2P069

フッ素置換ヘムと再構成したヘモグロビンの¹⁹F NMR 研究

○平井 佑紀¹、照井 教文¹、亀田 恒徳¹、山本 泰彦¹、長尾 聡¹、鈴木 秋弘² (¹筑波大・化、²長岡高専・物質工)

ヒト成人ヘモグロビン (HbA) は α 、 β 二種類のサブユニットからなる $\alpha_2\beta_2$ の四量体構造をとっており、その分子量は約 64500 である。そのため、NMR シグナルの線幅増大と重なりが著しく、¹H NMR のみにより各サブユニットのヘムの構造を解析することは困難である。しかし、フッ素置換ヘム (Fig. 1) と再構成した HbA を ¹⁹F NMR で観測すれば、シグナルの重なりは問題とならない。2-MF (Fig. 1) と再構成直後の HbA メトシアノ体の ¹⁹F NMR スペクトル (Fig. 2A) ではヘム配向異性体による 4 つのシグナルが観測された。また、数ヶ月後の同じ試料のスペクトル (Fig. 2B) では、Fig. 2A で観測されたシグナルのうち 2 つが消失していた。2-MF を HbA の β にのみ導入したハイブリッド再構成 Hb のスペクトルとの比較から、次の 1-3 が明らかとなった。1. 各サブユニットのヘム配向異性体は、¹⁹F NMR シグナルの明確な分離として検出される。2. タンパク質に対する 2-MF の熱力学的に安定な配向が、 α と β サブユニットで異なり、両配向はヘムの 5-15 メン軸に関する 180° 回転により関係付けられる。3. HbA メトシアノ体では、1 つのサブユニットのヘムの置換は他のサブユニットの活性部位に大きな影響を及ぼさない。

Fig. 1 本研究に用いたフッ素置換ヘム及びプロトヘムの分子構造

Fig. 2 2-MF HbCN の ¹⁹F NMR スペクトル。(A) 再構成直後、(B) 時間経過後

Y. Hirai, N. Terui, T. Kameda, Y. Yamamoto, S. Nagao and A. Suzuki : ¹⁹F NMR study of hemoglobinA reconstituted with ring-fluorinated hemes

2P071

チトクローム c 酸化酵素の Mixed Valence-CO 型と酸素との反応に見られる Fe=O 中間体：共鳴ラマン分光法

○光法 賢二、小倉 尚志 (東大・院・総合文化)

チトクローム 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。O₂ 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はっきりさせることが重要である。完全還元型酵素 + O₂ の反応は、 $\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} - \text{O}_2^- \rightarrow \text{Fe}^{5+} = \text{O}$ (または $\text{Fe}^{4+} = \text{O} + \text{ラジカル}$) $\rightarrow \text{Fe}^{4+} = \text{O} \rightarrow \text{Fe}^{3+} - \text{OH}^-$ のように進むことが共鳴ラマン分光法により明らかとなっている。一方、酸化型 CcO に CO を加えると mixed valence CcO-CO 型 (MV-CO) ができ、これに O₂ を加えると 607 nm に吸収を示す中間体ができることが知られている。441.6 nm 励起の共鳴ラマンスペクトルには、¹⁶O₂ / ¹⁸O₂ に対して 804 / 768 cm⁻¹ にラマン線が現れ、 ν (Fe=O) と帰属されている。これらの振動数は完全還元型 + O₂ の反応に見られる ν (Fe=O) の 804 / 765 cm⁻¹ に近いが、 ν (O-O) によることを否定できない。本研究の目的は ¹⁶O¹⁸O を用いて、441.6 nm 励起で現れる 804 / 768 cm⁻¹ のラマン線が ν (Fe=O) か ν (O-O) かをはっきりさせることである。MV-CO + ¹⁶O¹⁸O の反応で、804 cm⁻¹ と 768 cm⁻¹ に 2 本のラマン線が現れ、中間の 786 cm⁻¹ 付近には現れなかった。したがって、441.6 nm 励起で見られる 804 cm⁻¹ のラマン線は ν (Fe=O) であることが証明された。このラマン線は重水中でシフトしなかったため、ヘム a₃ に結合している O 原子は水素結合していないことが明らかとなった。ここで得られた新しい知見を含めて CcO による O₂ 還元反応を考察する。

K. Oda and T. Ogura : An Fe=O Intermediate in the Reaction of Carbonmonoxy Mixed Valence Cytochrome c Oxidase with Dioxxygen : Resonance Raman Spectroscopy

2P070

無傷ミトコンドリア中のチトクローム酸化酵素の反応中間体の追跡：共鳴ラマンスペクトル

○高橋 俊成、小倉 尚志 (東大・院・総合文化)

