2P093

還元型チトクロム酸化酵素のNO結合構造とCO結合構造の精密化

○村本 和優¹、青山 浩²、石田 訓康¹、倉内 毅¹、青波 里実¹、山下 栄樹³、伊藤・新澤 恭子¹、月原 富武³、吉川 信也¹ (兵庫県立大・院生命理、²理研・播磨、³阪大・蛋白研)

チトクロム酸化酵素は還元型のヘム a_3 -Cu_B サイトに酸素分子を結合し水分子へと還元する。一酸化窒素(NO)や一酸化炭素(CO)も還元型ヘム a_3 -Cu_B サイトに配位し、これらは酸素還元反応を阻害する。配位子の結合様式に関してはこれまでおもに分光学的に調べられてきたが、近年になりX線構造解析が可能になった。以前の研究において、CO結合還元型については2.8 Å分解能での常温構造の解析が行われた。また最近の研究では、SPRING8 BL44XUを用いて温度100 KでNO結合還元型とCO結合還元型の2.1 Å分解能までのX線回折データが収集され、構造解析が行われている。ただし、低温構造ではヘム a_3 -Cu_B サイトのFe原子とCu原子の電子密度に異方性があるため、これまで配位子の構造精密化に問題があった。

本研究では低温構造でのNOとCOの結合様式を明らかにするため、電子密度の異方性を考慮して構造の精密化を行った。精密化計算にはCCP4プログラムRefmac5を使用し、TLSパラメーター、及び異方性温度因子を含めて実行した。精密化計算後の差フーリエ電子密度図により電子密度の異方性の補正を確認し、配位子の結合様式について検討した。その結果、NOはヘムの軸方向から傾いてFeに配位していることが分かった。この結合様式は、他のヘムタンパク質でのNOの結合様式と似たものであった。一方、COはFeよりもCuに近い位置に結合していることが分かった。COの結合様式に関しては、可視吸収スペクトル測定や常温の構造との比較により更に検討を行った。

K.Muramoto, H.Aoyama, K.Ishida, T.Kurauchi, S.Aonami, E.Yamashita, K.Shinzawa-Itoh, T.Tsukihara and S.Yoshikawa : Structural refinement of the NO- and CO-coordination in cytochrome c oxidase in the reduced state.

2P095

Paracoccus denitrificans チトクロム c 酸化酵素のP中間体の性質と共鳴ラマンスペクトル

○池村 賢一郎¹、小倉 尚志¹、向井 政博²、島田 秀夫²、吉川 信也¹ (兵庫県立大院・生命理・生体物質、²慶応大・医・医学)

チトクロム c 酸化酵素(CcO)はミトコンドリア内膜に存在し、酸素を水にまで還元するとともに膜を隔てたプロトン輸送を行う。ウシCcOの反応中間体であるP中間体は607 nmの吸収と804, 356 cm⁻¹のラマン線を与える。804 cm⁻¹はFe=O伸縮振動に帰属されている。また356 cm⁻¹は折れ曲がったHis-Fe=O結合の変角振動と考えられており、その構造変化がプロトン輸送の引き金になると示唆されている。その帰属をはっきりさせるためには¹⁵N-His置換体による同位体シフトを観測する必要がある。そこで本研究では*Paracoccus denitrificans*由来のCcO(以下、PDCcO)のP中間体の性質を調べた。Mixed-Valence PDCcOに酸素を加えると、607 nmに吸収極大を持つP中間体が生成した。その半減期はpH 8.0で260分でありウシCcOの70分に比べて長かった。このP中間体の590 nm励起の共鳴ラマンスペクトルには805 cm⁻¹のラマン線が現れ、¹⁸O₂では773 cm⁻¹に32 cm⁻¹だけ低波数シフトした。これまでウシCcOのP中間体のFe=O伸縮振動モードはSoret帯励起で検出されていたが、 α 帯励起でも観測しうることがはっきりした。さらに、P中間体の共鳴ラマンスペクトル測定に必要なタンパク量はナノモル程度であることがわかった。ゆえに¹⁵N-Hisラベル体を作成して356 cm⁻¹のラマン線を帰属する準備が整った。

K. Ikemura, T. Ogura, M. Mukai, H. Shimada and S. Yoshikawa : Resonance Raman Study on the P intermediate of *Paracoccus denitrificans* Cytochrome c Oxidase

