

フェムト秒 X 線レーザー結晶構造解析法を用いた無損傷休止型チトクロム酸化酵素の構造解析

吉川信也

兵庫県立大学大学院生命理学研究科 ピコバイオロジー研究所タンパク質結晶成長機構研究部門

〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都 3-2-1

要旨

ウシ心筋チトクロム酸化酵素 (CcO) 単離精製標品の酸化還元中心は全て酸化型であり、代謝回転中の完全酸化型と同一の酸化状態であるが、プロトンポンプ機能を持たない (休止酸化型)。その原因は酸素還元中心 (Fe_{a3} と Cu_B を含む) の配位構造の差異にあると考えられる。したがって、休止酸化型の構造を精密に解析することにより、本酵素のプロトンポンプ機構の解明に重要な示唆が得られることが期待できる。

高分解能 X 線構造解析のために、チトクロム酸化酵素の精製標品の調整法及び結晶化条件の改良、さらには SPring-8 での X 線回折実験のために結晶を不凍剤に浸漬する条件の検討を組織的に継続し、現在 1.3 \AA 分解能までの X 線回折斑点を示す結晶が得られている。しかし、第 3 世代の放射光施設の強い X 線の照射によって生じる水和電子等の影響は本酵素の強い電子親和性を持つ活性中心に対して著しいため、十分高分解能の X 線回折データは得られているが、活性中心の高分解能構造決定には到達していなかった。第 3 世代の放射光を利用する限り、いかに高品質の結晶を利用することができても、本酵素の活性中心のように X 線感受性の強い部位の構造決定には限界があることが示唆されていた。したがって、XFEL を利用した無損傷の X 線構造解析法は、これまでの X 線構造解析法の限界を実質的に除去するものである。さらにこの XFEL 結晶構造解析法は生命科学の夢であった時分割 X 線構造解析を現実のものとするまさに「ブレークスルー」と言える。最近確立された水溶液中のタンパク質の時間分解赤外分光解析法とともに、タンパク質の機能を原子の挙動としてとらえること (ピコバイオロジー) の最大の技術的障壁が除去されたと言える。本稿ではこの知名度の低いピコバイオロジー理念についても議論する。

1. はじめに

チトクロム酸化酵素 (CcO) は細胞呼吸の末端酸化酵素であり分子状酸素 (O_2) を水にまで還元する。これに共役してミトコンドリア内膜の内側から外側へプロトンを能動輸送するとともに膜電位を誘起し、プロトン駆動力を形成する。これを利用して ATP 合成酵素が ATP を合成する。このように生命活動の駆動力形成の中心的役割を持つ CcO はその発見以来、生命科学の最も重要な研究課題であり続けている¹⁾。

CcO は 13 種の構造の全く異なるサブユニットから構成されている分子量約 20 万の膜タンパク質複合体である。次に述べる酸化還元活性を持つ金属中心以外に Mg^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ 等の酸化還元不活性金属や種々のリン脂質、トリグリセリドが固有の成分として含まれている²⁾。Fig. 1 に模式的に示されているように、機能中心として 2 カ所のヘム部位 (heme a と heme a_3 , それぞれが含む鉄イオンは Fe_a , Fe_{a3} と呼ばれている。) と 2 カ所の銅中心 (Cu_A , Cu_B) を含有している。heme a_3 (O_2 結合部位) と Cu_B が酸素還元中心を構成しており、 O_2 還元のための電子はミトコンドリア内膜の外側 (P-side) にあるチトクロ

ム c (cyt. c) から Cu_A , heme a (Fe_a) を経由して酸素還元中心の heme a_3 (Fe_{a3}) に伝達される。また、この電子伝達にはミトコンドリア内膜の内側 (N-side) から K-

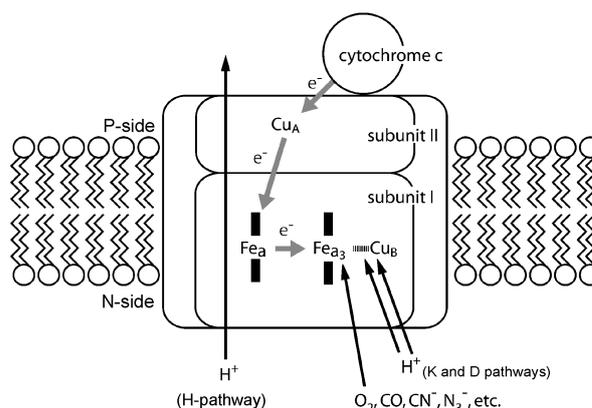


Fig. 1 A schematic representation of the roles of the redox active metal sites in bovine heart cytochrome c oxidase.

The rectangles attached to the heme irons designated as Fe_a and Fe_{a3} are the side views of porphyrin planes of hemes a and a_3 , respectively. Subunits I and II are the biggest and third biggest subunits. The latter contains Cu_A site and the former, the other 3 metal sites.

pathway と D-pathway を経由するプロトン輸送が共役している。X 線構造が示すように heme *a* と heme *a*₃ とは第 5 配位子のそれぞれのヒスチジン残基の間に 1 残基しかないことから推定されるように極めて近接しており迅速な電子伝達が予想できる。事実、heme *a*₃ から heme *a* へ電子はピコ秒レベルの速度で伝達される³⁾。しかし、heme *a* から heme *a*₃ への電子伝達ははるかに遅く、N-side からの H⁺ 輸送に律速されていることが知られている。これは heme *a*₃ と heme *a* とは近接しているが、前者の酸化還元電位は後者のそれより十分低いいため、1 電子還元過程で heme *a* の還元が認められる。そして、heme *a*₃ のプロトン化によって酸化還元電位が上昇することにより heme *a* からの電子伝達が誘起されると考えられている。

この酸素を還元し、水を形成するために必要なプロトンはタンパク質内部にある極性アミノ酸残基や内部に固定された水分子等との間に形成された水素結合のネットワークを経由して輸送される。ウシ心筋 CcO にはそのようなネットワークが 3 本検出されている。そのうち 2 本 (K-pathway と D-pathway) は N-side から酸素還元中心 (P-side 分子表面からミトコンドリア内膜の厚みの約 1/3 N-side 側に配置されている。) までつながっている。したがって、これは水形成のためのプロトン輸送経路である。もう 1 本 (H-pathway) は N-side から P-side を連結しており、ポンププロトンの経路である。P-side 側半分は水素結合ネットワークであるが、N-side 側半分は N-side 側の水分子 (ヒドロニウムイオン) が水素結合ネットワークまで到達できるような空洞である (水チャンネル)。Fig. 2 に模式的に示されているようにその水素結合ネットワークを

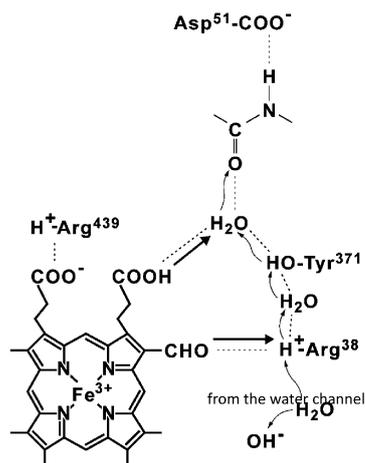


Fig. 2 A schematic representation of the hydrogen bond network of H-pathway.

