2A09 シトクロム c 酸化酵素 Cu_B サイトモデル錯体の反応性と
紫外共鳴ラマンバンド強度の励起波長依存性
(岡崎統合バイオ¹, 九大先導研²) 長野 恭朋¹, 北川 禎三¹, 成田 吉徳², 劉 勁剛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



図 1: モデル分子 (Cu^{II}-TImA)の分子構造。

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ことから、 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(Cu^{II}-TImA)及び関連分子につ いて、幾つかの波長を用いて紫外共鳴ラマン測定を行った。



図 2 240 nm 励起により観測された Cu^{II}-TImA と 関連分子の紫外共鳴ラマンスペクトル。

【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(440 – 580 nm)の第二高調波(220, 232, 240, 250, 270, 280, 290 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】<u>1. 紫外共鳴ラマンスペクトル</u> 中性水溶液中において観測された Cu^{II}-TImA、 Zn^{II}-TImA、TImA、及び TImA を構成するモデ ル分子の紫外共鳴ラマンスペクトルを図 2 に 示す。Cu^{II}-TImA について、1617、1597、1488 cm⁻¹ に強いラマンバンドが現れ、中波数から 低波数領域にかけても、イミダゾール環由来 と思われるバンドが観測された(図 2a)。また、 p-クレゾールについて観測された7a、9a に対 応するバンドは TImA 類では観測されなかっ た(図 2a-d)。関連分子との比較及び DFT 法に よる振動計算の結果から 1617、1597、1488 cm⁻¹ のラマンバンドをそれぞれフェノール部分の



図 3 pH 6.4 水溶液中における Cu^{II}-TImA 紫 外共鳴ラマンスペクトルの励起波長依存性。



図 4 240 nm 励起による Zn^{II}-TImA の紫外 共鳴ラマンスペクトル。

8a、8b、イミダゾール環の振動と帰属した。240 nm 励起において通常8bの強度は小さいが、分子拡張 に伴う対称性の低下や電子励起状態のシフトによ り強度を獲得したと推測される。

2. 励起波長依存性

幾つかの異なる励起波長において得られた中性水 溶液中 (pH 6.4) における Cu^{II}-TImA の紫外共鳴ラ マンスペクトルを図 3 に示す。励起波長が短波長 になるに従い、全体的にラマン散乱強度は増加す る傾向にあり、長波長励起では蛍光によるベース ラインの歪みが見られた。また、短波長励起に伴 い、イミダゾール環由来の 1488 cm⁻¹の強度増大が 特に顕著に現れ、8aと8bの強度比も若干変化した。 これらの結果は塩基性水溶液中においてや、

Zn^{II}-TImA と TImA についても同様に観測された。 イミダゾールのラマン強度は p-クレゾールに比べ ると極めて小さいため、観測されないのが通常で あるが、1488 cm⁻¹バンドの強度は 8a に比べて約 2 倍であった。使用した波長領域においては p-クレ ゾール部分の La、Lb吸収帯を主に励起していると 考えられるが、紫外可視吸収スペクトルからは電 荷移動などの別の吸収帯の存在も示唆される。 1488 cm⁻¹バンドのラマン強度増大の機構について は現在検討中である。

<u>3. 反応性</u>

水溶液中において、フェノール類に高エネル ギーの紫外レーザー光を照射すると、光イオン化 により中性ラジカルが生成する[4]。240 nm 強励 起により観測された Zn^{II}-TImA の紫外共鳴ラマン スペクトルを図 4c に示す。比較のため、中性、塩 基性条件下において弱励起により得られたスペク トルも示す(図4a,b)。強励起の場合、フェノール 類に特徴的な環伸縮(8a)、C-O伸縮(7a')、C-C伸縮 (19a)に帰属されるラマンバンドが、それぞれ1587、 1531、1417 cm⁻¹に観測された(図4c)。一方、メ タルフリーの TImA についても、中性ラジカルの 生成を示す類似のスペクトルが観測された。しか しながら Cu^{II}-TImA についてはラジカルの信号を 検出できなかったことから、電子が Cu^{II}サイトに トラップされていることが示唆される。

【参考文献】

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).