真核生物のミトコンドリアには、呼吸鎖電子伝達系があり、いくつかの膜タンパク質複合体から構成される。このうち直接分子酸素と反応し、これを水にまで還元すると共にプロトンポンプとして働くのがチトクローム c 酸化酵素 (CcO) である。我々はこれまでに主に可溶性 CcO の共鳴ラマンスペクトルを測定し、O₂ 分子の還元機構を詳しく調べてきた。このような反応機構が実際のミトコンドリアにも当てはまることを確かめることは重要である。また、プロトンポンプ機構を明らかにするためには、膜中での構造変化を詳しく調べることも手掛かりになると考えられる。以上ことから、本研究では、無傷ミトコンドリアの共鳴ラマンスペクトルを測定した。ウシ心筋より単離したミトコンドリアを 0.25 M ショ糖-0.01M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に懸濁し、酸素電極を用いて呼吸調節率を測定することにより膜構造が破壊されていないことを確かめた。このサンプルを還元した後に、回転セルの気相を CO に置換した。427nm の励起光を用いてラマン散乱を測定すると、517cm⁻¹ のラマン線が観測され、このバンドは ¹³C¹⁸O を用いることにより低波数側シフトを起こしたので、Fe_{a3}-CO 伸縮振動と帰属した。同位体との差スペクトルを計算すると、この他にも、Fe_{a3}-CO の変角振動、Fe_{a3}-CO の変角振動とポルフィリンモードの combination に帰属されるバンドが観測され、可溶性酵素とほぼ一致した。フローセル中で CO 結合型ミトコンドリアと酸素を溶解した緩衝液を混合させ、590nm のポンプ光で CO を解離して、酸素との反応を開始させ、423nm のプローブ光を用い、反応開始後 1ms 以内の反応中間体の共鳴ラマンスペクトルを測定した。¹⁶O₂ と ¹⁸O₂ の差スペクトルを計算すると、酸化型反応中間体と思われる差が観測された。

T. Takahashi, T. Ogura : Resonance Raman study of reaction intermediates of cytochrome oxidase in intact mitochondria

2P072

光還元によるチトクローム酸化酵素の反応中間体の捕捉

○黒岩 繁樹、小倉 尚志 (東大院・総合文化)

チトクローム酸化酵素 (CcO) における酸素の還元反応と共役したプロトンの能動輸送の仕組みを明らかにする手段の 1 つとして、反応中間体の X 線結晶構造解析が考えられる。そのためには、CcO 結晶での反応中間体を得なければならない。そこで、まず酸素存在下の CcO 溶液を液体窒素で凍結させ、光還元によって反応を開始させる方法の確立を目指した。光還元にはルテニウム錯体 ([Ru(bpy)₃]²⁺, [Ru(NH₃)₆]²⁺) を用いた。[Ru(bpy)₃]²⁺ は光励起によって * [Ru(bpy)₃]²⁺ となって、* [Ru(bpy)₃]²⁺ + Q → [Ru(bpy)₃]³⁺ + Q⁻ (Q: 反応物質、この場合 CcO) という反応を起こす。この反応は極めて高速であるが、逆反応も高速である。そのため通常では正味の反応は進行しない。しかし、[Ru(bpy)₃]^{2+/3+}-Fe^{3+/2+} の系では逆反応は遅いことが知られており、逆反応を抑えるためには別に電子供与体を加えて [Ru(bpy)₃]³⁺ を再還元すればよい。電子供与体としては EDTA またはアニリンを用いた。実際はそれでも反応は進みにくい。そこで中間電子媒体としてテトラメチル-p-フェニレンジアミン (TMPD) を加えることによって、ハロゲンランプ (50 W) の白色光の照射によって CcO は常温では約 30 分で 100 % 還元された。ところが同じ溶液条件で低温 (100 K) では還元は 40 % までしか進まなかった。低温での光化学反応では反応溶液は凍結しているため、反応生成物が拡散していくことがなく、電荷の再結合反応が起こりやすいためと考えられる。この場合、近傍に EDTA またはアニリンが存在するルテニウム錯体分子のみが CcO へ電子を放出できることとなり、光還元効率が大幅に低下したことが考えられる。反応中間体の割合を高めるためには低温での光還元の割合を 100 % に近づけなければならない。そのために電子供与体と中間電子媒体の種類と濃度、光照射時の温度の効果について検討した。詳細については発表で述べる。

S. Kuroiwa and T. Ogura : Reaction of Cytochrome c Oxidase with Dioxxygen Initiated by Photoreduction