Heme *a* is attached to the hydrogen bond network by forming the two hydrogen bonds. Asp51 at the upper end of the hydrogen-bond network in this figure is exposed to the P-side phase in the reduced state. Arg38 located at the bottom end of the hydrogen bond network is connected with N-side via the water channel as described in the figure.

構成する R38とネットワーク中に組み込まれている固定水分子に heme *a* の側鎖のフォルミル基 (-CHO) とプロピオン酸基とがそれぞれ水素結合を形成して接触している¹⁾。

heme *a* は 6 配位低スピン型であり、X 線構造はその酸化状態に影響されない。この heme *a* は上述の通りタンパク質内部に埋め込まれているため、鉄イオンの酸化還元に伴う電荷補償が起こらない。したがって、例えば酸化に伴って生じた鉄イオンの正荷電は側鎖に非局在下される。特に -CHO のようにポルフィリン π 電子系と共役している側鎖には非局在下の影響は大きく、共鳴ラマン分光学的に検出されている^{5,6)}。また、同様の影響はプロピオン酸基にも十分予想できる。このような構造は heme *a* が酸素還元のために heme *a*₃ へ電子を供与したことによって生じた正荷電が非局在化し、水素結合ネットワーク上のプロトンを静電的相互作用により能動輸送することを強く示唆している (Fig. 2)。このような X 線構造に基づく H-pathway を経由するプロトンポンプ機構は H-pathway の主要なアミノ酸残基の部位特異的変異解析により機能的に証明されている⁷⁻⁸⁾。しかし、例えば、プロトン能動輸送が H-pathway 上のプロトンと heme *a* の正電荷との静電的反発によるものであるならば静電的相互作用には本来方向性がないため、能動輸送の方向性及び逆流の防止の機構が必要であるが、その構造的基盤は全く不明であること等、多数の本質的な問題が未解決であり、解明への道は遠いと言わざるを得ない。

2. 休止酸化型

上述の heme *a* と H-pathway の水素結合との相互配置はチトクロム *c* からの 1 電子供与と 1 当量のプロトンポンプが共役することを強く示唆する。このことは実験的にも確認されており、CcO の反応サイクルは以下の通りである。酸素還元中心の 2 つの金属が還元されたとき O₂ が結合する。この O₂ は酸素還元中心内の還元型 heme *a*₃ (Fe_{a3}²⁺) から 2 電子、Cu_B から 1 電子、近接しているチロシン残基から 1 電子を同時に受容し、O₂ の O-O 結合は開裂し、Fe⁴⁺=O²⁻、Cu²⁺-OH⁻、TyrO ラジカルを形成する。これに CytC から 1 電子ずつ 4 電子が供与され、1 サイクルが完了する。この各電子伝達と水形成のためのプロトン輸送と H-pathway を経由したプロトンポンプとが共役している。上述の 4 電子のうち 2 電子が供与されて生ずる中間体 [Fe³⁺-OH⁻、Cu²⁺-OH⁻、TyrOH] は他の中間体より構造が安定であると考えられるので cyt. *c* からの電子伝達が途絶したときは、この中間体が形成されて代謝回転が止まると考えられる。CcO の精製は空気中で行われるので、精製標品はこの中間体であると考えられる⁹⁾。しかし、この精製標品は代謝回転中に現れる中間体と異なり、1 電子供与によってプロトンポンプ活性を示さ

ない¹⁰⁾。その他呼吸阻害剤であるシアン化物との反応性や電子受容機能も代謝回転の中間体と大きく異なることが明らかにされた¹¹⁾。この精製標品の酸素還元中心金属の酸化状態は $[\text{Fe}^{3+}, \text{Cu}^{2+}]$ と考えられるが、上述の通り代謝回転に直接関与しているとは考えられないため、休止酸化型 (resting oxidized form) と命名されている¹⁾。

この休止酸化型はプロトンポンプ機能を持たないが、変性酵素ではないことは、電子供与系を共存させると正常な生理機能が若干の遅延時間後に回復することから証明されている¹²⁾。また、このような休止酸化型を形成することにより、活性中心金属が空気中の酵素にさらされて活性酵素種を偶発的に形成することを防いでいると考えられている。したがって、休止酸化型酵素の構造を詳細に解析し、代謝回転中に生じる「酸化型」と比較することにより、プロトンポンプ機構の解明に重要な情報が得られる可能性は非常に高い。

3. 休止酸化型の酸化還元滴定による構造解析

このような視点から、休止酸化型の構造研究は長年にわたって継続されている。酸素還元中心に過酸化物 (O_2^{2-}) が架橋している可能性は精密な酸化還元滴定実験によって最初に示唆された¹³⁾。上述の通り、CcO は4カ所に1電子の受け渡しの可能な酸化還元中心を持っている。ウシ心筋 CcO は上述の通り巨大な膜タンパク質複合体であり、精製標品は多量の界面活性剤によって水溶液中に安定化されている。したがって、 O_2 を除去することは水溶性タンパク質溶液よりはるかに困難である。さらに CcO はおそらく細胞中のタンパク質やその他の化合物の中で最も O_2 親和性が高いものの1つである。したがって、正確な滴定のためには、極めて高い嫌気度と酵素の安定性が要求される。さらに、CcO はミトコンドリア内膜から精製されるため、鉄イオンを含むタンパク質の混入を避けることが容易ではない。ウシ心筋 CcO の場合結晶化によってしか除去できない不純タンパク質が無視できない。最も信頼できる報告によれば、休止酸化型酵素を安全還元するためには6電子当量が必要であること、一度完全還元した CcO を O_2 によって酸化滴定を行うと4電子当量が完全酸化に必要であった。この結果は O_2^{2-} が酸素還元中心の2つの金属間に架橋している構造を示唆する¹³⁾。しかし、この結果は4カ所の酸化還元金属中心 (それぞれ1電子授受機能を持つ) 以外に2当量の電子受容部位があることを示すものであり、その部位の位置、構造を特定することはできない。

なお、この休止酸化型は非常に安定で、結晶状態では数か月保存できるほどである。通常過酸化物はヘムタンパク質と強い反応性を示すことが知られている。さらに H_2O_2 は休止酸化型酵素と反応して代謝回転中に生じる中間体

