

シトクロム c 酸化酵素 Cu_B サイトモデル

分子の紫外共鳴ラマンスペクトル

(統合バイオ¹, 九大先導研²)○長野 恭朋¹, 北川 禎三¹, 成田 吉徳², 劉 劉剛²

【序】シトクロム c 酸化酵素はミトコンドリア内膜に存在する、呼吸鎖電子伝達系末端に位置する酵素であり、酸素分子を水に還元する反応を触媒する。還元反応はプロトンの能動輸送と共役しており、プロトン輸送の結果生じる電気化学ポテンシャルは、ADP から ATP を合成するのに用いられる。シトクロム c 酸化酵素による酸素還元は、二つ存在するヘム鉄のうちのヘム a₃ で進行する。実際の反応においては、考え得る様々な活性酸素種が放出されることなく酸化還元反応が行われるので、ヘム a₃ 近傍に位置する Cu_B サイトやチロシンが重要な役割を担っていると考えられる。シトクロム c 酸化酵素中においては、翻訳後修飾により、Cu_B に配位しているヒスチジンがチロシンと共有結合を形成しており、そのチロシンは P 中間体において 1 酸化当量を持つことが提案されている[1,2]。

そこで、本研究では、酸素還元反応における Cu_B サイトの機能解明を目指し、その基礎的構造と反応特性を明らかにするため、図 1 に示すモデル分子 **1** の紫外共鳴ラマン測定を行った。

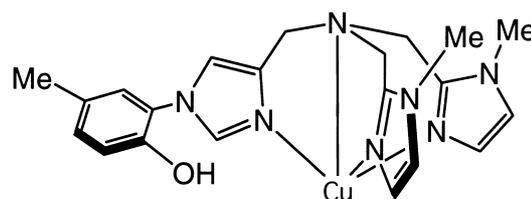
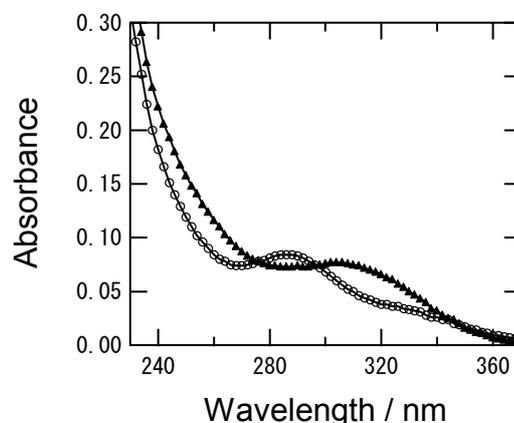
【実験】紫外共鳴ラマンの光源として、エキシマーレーザー (XeCl, 308 nm) 励起色素レーザー (クマリン 480, 480 nm) の第二高調波、240 nm を用いた。石英セル自身の信号を除くため、後方散乱された光をダブル分光器で分散した後、インテンシファイヤー付きフォトダイオードアレイでラマン散乱を検出した[3]。

【結果と考察】 1. 吸収スペクトル

図 2 に、中性 (○) 及び塩基性 (▲) 条件下で得られた **1** の UV 吸収スペクトルを示す。それぞれの条件下において、284 nm、304 nm に現れたバンドをフェノール部分の L_b 遷移と帰属した。pH 増加による L_b 遷移の長波長シフトはアニオンの生成を示す[4]。

2. 紫外共鳴ラマンスペクトル

異なる pH 水溶液中においてラマン測定を行い、中性種(a)とアニオン種(b)の紫外共鳴ラマンスペクトルを得た (図 3)。比較のため p-クレゾールのスペクトルも共に示した (図

図 1: モデル分子 **1** の分子構造。図 2: 25 μM 水溶液中のモデル分子 **1** の吸収スペクトル。

○: pH 6.4, ▲: pH13

3 c-e)。モデル 1 について、観測されたほとんどのラマンバンドは pH の増加と共に数波数の低波数シフトを示したが、pH 変化によるスペクトルの違いは小さく、フェノール性水酸基の脱プロトン化による構造の変化は小さいと考えられる。関連化合物の X 線構造解析の結果は、共有結合で結合したフェニル基とイミダゾール基の二面角は約 40 度であり、結晶中では二つの基は共役していないと考えられる [5]。一方、中性、塩基性それぞれの pH 条件下で、フェノール部分のバンド(8a)と共に、イミダゾール基由来と思われるラマンバンドが観測された。

