2P073

結晶チトクロム酸化酵素の酸化還元反応：共鳴ラマン分光法

○小倉 尚志¹、青山 浩²、伊藤新澤 恭子³、吉川 信也³ (¹ 東大・院・総合文化、² 理研・播磨、³ 姫路工大・理)

チトクロム c 酸化酵素 (CcO) は、ミトコンドリア内膜の電子伝達系にあり、チトクロム c から電子を受け取り、それを分子状酸素に渡してこれを水にまで還元する。この電子伝達反応に共役してプロトンがマトリクスから膜間空間へポンプされる。X 線結晶構造解析による立体構造からいくつかのプロトンチャンネルの存在が指摘されている。さらに、金属中心の酸化還元によって構造変化するアミノ酸残基が見出され、これがプロトンポンプにおいて重要な役割をすると提案されている。一方、O₂ 還元反応は、Fe²⁺ + O₂ = Ae Fe³⁺ + O₂ = Ae Fe⁵⁺ + O (または Fe⁴⁺ + O + ラジカル) = Ae Fe⁴⁺ + O = Ae Fe³⁺ + OH⁻ の如く進行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。しかし、金属中心の酸化還元に伴うどのような構造変化がポンプの引き金になるのか不明である。共鳴ラマン分光法によりヘムの振動スペクトルが選択的に得られるが、2 つのヘムのラマン線が重なり合っており、その分離は充分でなかった。これは、結晶 CcO の偏光ラマン測定により解決できる可能性があり、解決できればこれまではっきり見えなかった微小な構造変化が検出できる可能性がある。そこで本研究では、結晶 CcO の偏光共鳴ラマンスペクトルを測定した。ウシ心筋 CcO を結晶化して用いた。休止酸化型結晶のラマンスペクトルは、a₂+a₃₃+状態になっていることを示した。このことは可溶性酵素と同様に光還元されることを意味する。いくつかのラマン線強度は顕著な入射偏光依存性を示した。偏光解消度を測定してそれらの帰属を明らかにした。嫌気条件下で結晶に還元剤を加えると完全還元型になり、O₂ を加えると酸化された。さらに O₂ が消費し尽くされると完全還元型に戻った。すなわち、結晶状態で酸化還元反応を追跡できることがわかった。

T. Ogura, H. Aoyama, K. Shinzawa-Itoh and S. Yoshikawa : Redox Reaction of Cytochrome Oxidase Single Crystal as Probed with Resonance Raman Spectroscopy

2P075

酸化還元に伴うウシ心筋チトクロム酸化酵素の構造変化の赤外吸収差スペクトル法による研究

○望月 正雄、吉川 信也 (姫路工大・理、CREST)

チトクロム酸化酵素の酸化還元や配位子結合状態の変化に伴うタンパク質部分の構造変化が赤外分光法によって研究されている。しかし 1800cm⁻¹ より低波数側では水の強い吸収があるので、非常に短い光路長 (~6 μm) のセルを用いて、セルを動かさずに電極や光照射によって酵素標品の酸化状態を変化させ、それに伴うスペクトル変化が測定されている。その際、酵素標品に種々の酸化還元触媒を添加する必要があるし、一定の酸化還元状態で阻害剤等を添加した場合としない場合の差を測定することはできない。そこで、我々は処理を施した酵素標品と施していない酵素標品との単なる差スペクトルの測定方法を検討した。

その結果、以下の点に注意すれば、1800cm⁻¹ から 1200cm⁻¹ の全領域の赤外吸収差スペクトルを重水中では光路長 12 μm、軽水中では 6 μm において測定可能であり、アミド I 領域 (1680~1620cm⁻¹) を除いて重水中では 25 μm、軽水中では 12 μm において測定可能であることが明らかになった。(1) 実験室の湿度を 7% 以下に保つ。(2) セル内の試料溶液に気泡が混入する原因となる「埃」を除去するために接地したアルミ箔上でセルを組み立て、またセル内の洗浄を急に行う。(3) セルの変形 (光路長の変化) を防ぐために、洗浄や試料の注入の際にセル内が高圧にならないようにする。(4) H/D 交換による経時的なスペクトル変化を防ぐために、重水交換した酵素標品を 24 時間室温中に放置して H/D 交換を促進する。

上記の条件でシアン化物存在下における還元滴定を行った結果、重水中で、COOH 由来 (1742cm⁻¹) の吸収強度の減少に伴って COO⁻ 由来 (1580cm⁻¹) の吸収強度の増加が確認された。また、この変化は Cu_A か heme a のどちらかの還元に関与していると推定できる。

M. MOCHIZUKI and S. YOSHIKAWA : Difference FT-IR for examination of conformational change of bovine heart cytochrome c oxidase.