(P型、F型)であると共鳴ラマン、可視分光学的に同定できる中間体を形成することが知られている。つまり、 H_2O_2 は O_2 類似体の機能を示すと言える。このような視点から休止酸化型が安定な過酸化物複合体であるとの主張は強く批判されている¹⁴⁾。しかし、上述の酸化還元滴定実験に於いて完全還元型酵素を O_2 によって定量的に酸化した標品を過剰の O_2 に30分程度さらすことにより6電子当量が完全還元に必要な状態 (休止酸化型) を作り出すことに成功している¹³⁾。このことは O_2 滴定によって生じた酸化型は代謝回転中の酸化型 $[\text{Fe}^{3+}-\text{OH}, \text{Cu}^{2+}-\text{OH}^-, \text{Tyr}-\text{OH}]$ であり、それは過剰の O_2 が存在しない時は安定であるが過剰の O_2 により、代謝回転の time scale よりはるかに遅いが、休止酸化型が形成されることを示している。この時、 O_2 を H_2O_2 へ還元するための不可逆的電子供与体はタンパク質中の芳香族アミノ酸であると考えられる¹³⁾。CcO はこのような休止酸化型形成のための固有のシステムにより O_2 耐性を獲得していると考えられる。なお、 H_2O_2 と休止酸化型酵素との反応は架橋している O_2^{2-} と H_2O_2 との反応である。したがって、この反応は代謝回転中の酸化型 $[\text{Fe}^{3+}-\text{OH}^-, \text{Cu}^{2+}-\text{OH}^-, \text{TyrOH}]$ から休止酸化型への上述のような反応とは全く別の反応である。したがって、上述の批判は的はずれと言わざるをえない。

4. 共鳴ラマン分光法による休止酸化型の構造解析

休止酸化型は650 nm に弱い吸収を持っている。これまで α 帯から Soret 帯領域での励起によって休止酸化型の配位子の共鳴ラマン分光学的検出が試みられたが、すべて不成功であった。しかし650 nm 吸収帯を641.7 nm の Kr^+ レーザーで励起したところ Fig. 3 のように極めて明確なラマンバンドが 755 cm^{-1} に認められた¹⁵⁾。このラマン及び

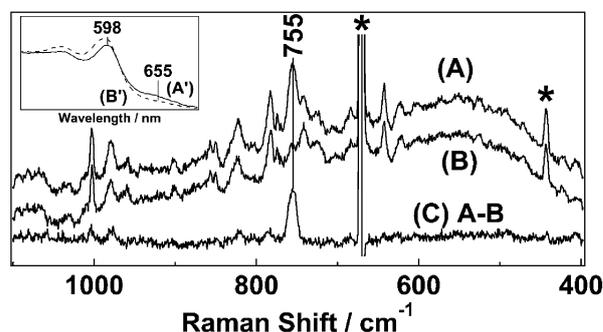


Fig. 3 Resonance Raman spectra of the resting oxidized CcO. Resonance Raman spectra of the resting oxidized bovine heart CcO in the resting oxidized and in the cyanide-treated resting oxidized CcOs excited at 641.7 nm are given in (A) and (B), respectively. The difference spectrum of A vs B is given in (C). The inset shows the absorption spectra of the resting oxidized (A') and cyanide-treated resting oxidized (B') CcOs.

可視吸収スペクトルはシアン化物添加によって除去されることが認められた。このラマンバンドは O-O 伸縮振動として帰属できる領域に位置しているし、Fe-O 伸縮振動が認められないことは O-O が Fe に配位していることをさらに示唆している。O-O 結合距離と O-O 伸縮振動には直線性があることが知られているが、この経験則を参照すると 755 cm^{-1} は O-O 距離が 1.50 \AA であることを示している。この距離は多数の O-O 架橋金属無機化合物の X 線構造が示す値とよく一致しており、典型的な架橋構造であることを示している。しかし、これはあくまで上述のような全くの経験則を適用したものであり、結晶構造解析データによりこの結論を検討することが必要である。

5. SPring-8 による休止酸化型の構造解析

第3世代の放射光の水和電子等による放射線損傷はチトクロム酸化酵素の酸素還元中心に対しては著しくなる可能性が高い。実際、Fig. 4 に示されるように休止酸化型結晶の30秒照射で α 帯領域で大きな吸収スペクトル変化が認められた¹⁶⁾。これ以上の変化は照射時間を延長しても認められなかった。照射後のスペクトルの α 帯には 604 nm 、 595 nm 、 582 nm のピークが認められる。また、 650 nm の肩が大きくなる変化していない。最も単純な説明の1つは「結晶中の酵素の半分以上は X 線照射の影響を受けず、残りの半分近くは水合電子により還元され、還元型 heme a は 604 nm に還元型 heme a_3 は何らかの強いリガンドを受容し、 582 nm にヘモクローム型スペクトルを示

している。」であろう。この照射条件での吸収スペクトル変化は約20秒で終了し、それ以上の変化は認められない。しかし、酸素還元中心の2つの金属 (Fe_{a3}, Cu_B) の間の電子密度は初期には2酸素原子として妥当であるが照射時間とともにさらに減少する。この電子密度の減少に伴って H240 に共有結合で連結されているチロシン (Y244) の OH 基に対して水素結合位置にある電子密度の増加が認められる。この変化は架橋している過酸化物 (O₂²⁻) が水合電子によって還元されて生じた水分子が Y244 の OH に水素結合していると説明できる。この結果も Fe_{a3} と Cu_B の間の電子密度は2当量の OH⁻ によるものではなく、過酸化物 (O₂²⁻) によるものであることを示唆している¹⁶⁾。

この X 線照射の影響を除去するために1秒から400秒までの間の種々の照射時間で電子密度を精密に決定し、0秒を外挿して得られた 2.1 \AA 分解能での X 線構造を Fig. 5 に示す。この結果は O-O 結合距離が 1.7 \AA であることを示している¹⁶⁾。この結果は通常の架橋過酸化物としては長すぎると結論せざるを得ない。1つの説明は「タンパク質中に配置されているからタンパク質外の無機化合物では不可能な環境が実現し、このような構造でも十分に安定に存在し得る。」である。しかし、除外できない可能性は「0秒外挿が不成功であった。」である。1秒から400秒の間に増加する X 線損傷以外に、1秒で起きるがその後時間的に増加することのない損傷があれば0秒外挿によって X 線損傷の影響を完全に除去することは不可能である。なお、Fig. 5 に示されているように Fe-O 間距離 2.24

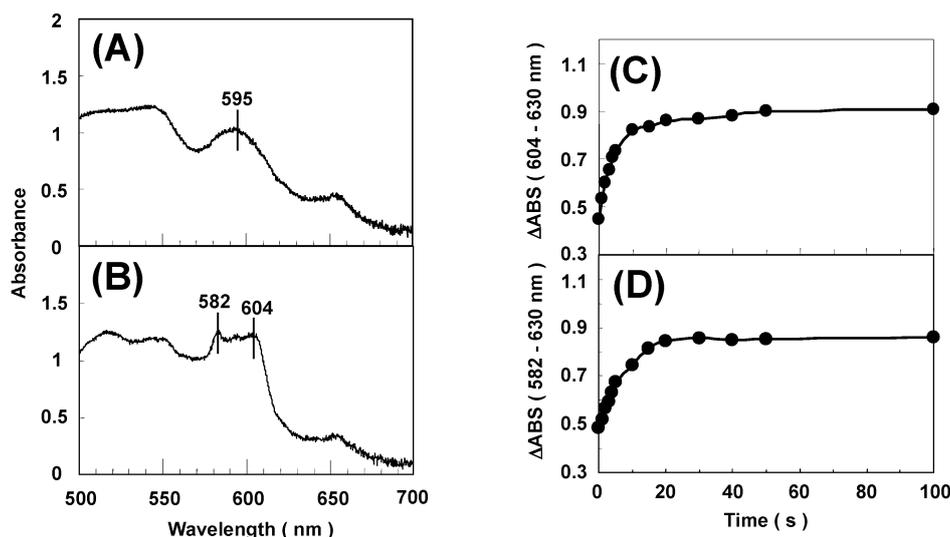


Fig. 4 Effects of X-ray-irradiation of SPring-8 to the frozen crystals of the resting oxidized CcO.

