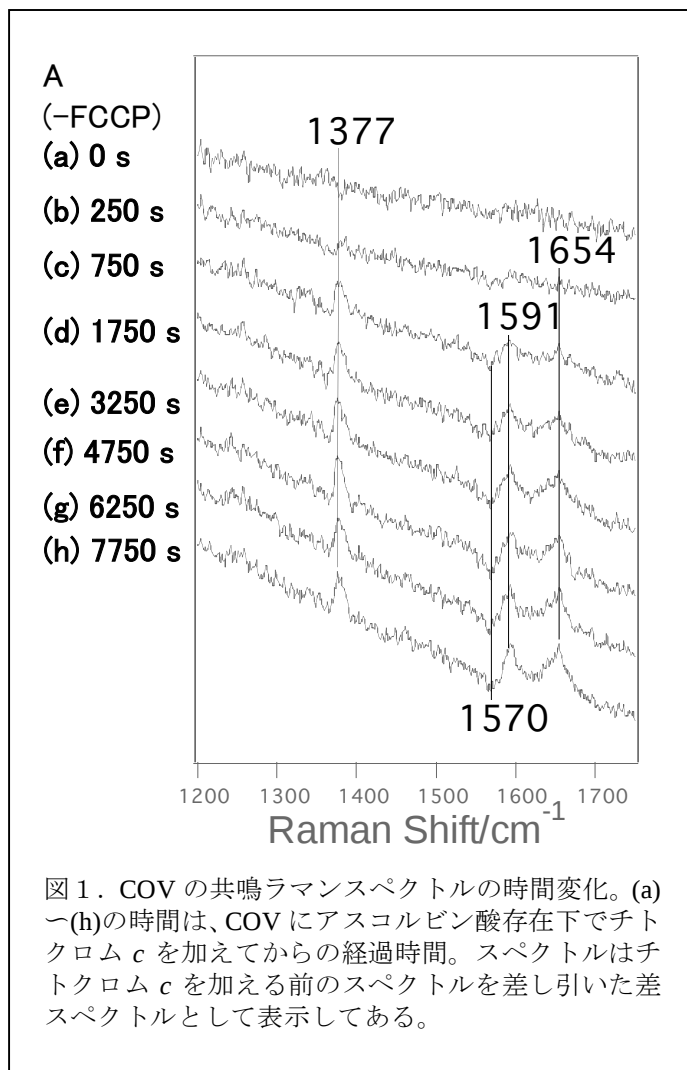


図 1. COV の共鳴ラマンスペクトルの時間変化。(a)～(h)の時間は、COV にアスコルビン酸存在下でチトクロム *c* を加えてからの経過時間。スペクトルはチトクロム *c* を加える前のスペクトルを差し引いた差スペクトルとして表示してある。