2P094

共鳴ラマン分光法による無傷ミトコンドリア中のチトクロム酸化酵素反応中間体の構造追跡

○高橋 俊成^{1,2}、小倉 尚志²、吉川 信也² (東大・院・総合文化、²兵庫県立大・院・理)

チトクロム酸化酵素(CcO)はミトコンドリア電子伝達系の末端に存在する酵素であり、酸素を水にまで還元するとともに、これに共役してプロトンのポンプを行っている。酸素還元反応における中間体の構造は、時間分解共鳴ラマン分光法をはじめとする方法により決定されてきた。しかし、これまでは可溶性CcOを用いた研究がほとんどであった。ミトコンドリア膜中に存在する場合と可溶化した場合では周囲の環境が違い、構造が異なる可能性が大きい。

そこで、本研究では、無傷ミトコンドリアを用い、膜中におけるCcOの反応中間体の構造変化を時間分解共鳴ラマン分光法を用いて追跡した。ラマン散乱の励起には423 nmのレーザーを用いた。人工心肺装置*を用いることにより、可溶性CcOにおいて、571 cm⁻¹, 804 cm⁻¹, 785 cm⁻¹に出現する酸素化型、パーフェリル型、フェリル型に由来するバンドを観測することに成功した。現在のところ、これらのバンドの振動数は可溶性CcOと大きな違いは見られていないものの、寿命は若干長くなる傾向が見られた。また、ヒドロキシ型中間体は現在のところ観測されていないが、測定を行った時間領域は反応開始後2 msまでであり、これ以降の時間領域でヒドロキシ型中間体が生成していると考えられる。以上の結果から、酸素の還元反応における反応中間体がミトコンドリア中でも生成することが確認された。これは、これまで可溶性CcOで議論されてきた酸素還元機構が生体内においても実際に起こっていることを支持する結果となった。

*T. Ogura, S. Takahashi, S. Hirota, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, E.H. Appelman and T. Kitagawa (1993) *J.Am.Chem.Soc.*, **115**, 8527-8536

T.Takahashi, T.Ogura and S.Yoshikawa : Resonance Raman spectroscopy of reaction intermediates of cytochrome c oxidase in intact mitochondria

2P096

Detection of the primary ferrous nitrosyl heme intermediate in the reduction of NO by cytochrome *ba*₃ oxidase

○Varotsis Costas¹、太田 雄大²、北川 禎三²、Daskalakis Vangelis¹、Gialou Irene¹、Soulimane Tewfik³、Pinakoulaki Eftychia¹ (¹Univ. of Crete, Dept. of Chem., ²自然機構・岡崎統合バイオ、³Paul Scherrer Institute)

The thermophilic Gram-negative eubacterium *Thermus thermophilus* HB8 (ATCC27634) expresses *caa*₃- and *ba*₃- cytochrome oxidases. Both enzymes catalyze the reduction of O₂ to H₂O and translocate protons across the inner bacterial membrane. In addition both enzymes catalyze the reduction of NO to N₂O and the oxidation of CO to CO₂. Proposed reaction pathways for the catalytic cycles are difficult to verify without the structure of the intermediates, but we now have such information on the primary intermediate in the reaction of *ba*₃-cytochrome oxidase with NO from resonance Raman spectroscopy. We have identified the primary His-heme a_3^{2+} -NO/Cu_B¹⁺ species by its characteristic Fe-NO and N-O stretching frequencies at 539 and 1620 cm⁻¹, respectively. The characteristics of the nitrosyl species have a rationale in terms of the Fe(d_π)-NO(π^*) bonding and are fully supported by density functional theory calculations (DFT). We show by time-resolved FTIR spectroscopy that Cu_B¹⁺ has a much lower affinity for NO than for CO. With the identification of the primary nitrosyl intermediate in which the O atom is not hydrogen-bonded the predominant structure of the primary intermediate is known. The initial steps in the formation of the six-coordinate nitrosyl intermediate in *ba*₃-cytochrome oxidase are compared with those of the five coordinate nitrosyl species obtained in *caa*₃ oxidase, and discussed in terms of the catalytic pathway for the conversion of NO to N₂O by the *bona fide* NO reductases.

C.Varotsis, T.Ohta, T.Kitagawa, V.Daskalakis, I.Gialou, T.Soulimane, and E.Pinakoulaki : Detection of the primary ferrous nitrosyl heme intermediate in the reduction of NO by cytochrome *ba*₃ oxidase from *Thermus thermophilus*