A measuring beam for visible absorption spectrum with the diameter of $50\text{ }\mu\text{m}$ was irradiated perpendicularly to (010) plane. The X-ray beam along the plane was thick enough to irradiate the entire area of the crystals. The spectra before the X-ray irradiation and after 30 sec irradiation are given in (A) and (B), respectively. Increase in the peak intensity at 604 nm and 582 nm against 630 nm are given in (C) and (D), respectively. The shoulder near 650 nm (B) and the maximum intensity at 604 nm indicate that both hemes cannot be reduced completely by the X-ray irradiation.

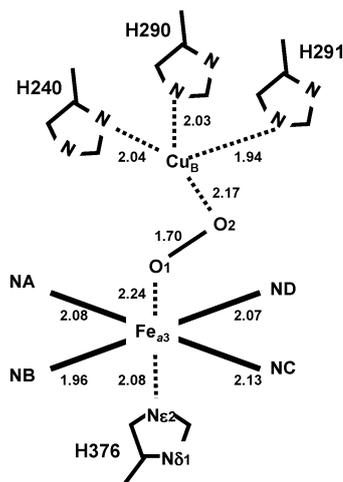


Fig. 5 The structure of the ligand bridging between Fe_{a3} and Cu_B in the resting oxidized CcO.

The structure was determined by 0 sec extrapolation of the X-ray structures of the fully oxidized CcO at various X-ray irradiation time. The structure given in the figure is the one obtained after 15 sec exposure at 2.1 Å resolution. The structure is consistent to the one after 1 sec irradiation. The digits are the bond lengths in Å.

Åは通常の低スピン配位結合としては明らかに長すぎる。したがって、休止酸化型では Fe_{a3}^{3+} は高スピン配位状態であるとの磁気化学的解析結果と一致している^{1,12)}。

ウシ心筋 CcO ほど組織的な解析は行われていないが、*R. sphaeroides* CcO に関する同様の構造解析結果に対して、過酸化物ではなく、 OH^- と H_2O が帰属されている¹⁷⁾。一方、*P. denitrificans* CcO の同様の構造解析結果に対してはウシ CcO と同様に過酸化物が帰属されている¹⁸⁾。前者の帰属は上述のように過酸化物の架橋はあり得ないとの先入観に引きずられたもののように感じられる。これら 2 つの CcO はウシ CcO と同様に A-type であったが B-type の CcO である *T. thermophiles* の CcO (チトクロム ba_3) の高分解能 (1.8 Å) の構造解析結果が報告されている¹⁹⁾。この構造は O-O 距離 1.5 Å の過酸化物が架橋していることを示しており、電子密度に対する帰属には議論の余地はない。しかし、この報告の著者らはこの過酸化物はこの CcO 固有の成分ではなく、放射線照射によって生成した OH ラジカルが重合して生じた H_2O_2 によるものと結論している。また、放射線照射によって生じた水と電子により金属中心も還元され H_2O_2 が結合してヘモクロム型の吸収を示すと解釈している。この解釈に従うならばウシ CcO の場合も架橋過酸化物はヘモクロム型スペクトルを示さなければならない。しかし、照射 1 秒後のスペクトル変化は最大変化の 10% 程度しか認められないが、酸素還元中心の 2 つの金属間の電子密度は最も高く、可視吸収スペクトル変化と電子密度強度との相関はほとんど認められなかったため¹⁶⁾、この説明は不可能であ

る。

休止酸化型の CcO は何の処理も加えられていない精製標品そのものであるため、最も古くからその構造機能研究が進められている標品である。しかしながら上述の通り現在でもその酸素還元中心の構造については多くの議論があり、最もよく分かっていない分子状態と言える。このことが他分野の研究者に「CcO はややこしく分かりにくい。」と感じさせる最大の要因であろう¹⁾。そのような状態から脱却できない最大の理由は休止酸化型酵素還元中心の X 線構造決定が放射光 X 線の効果によって妨げられていることにあると言える。

6. SACLA による休止酸化型の構造決定

X 線自由電子レーザー (XFEL) 施設は 20 フェムト (10⁻¹⁵) 秒の強力な X 線パルス光を発生させることができる。それをタンパク質結晶に照射するとタンパク質構造は瞬時に完全に破壊される。しかし、X 線損傷効果により結晶格子が消滅するまでは結晶は X 線回折を示す。パルスが強く短いため観測される X 線回折は全て損傷を受けるまでの結晶中のタンパク質が示すものである。(X 線損傷は著しくかつ短時間であるため、損傷タンパク質は X 線回折を全く示さない。)しかし、この方法では振動写真の測定も不可能である。(この問題点の克服法に関する議論は参考文献 20 参照。)また、X 線パルスが強いため、結晶の 1 点では 1 照射しか不可能であるが、X 線損傷の影響が結晶中を伝播するため照射点間に十分な距離を置く必要がある。この距離は第 2 照射点の休止酸化型 CcO の X 線回折像への第 1 照射の効果を検討することにより精密に決定されている。その結果、ウシ心筋休止酸化型 CcO の場合は 50 μm で十分であることが明らかになった。前述の通りチトクロム酸化酵素は最も X 線感受性の強いタンパク質であるため、この距離は他のタンパク質についても適用できると考えられる。

上述のような条件で 1.9 Å 分解能で休止酸化型 CcO の無損傷 X 線構造が決定された。Fig. 6 に示されるように Y244 の OH 基に水素結合している水が (占有率は 37% であるが) 認められた。上述の通り酸素還元中心の Fe と Cu との間の電子密度の減少に伴って Y244OH に水素結合する水分子の占有率が高まる。しかし、ここに認められた 37% の水分子はシアニ化物結合型にも認められた。シアニ化物は過酸化物と完全に置き換わるので、シアニ化物結合型 CcO に見られる Y244OH に水素結合する水分子は X 線照射によるものではなく CcO 固有の水分子であると考えられる。この無損傷構造は O-O 間距離 1.55 Å を示していた²⁰⁾。この結果は金属イオン間に架橋する過酸化物イオンとして妥当な O-O 間距離を示しているし、共鳴ラマン分光解析の結果とも一致する。またこの結果は 5% の占有率ではあるがマルチプルコンフォーメーションを示して

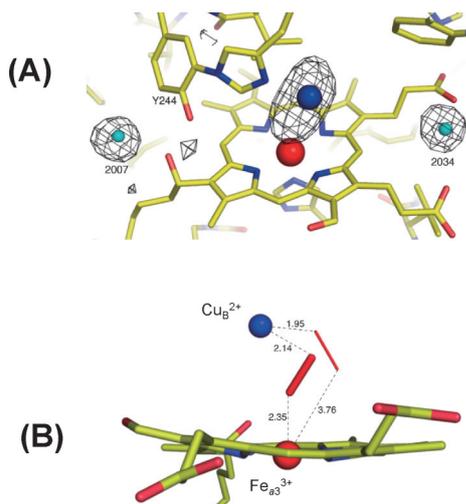


Fig. 6 (Color online) The X-ray structure of the O_2 reduction site of the resting oxidized CcO determined by SACLA.