2P074

ウシ心筋チトクロム酸化酵素の結晶における吸収スペクトル

○倉内 毅¹、村本 和優¹、伊藤-新沢 恭子¹、小倉 尚志²、吉川 信也¹ (¹ 姫路工大・理、² 東大院・総合文化)

ウシ心筋チトクロム酸化酵素は電子伝達系の末端酸化酵素で、酵素 1 分子あたり 2 個のヘム分子 (ヘム a、ヘム a₃) を含む。酵素の可視吸収スペクトルは両ヘムの酸化状態、ならびにヘム a₃ に結合した外部配位子により変化し、酵素状態の指標とされる。これまでに数多くの研究において溶液状態の酵素の吸収スペクトル測定が行われ、酵素反応中間体や酵素阻害剤複合体等の性質について様々な知見が蓄積されている。

近年になり本酵素の結晶化、及び X 線結晶構造解析が行われ立体構造が決定された。更に、還元型や阻害剤結合型についても結晶構造が決定され、反応中間体の結晶構造解析も進められている。結晶中の酵素の状態を知るためには結晶の吸収スペクトル測定が必要であるが、ヘムの配向により吸収強度には異方性がある。そこで、本研究ではこれまでに得られている斜方晶系の結晶について、吸収スペクトルの偏光特性を調べた。測定には顕微分光装置を使用し、結晶の b 軸方向に入射した偏光の振動方向を 180 度変化させた時の α 帯の吸収スペクトルを測定した。その結果、酸化型結晶、還元型結晶ともに偏光方向に依存して吸光度が 5 倍以上変化することが見いだされた。更に、いずれの結晶においても、吸収強度は偏光の電気ベクトルが結晶の c 軸に平行の場合に最大となり、垂直の場合に最小となることが分かった。得られたデータと結晶構造中でのヘムの配向との関係から、吸収強度に対するヘム a ならびにヘム a₃ の寄与について検討した。また、結晶と溶液の吸収スペクトルとの対応についての検討を行った。

T. Kurauchi, K. Muramoto, K. Shinzawa-Itoh, T. Ogura and S. Yoshikawa : Absorption spectra of the crystal of bovine heart cytochrome c oxidase.

2P076

ウシ心筋チトクロム酸化酵素の高分解能構造解析の現状

○青山 浩¹、平田 邦夫²、山下 栄樹²、月原 富武²、岡田 英理³、村本 和優³、伊藤-新沢 恭子³、吉川 信也³ (¹ 理研、² 阪大蛋白研、³ 姫路大理)

チトクロム酸化酵素は細胞呼吸の末端酸化酵素で分子状酵素を水にまで還元するとともに水素イオンを能動輸送する機能をもっている。このようにして生じた水素イオン駆動力を利用して ATP 合成酵素は ATP を合成する。水素イオン駆動力は膜貫通部分の中心近くにある酸素還元中心への膜間腔側からの電子伝達とマトリクス側からの水素イオン輸送によっても形成される。従って本酵素分子内の水素イオン輸送機構を解明することは本酵素によるエネルギー変換機構の解明に不可欠である。本酵素による水素イオン輸送は電子伝達反応と共役しているため、静電的相互作用が重要視されることが多いが、方向性をもった水素イオン輸送を効率的に進めるために、立体構造変化を伴う可能性が高い。また、全ての官能基が三次元的に固定されているタンパク質内部では微少な立体構造変化でも化学反応性を大きく変化させる可能性がある。従って X 線構造の分解能を高めるための断続的な努力が本酵素の反応機構の解明には不可欠である。本研究では、まず昨年報告した 1.8 Å 分解能の構造の精密化を行った。プログラム X-PLOR による精密化では、特に重金属の異方性温度因子による差の電子密度への影響が大きく、活性中心の構造を詳細に決定することに問題があった。そこで異方性温度因子の精密化が可能なプログラム REFMAC により精密化を行ったところ、妥当な差の電子密度が得られ、R-factor も 21.0% (R_{free} = 22.7%) から 20.0% (R_{free} = 22.3%) へと収束した。またさらに高分解能データ収集を目指して、不凍剤の種類、結晶への不凍剤の導入法などの結晶の凍結条件を詳細に検討したところ、1.66 Å の構造解析が可能であることが明らかとなった。

H. Aoyama, K. Hirata, E. Yamashita, T. Tsukihara, E. Okada, K. Muramoto, K. Itoh-Shinzawa, S. Yoshikawa : High resolution structure analysis of bovine heart cytochrome c oxidase