また、p-クレゾールの場合、塩基性条件下において、高エネルギーのレーザー照射により、中性ラジカルが生成する(図 3 e) [4]。しかしながら、モデル 1 については、まだ、満足いく中性ラジカルスペクトルを得るには至っておらず、測定条件を探索すると共に、観測されたラマンバンドの帰属のため、DFT 計算を現在実行中である。

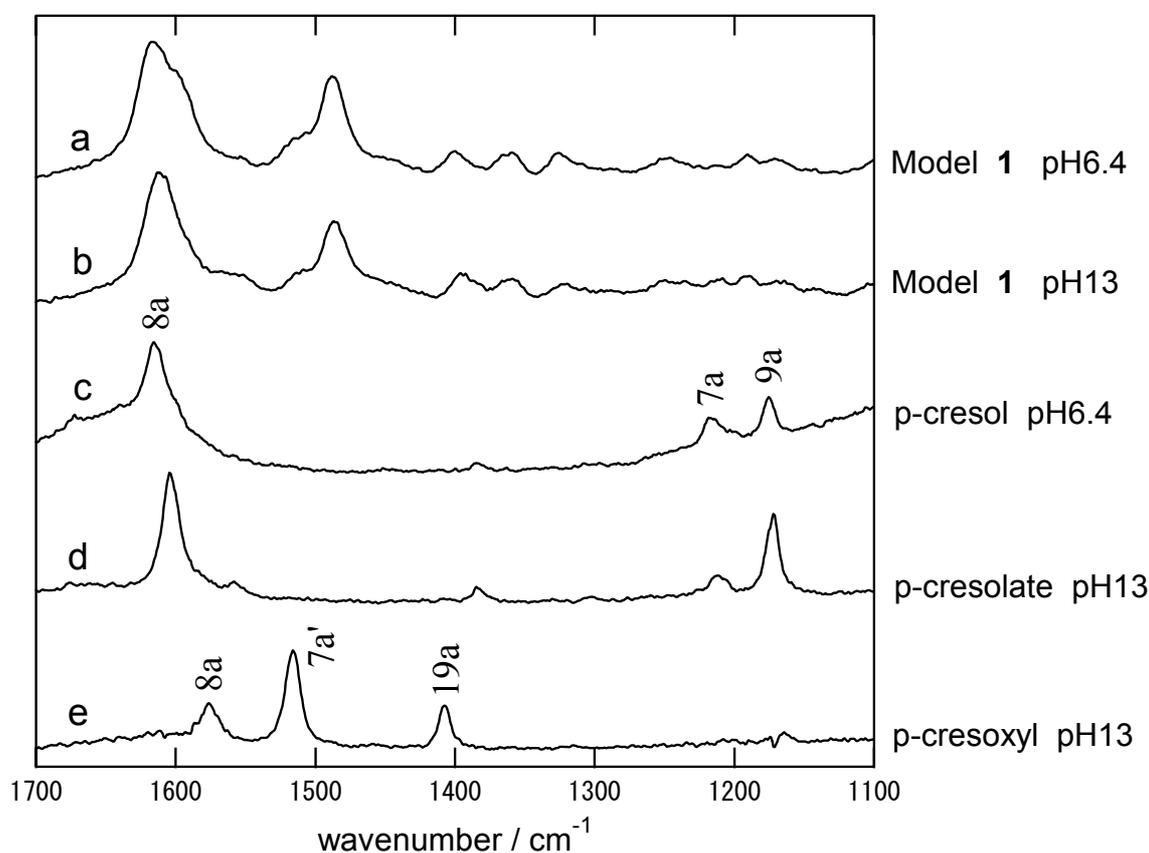


図 3 : モデル 1 及び p-クレゾールの紫外共鳴ラマンスペクトル

【参考文献】

- [1] S. Yoshikawa *et al.*, *Science* **280**, 1723-1729 (1998). [2] T. Kitagawa *J. Inorg. Biochem.* **82**, 9-18 (2000). [3] S. Kaminaka *et al.*, *Appl. Spectrosc.* **46**, 1804-1808 (1992). [4] M. Aki *et al.*, *J. Phys. Chem. A* **106**, 3436-3444 (2002). [5] Y. Naruta *et al.*, *Acta Cryst.* **E57**, o550-o552 (2001).