(A) The F_o-F_c electron density maps. The figure shows also the positions of Cu_B (a dark blue sphere), Fe_{a3} (an orange sphere), fixed water molecules (blue small balls) and the structures of the amino acids and porphyrin near these metal sites. It should be noted that Cu_B is located outside the electron density of the peroxide between the two metal sites. The electron density peak intensity of the peroxide is almost 2 times as intense as those of the water molecules. A water molecule (37% occupancy) is hydrogen-bonded to the OH group of Y244. (B) The structure of the bridging peroxide which is shown by an orange stick of 1.55 Å. A small multiple conformer (5% occupancy) is detectable.

いた。 Fe_{a3} との距離が3.74 Åであるので、 μa_3 の励起による共鳴ラマン分光測定ではこのコンフォーマーの存在は検出できないと考えられる。上述の755 cm^{-1} の共鳴ラマンスペクトルは $-OOH$ よりは $O_2^{\cdot-}$ を示唆している¹⁾。したがって、 $Fe-O$ 距離(2.35 Å)は通常の配位結合としては長すぎるので Fe_{a3}^{3+} は高スピン状態であると考えられる。この結果は長期にわたるこの Fe_{a3}^{3+} の配位構造に関する議論に実験的に終止符を打つことのできる成果と言える²⁰⁾。

休止酸化型 CcO はプロトンポンプ機能を持たない1要因として $O_2^{\cdot-}$ が配位しているため、 Fe_a からの電子伝達を起動するためのN-sideから O_2 還元中心へのプロトン輸送が抑制されるためであると考えられる。しかし共鳴ラマン分光学的結果によれば、代謝回転中の酸化型酵素には OH^- が配位している($Fe_{a3}^{3+}F-OH$)ことを強く示唆している。さらに Cu_B^{2+} にも OH^- の配位が強く推定される。したがって、 $O_2^{\cdot-}$ と2(OH^-)とは負電荷の総量に大きな差がない。したがって代謝回転中の酸化型の高分解能構造を決定し、休止酸化型のそれと比較することにより、プロトンポンプ機構の理解に大きく貢献する構造情報が得られると予想できる。

CcOは上述の通りそれぞれ1電子授受を行う酸化還元中心を4カ所に持っているため、完全還元型(全酸化還

元中心が1電子当量を受容した状態)酵素1分子は1分子の O_2 を水にまで還元し、自身は完全酸化型となる。この完全酸化型は代謝回転中に生じる酸化型に等しい。したがって、1電子をこのようにして作られた酸化型に供与すると1当量のプロトンをポンプする。代謝回転中(cyt. cからの電子伝達が定期的に続けられている。)にはこのようにして完全酸化型にはすぐにcyt. cから電子が供与される。しかし、もし電子供与がない場合数分でプロトンポンプ機能が失われる。この結果は以下のように説明されている²¹⁾。代謝回転では酸素還元中心の2つの金属が2電子を受容した時 O_2 が結合することができる。この結合した O_2 は O_2 還元中心から4電子を取り組み、そのO-O二重結合が開裂する。その結果 O_2 還元中心が高酸化状態(Fe_{a3}^{3+} , Y244 Oラジカル)となりheme aからの電子伝達を効率化し、プロトンポンプを駆動する。完全還元型CcOと O_2 との反応では上述の高酸化状態にheme aと Cu_A からそれぞれ1電子が伝達され完全酸化型(Fe_{a3}^{3+} , Cu_B^{2+} , Y244 OH)となる。代謝回転中ではさらにcyt. cから2電子が供与され O_2 の結合できる還元型[Fe_{a3}^{2+} , Cu_B^{1+} , Y244 OH]になる。このcyt. cからの各1電子還元過程に1当量のプロトンポンプが共役している。完全酸化型では O_2 還元中心は高酸化状態ではないため、この還元に伴ってプロトンポンプを行うための自由エネルギーは電子伝達過程以外から供給しなければならないが、それは O_2 還元過程に伴う自由エネルギー変化で賄われるならば酸化還元中心以外の部位に保持されていると推定できる。このような高エネルギー状態は放置しておく熱振動により不活性化状態に移行すると考えられる。このため上述の電子供与が中断された時数分でプロトンポンプ機能を持たない完全酸化型(不活性化型)が生成すると主張されている。ただこの不活性化状態への移行に要する時間は数秒から数分との記述はあるが、精密な検討結果は報告されていない。更に、完全還元型を O_2 で酸化滴定した酸化型は過剰な O_2 に曝されていない限り瞬間的に休止酸化型(6電子当量が完全還元に必要な。)に移行するようなことは報告されていない¹³⁾。一方過剰の O_2 に30分程度接触して休止酸化型に移行が完了したと報告されているが、 O_2 接触時間の下限は詳細には検討されていない。上述の活性化/不活性化状態の主張には具体的な構造変化の予想は含まれていない。しかし、不活性化状態は休止酸化型であることは、その構造はともかく彼らの主張である。上述の結果は過酸化物の結合過程が不活性化型への移行過程であることを示している。したがって、上述の結果は活性化型/不活性化型という曖昧な概念を取り去り、化学構造に基づいた主張に進歩させたと言える。

上述の無損傷X線構造解析の成果はタンパク質の反応機構の理解はX線構造解析に律速されていることを示す典型的な一例である。一方、この成功はフェムト秒レベルでX線構造解析が可能であることを証明している。タン

パク質の駆動する生理機能に直接関連する化学反応はピコ秒より速いことはほとんどない。したがって、SACLA (XFEL) の20フェムト秒パルスによる上述のCcOの無損傷構造解析は上述の通りCcOの反応機構研究の進歩に大きく貢献しているが、この成果は20フェムト秒の時分割X線構造解析が原理的に可能であることを示しており、これは生命科学の革命を誘起することを期待させる。次章ではこの点について議論する。

7. ピコバイオロジー

生命現象はタンパク質の駆動する化学反応であると言える。したがってタンパク質の機能を化学反応として(原子の挙動として)理解することは生命現象の機構の解明と等価である。そのためにはタンパク質の機能中心を構成する原子の位置と化学反応性を決定し、それらの化学反応の進行に伴う時間変化を追跡しなければならない。原子の空間的位置は結晶構造解析により、化学反応性はその原子の持つ化学結合を赤外分光学的に解析することにより決定することができる (Fig. 7)。X線結晶構造解析により原子の位置は0.1 Å程度の精度で決定できるが、原子の化学反応性は化学結合距離を赤外分光法によるピコメートル (10⁻¹² m)以上の精度での解析により決定することができる。原子の化学反応性はピコメートルレベルの結合距離変化によっても大きく影響される。そこでピコメートルレベルの構造解析によって生命現象を化学反応として理解することを目指す学問分野を「ピコバイオロジー」と命名されている。しかし、赤外分光情報には化学結合の空間的位置情報が基本的に含まれていないし、X線結晶構造解析情報には化学反応性に関する情報は基本的には含まれていない。したがってタンパク質の機能中心の「どこにどのような化学反

応性をもつ原子が配置されているか」を知るためにはX線結晶構造解析と赤外分光解析の両方が必要である。したがってX線結晶構造解析と赤外分光解析とはピコバイオロジーの両輪であると言える。

タンパク質の機能中心はタンパク質の内部に埋め込まれている。そこではタンパク質外では実現が極めて困難な異方性が形成されていると予想される。例えば極性アミノ酸側鎖と無極性アミノ酸側鎖が近接して固定されて、空間的に異方性を持つ化学反応性を実現している。このような反応環境をタンパク質外に設営することが困難であるため、このような環境での化学反応の研究はタンパク質外ではほとんどなされていなかったと考えられる。したがってタンパク質外での化学反応の研究にもとづいて構築された「化学」の言葉だけでは説明できない可能性が高い。そのときは化学の語彙を拡張する(化学を進歩させる)必要がある。従ってこのとき化学と生物学が融合する。(化学の進歩が生物学の進歩をもたらす。逆もまた真である。したがって、化学と生物学の区別が不要になる。)これがピコバイオロジーの究極の目標である。

ピコバイオロジーは次のようにして推進される。目的とする生命現象の個体、細胞レベルの解析にもとづいてそれを駆動しているタンパク質(タンパク質群)を同定する。次にそのタンパク質を組織、細胞から単離精製する条件を確立する。続いて精製タンパク質の赤外分光法等による機能解析とともに、結晶化を行いX線構造解析等の方法によりタンパク質の構造決定を進める。この段階の研究ではX線結晶構造解析情報にもとづいてタンパク質の精製条件を改良する必要が生じたりする可能性もあり、単純に上述のような段階を踏んで推進することができることはむしろ少ないと考えられる。このようにして解明されたタンパク質(タンパク質群)の反応機構にもとづいて個体レベル、細胞レベルの生理現象の化学的解明を目指す。特にこの段階ではピコバイオロジー理念を十分理解した計算科学研究グループとの連携が重要になる。このピコバイオロジー推進過程で個体、細胞レベルからタンパク質の単離精製までは細胞生物学、それ以後は構造生物学とほぼ対応している。これらは特にその手法に大きな差異があるため、別々の研究グループで推進されることが多かった。しかし細胞生物学研究に構造生物学的視野が欠落すると実験結果に対する学術的意義づけが不十分になり、応用の可能性ばかりが追及される。一方構造生物学研究に細胞生物学的視点が欠落すると、構造解析精度を高めるために研究対象のタンパク質を選抜し高精度ではあるが生物学的意義のない結果について仲間うちで褒め合うだけになってしまう。

上述の通りピコバイオロジー推進の両輪である赤外分光解析とX線結晶構造解析のタンパク質の構造機能解析への適用は最近になってはじめて可能になったため、ピコバイオロジーの認知度が低いのは当然であろう。

タンパク質は水中で生理機能を発揮する。しかし、赤外

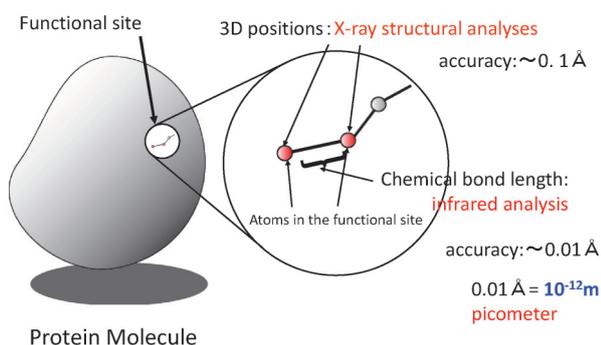


Fig. 7 (Color online) Determination of the structure of the functional site of a protein molecule.

The location of the atoms in the functional site of a protein is obtainable by various crystallographic analyses (typically X-ray and neutron diffraction analyses). Vibrational analyses (typically, infrared analyses) determines the chemical bond length at the accuracy of .01 Å (picometer) or higher. Chemical properties of each atom are easily influenced by the bond length changes smaller than picometers.

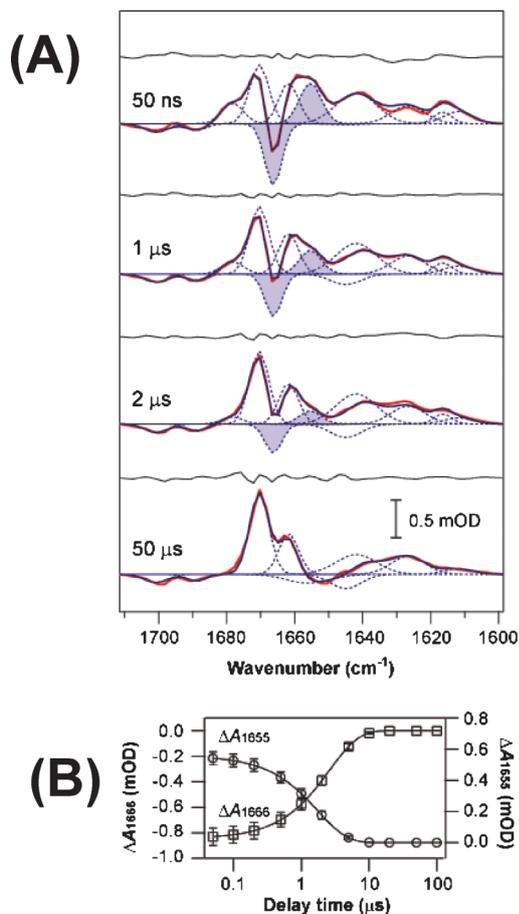


Fig. 8 (Color online) Time-resolved infrared analysis of the fully reduced CcO after CO release by a flash photolysis technique.

(A) Infrared spectral changes in the region including amide I and II regions after CO flash against the spectrum before the flashes are given in solid curves. The infrared bands deduced from the SVD analyses are given in dotted lines. The most prominent change giving the peak at 1655 cm^{-1} and the trough at 1666 cm^{-1} has been shadowed. (B) The time courses of the trough at 1655 cm^{-1} and peak at 1666 cm^{-1} are given in (B).

分光は、水が強い赤外吸収を示すため、水溶液中のタンパク質の赤外吸収スペクトル測定は、通常の水溶液系の測定のための装置では不可能である。そこでフェムト秒レーザーにより強力な赤外光源を開発するとともに高感度の赤外検知器を導入し、軽水の最も高い吸収帯と重複するアミド I 帯で 1 残基のペプチド C=O の伸縮振動スペクトルを 10% の精度で測定が可能な時分割赤外分光装置が開発された²²⁾。この装置を利用してウシ心筋 CcO の CO 結合化型の光解離に伴う赤外吸収スペクトル変化がナノ秒レベルで追跡された (Fig. 8A)。この結果の SVD 解析により最も顕著なスペクトル変化として 1655 cm^{-1} から 1666 cm^{-1} への遷移が認められた (Fig. 8A, B)。この変化は α -helix から離脱し bulge (出っ張り) と呼ばれる構造が一時的に出現したことを示している。このような可逆的な bulge 形成

は S382 を含むセグメントでしか認められないことが X 線構造から明らかである。CO 光解離直後には CO は O_2 還元中心の Cu_B に $\text{Fe}_{\text{a}3}$ から伝達され (50 ナノ秒以内に)、それに共役して上述の bulge が一時的に helix に組み込まれる。この S382 は CcO のプロトンポンプ経路 (H-pathway) の水チャンネル (このチャンネルを経由して水分子によりプロトンが輸送される。) の開閉を司っている (Fig. 9)。この時間分解赤外分光法によってとらえられた中間体の構造は N-side からのプロトン取り込みを促進すると考えられる (Fig. 9 intermediate state)。この成果は長年の水溶液中の赤外分光は不可能であるとの常識をくつがえし、ピコバイオロジー推進の両輪の一方が稼働を開始したことを示している。

もう一方の技術である X 線結晶構造解析は結晶調整法、X 線回折実験法、X 線構造解析法の近年の長足の進歩の結果、細胞生物学研究室でも活発に推進されることが珍しくなくなっている。しかし時分割構造解析のための試みはラウエ法をはじめとして長年の組織的な努力にもかかわらず十分な精度と時間分解能が得られていなかった。このことがピコバイオロジー推進の大きな障害であった。これまではタンパク質の駆動する反応過程の中間体を種々の方法で人工的に固定し、その固定化タンパク質の X 線構造を決定し、反応機構を推定するしか方法がなかった。しかし、この方法ではたとえば、上述のような一時的に出現する中間体をとらえることは不可能である。これもピコバイオロジーの認知度が低い要因の 1 つである。上述の、最近のフェムト秒レーザー結晶構造解析法の確立の意義はピコバイオロジー推進の視点からも、はかりしれないと言える。

8. 高分解能 X 線構造解析

ピコバイオロジーの究極の目標の一つはタンパク質外では実現できない反応環境でのタンパク質外の化学反応研究に基づいた既存の化学の語彙だけでは解明できない化学反応の機構を既存の化学の語彙を拡大することによって解明することである。中程度 ($2\sim 3\text{ \AA}$) の分解能の電子密度に基づく X 線構造解析はタンパク質外で精密に決定されたアミノ酸側鎖の立体構造を電子密度に当てはめて最も実測電子密度マップとの差が小さい構造を導き出すことと言える。したがって、このようにして得られた構造は結局タンパク質外のアミノ酸の構造の線型結合でしかない。タンパク質内では上述の通り、タンパク質外では実現が不可能に近い異方性が形成されており、そのような環境ではタンパク質外の水溶液中で認められる構造とは異なる立体構造が実現している可能性が高い。そのようなアミノ酸側鎖こそがタンパク質外では実現不可能な高い効率と高い特異性の実現に寄与していると考えられる。このようなタンパク質の機能を検出するためには、水溶液中の構造を当てはめ

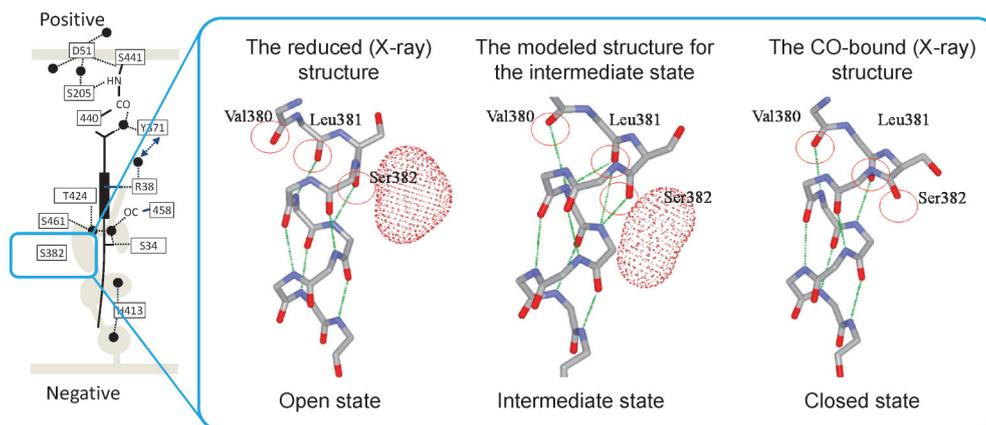


Fig. 9 (Color online) The proton uptake mechanism by S382 in the water channel of H-pathway. In bovine heart CcO, protons are pumped through H-pathway which is composed of the hydrogen bond network in the upper half and the water channel, through which water molecules in N-side phase transfer protons from N-side to the O₂ reduction site. The water channel is shadowed. The spheres and ovals denote water cavities in which at least one water molecule can be trapped. Thus, these water cavities accelerate the water exchange between the water channel and the N-side phase. The S382-containing water cavity is eliminated upon CO-binding, which gives a conformational change shown by the open state to the closed state. A possible intermediate state structure has been deduced theoretically from the infrared results, X-ray studies of the open closed states. The dotted surfaces denote cavities in which at least one water molecules can be stored.

るような経験的方法を排除するために高分解能の X 線回折実験を行うことが最も重要である。最近膨大な数の X 線構造解析結果が報告されているがこのような視点に基づく研究姿勢の研究グループは極めて少数であり、水溶液中のアミノ酸の構造の線型結合（既存の化学で既述できる化学反応性の“線型結合”）で満足せざるを得ないような報告がほとんどである。このような研究からは既存の化学の語彙だけでは解明できない化学反応が発見されることは、“線型結合”である限り、ありえないことになる。勿論タンパク質の機能は既存の化学の言葉だけで完全に記述できる可能性は否定できない。一方非経験的に立体構造を決定するには第一に超高分解能の X 線回折データの収集が必要である。しかし、そのために必要な労力を見積もることは不可能である。コストパフォーマンスを考慮するならばこのような研究はまさに危険な賭けである。しかし、学問の飛躍的進歩は少数の地味で長年にわたる“非常識”な努力によりもたらされることが少なくないことは事実であろう。

9. おわりに

第3世代の放射光施設を利用したタンパク質 X 線構造解析の生命科学への寄与は近年ますます大きくなってきている。強力な X 線は高分解能の構造解析には不可欠であるが、X 線照射によるタンパク質への損傷は X 線照射が強ければ強いほど無視できなくなる。実際本誌説 Fig. 4 に示されたような、X 線照射後の休止酸化型のスペクトルは照射前と似ても似つかないものである。しかし、その X 線構造解析結果は無損傷構造と一見大きくは違わな

かった。しかし、この架橋過酸化物の O-O 原子間距離 0.2 Å の差はその化学反応性の大きな差異を示す。この過酸化物は放射線感受性が強いので、このように明確な X 線損傷効果が検出された。しかし、この分解能では検出できないが他の部分にも微小な損傷があると推定できる。今後、より高分解能での構造解析の際には、この過酸化物での場合のようにそれら微小な損傷が無視できなくなる。したがって、SACLA (XFEL) による無損傷構造解析の重要性は、前述の時分割構造解析のためだけでなく、この視点からも今後益々高まると考えられる。

謝辞

本研究はグローバル COE プログラム、ターゲット蛋白プログラム、文部科学省科研費基盤 (A) 2247012, (B) 26234567, JST および CREST からの支援を受けて遂行された。著者は理化学研究所客員主幹研究員である。

参考文献

- 1) S. Yoshikawa and A. Shimada: Chem. Rev, in press (2015).
- 2) K. Shinzawa-Itoh, H. Aoyama, K. Muramoto, H. Terada, T. Kurauchi, Y. Tadehara, A. Yamasaki, T. Sugimura, S. Kuro-no, K. Tsujimoto, T. Mizushima, E. Yamashita, T. Tsukihara and S. Yoshikawa: EMBO J. **26**, 1713 (2007).
- 3) E. Pilet, A. Jasaitis, U. Liebl and M. H. Vos: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **101**, 16198 (2004).
- 4) I. Belevich, D. A. Bloch, N. Belevich, M. Wikström and M. I. Verkhovskiy: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **104**, 2685 (2007).
- 5) G. T. Babcock and P. M. Callahan: Biochemistry **22**, 2314 (1983).
- 6) M. Sassaroli, Y. C. Ching, S. Dasgupta and D. L. Rousseau: Biochemistry **28**, 3128 (1989).

- 7) 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: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **100**, 15304 (2003).
- 8) K. Shimokata, Y. Katayama, H. Murayama, M. Suematsu, T. Tsukihara, K. Muramoto, H. Aoyama, S. Yoshikawa and H. Shimada: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **104**, 4200 (2007).
- 9) K. Muramoto, K. Ohta, K. Shinzawa-Itoh, K. Kanda, M. Taniguchi, H. Nabekura, E. Yamashita, T. Tsukihara and S. Yoshikawa: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **107**, 7740 (2010).
- 10) M.I. Verkhovskiy, A. Tuukkanen, C. Backgren, A. Puustinen and M. Wikström: Biochemistry **40**, 7077 (2001).
- 11) A. J. Moody: Biochim. Biophys. Acta **1276**, 6 (1996).
- 12) M. R. Cheesman, V. S. Oganessian, N. J. Watmough, C. S. Butler and A. J. Thomson: J. Am. Chem. Soc. **126**, 4157 (2004).
- 13) M. Mochizuki, H. Aoyama, K. Shinzawa-Itoh, T. Usui, T. Tsukihara and S. Yoshikawa: J. Biol. Chem. **274**, 33403 (1999).
- 14) M. Wikström: Biochim. Biophys. Acta **1817**, 468 (2012).
- 15) M. Sakaguchi, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa and T. Ogura: J. Bioenerg. Biomembr. **42**, 241 (2010).
- 16) H. Aoyama, K. Muramoto, K. Shinzawa-Itoh, K. Hirata, E. Yamashita, T. Tsukihara, T. Ogura and S. Yoshikawa: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **106**, 2165 (2009).
- 17) L. Qin, C. Hiser, A. Mulichak, R. M. Garavito and S. Ferguson-Miller: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **103**, 16117 (2006).
- 18) J. Koepke, E. Olkhova, H. Angerer, H. Müller, G. Peng and H. Michel: Biochim. Biophys. Acta **1787**, 635 (2009).
- 19) T. Tiefenbrunn, W. Liu, Y. Chen, V. Katritch, C. D. Stout, J. A. Fee and V. Cherezov: PLoS One **6**, e22348 (2011).
- 20) K. Hirata, K. Shinzawa-Itoh, N. Yano, S. Takemura, K. Kato, M. Hatanaka, K. Muramoto, T. Kawahara, T. Tsukihara, E. Yamashita, K. Tono, G. Ueno, T. Hikima, H. Murakami, Y. Inubushi, M. Yabashi, T. Ishikawa, M. Yamamoto, T. Ogura, H. Sugimoto, JR. Shen, S. Yoshikawa and H. Ago: Nat. Methods **11**, 734 (2014).
- 21) D. Bloch, I. Belevich, A. Jasaitis, C. Ribacka, A. Puustinen, M. I. Verkhovskiy and M. Wikström: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **101**, 529 (2004).
- 22) M. Kubo, S. Nakashima, S. Yamaguchi, T. Ogura, M. Mochizuki, J. Kang, M. Tateno, K. Shinzawa-Itoh, K. Kato and S. Yoshikawa: J. Biol. Chem. **288**, 30259 (2013).

著者紹介



吉川 信也

兵庫県立大学大学院生命理学研究科ピコバイオロジー研究所 特任教授
E-mail: yoshi@sci.u-hyogo.ac.jp
専門: 生物化学

【略歴】

1970年3月大阪大学大学院理学研究科生物化学専攻博士課程単位取得満期退学。1970年12月理学博士（大阪大学）。1972年甲南大学理学部生物学科講師，助教授を経て1983年教授。1988年姫路工業大学工学基礎研究所教授，1990年同理学部教授，2004年兵庫県立大学大学院生命理学研究科生命科学専攻教授（県立大学統合に伴う名称変更），2011年同専攻定年退職。2011年より現職。（1974-1995年米国コロラド州立大，生化学科客員教授兼務）

A damage-free structural determination of the highly X-ray irradiation-sensitive active site of bovine heart cytochrome *c* oxidase by the femtosecond X-ray laser crystallography using SACLA

Shinya YOSHIKAWA Picobiology Institute, Graduate School of Life Science, University of Hyogo, 3-2-1 Koto Kamigori Akoh Hyogo 678-1297, Japan

Abstract A peroxide-like ligand in the O₂ reduction site of the fully oxidized bovine heart cytochrome *c* oxidase (CcO) as isolated blocks the proton pump activity of CcO. High resolution structural determination of the ligand-bound O₂ reduction site was essentially impossible because of the high sensitivity of the bound ligand to X-ray irradiation. The present high resolution and damage-free determination of the site by the femtosecond X-ray crystallographic analysis using SACLA, an X-ray free electron laser facility, has provided various insights for the mechanism of proton pump. Furthermore, the successful determination by femtosecond level X-ray irradiation assures that X-ray structural changes during the physiological processes driven by proteins are able to be followed with the time resolution sufficiently high for following any physiologically relevant process in the protein. The concept of Picobiology, for which the present newly developed time-resolved X-ray structural technique together with a recently established time-resolved infrared spectroscopy are prerequisite, is introduced for showing the importance of the femtosecond X-ray laser crystallography for understanding of Life Process.