

Resonance Raman study of cytochrome *c* oxidase reconstituted in phospholipids vesicles

「リン脂質二重膜小胞に再構成したチトクロム*c*酸化酵素の共鳴ラマン分光法による研究」

2014 年度

野村 高志

兵庫県立大学大学院生命理学研究科 生体物質構造学II

序文	1
序章	2
第一章 COVの調製	13
1-1目的	14
1-2 方法	14
1-3 結果	19
1-4 考察	26
第二章 吸収、ラマンスペクトル同時測定装置の開発	27
2-1 目的	28
2-2 装置概要	28
2-3 安定性の検証	32
第三章 Rhodamine123による膜電位 ( $\Delta\Psi$ ) の検出	34
3-1目的	35
3-2 方法	35
3-3 結果と考察	36
第四章 共鳴ラマンスペクトルの測定	40
4-1 目的	41
4-2 方法	41
4-3 結果と考察	43
第五章 総括	54
第六章 参考文献	56
第七章 付録	60
第八章 謝辞	63

略号一覧

$\Delta\mu_{\text{H}^+}$  : proton motive force、プロトン駆動力

$\Delta\Psi$  : membrane potential、膜電位

$\Delta\text{pH}$  : proton gradient、プロトン濃度勾配

Asc : ascorbic acid、アスコルビン酸

CcO : cytochrome *c* oxidase、チトクロム*c*酸化酵素

CL : cardiolipin

COV : cytochrome *c* oxidase reconstituted in phospholipid vesicles

FCCP : carbonyl cyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone

PC : L- $\alpha$ -phosphatidylcholine

PE : L- $\alpha$ -phosphatidylethanolamine

RCR : respiratory control ratio、呼吸調節率

cyt.*c* : cytochrome *c*

# 序文

好氣的生物は解糖系とクエン酸回路による糖の二酸化炭素への完全酸化により得られた電子を利用してエネルギーを獲得する。この電子は呼吸鎖電子伝達系において酸素の還元を用いられる。電子を直接酸素に渡し還元するとエネルギーは熱として散逸する。そこで、電子伝達系において段階的に電子伝達、酸素の還元を行い、各段階で遊離した自由エネルギーをATPの形で蓄え、生体中の様々な場面で利用する。

電子伝達系はミトコンドリア内膜（細菌では細胞膜）に存在し、NADH dehydrogenaseで解糖系、クエン酸回路によって生じたNADHから電子を得ることから始まる。NADH dehydrogenase、*bc<sub>1</sub>* complex、CcO (cytochrome *c* oxidase) のそれぞれの複合体で電子伝達に共役したプロトンポンプによりプロトンをマトリクス側から膜間腔側へ輸送する。最終的に末端のCcOにより電子は酸素に渡り、酸素は水に還元される。電子伝達反応に共役するプロトンポンプにより生成したプロトン駆動力（膜電位とプロトン濃度勾配からなる）がATP synthase (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-プロトンATP合成酵素) を駆動し、ADPと無機リン酸からATPを合成する。電子伝達速度はADP濃度に依存し、ADP濃度が高いと電子伝達速度が大きく、ADP濃度が低いと遅くなる。これは”呼吸調節”と呼ばれている。この現象は1950年代に見出され、プロトン駆動力が電子伝達速度に影響を与えることは分かっており、それはタンパク質の構造への影響と考えられるが、その詳細は不明である。そこで、本研究では呼吸調節の仕組みを分子構造に基づいて解明する。

電子伝達系の末端に存在するCcOは上述の通り酸素を還元するとともにプロトンをポンプする。電子供与体のcyt.*c* (cytochrome *c*) からCcOへの電子伝達速度はプロトン駆動力により制御されている。プロトン駆動力がCcOの分子構造に何らかの変化を引き起こし、その電子伝達速度を調節して呼吸調節を行っている事が考えられる。呼吸調節に関わる部位は酸素還元反応、プロトンポンプ自体に関わる部位である可能性が高く、その仕組みを解明することは、長年議論されてきたCcOのプロトンポンプの仕組みの解明に繋がると考えられる。このプロトン駆動力の影響を調べる為、本研究ではCcOをリン脂質二重膜小胞に再構成したCOV (Cytochrome *c* Oxidase Reconstituted in Phospholipid Vesicles) を用いた。このような系でプロトン駆動力を伴った状態の分子構造を明らかにするには共鳴ラマン分光法が最も有効な手段である。共鳴ラマン分光法は特定の分子の発色団の吸収帯に合わせて励起することでその特定の構造を取り出し、詳細に調べることができる。これはCOVのようにタンパク質以外にベシクルなどを含む大きな構造を持つ系に対して非常に強力な解析手法になり得る。また、共鳴ラマン分光法を用いると、タンパク質の構造を生きた（機能を保った）状態での構造解析が可能である。共鳴ラマンスペクトルには原子間の結合の距離や角度、電子状態など多くの情報を得ることが出来る。原子間の距離や角度は分子との親和性などの影響を鋭敏に反映しているために、タンパク質の反応を解明するには必要不可欠である。

本研究では共鳴ラマン分光法を適応可能なCOVの調製法を確立し、COVについて共鳴ラマンスペクトルの測定を行うことで、これまでに報告されてきた可溶化のCcOと共鳴ラマンスペクトルを比較することや、プロトン駆動力が生じている時の共鳴ラマンスペクトルから呼吸調節の解明を目指した。

本研究を通してCOVのような大きな構造を持つ系の構造学的研究手法を確立出来れば、その他の膜タンパク質の再構成系やミトコンドリアのような複雑な系などこれまで困難であった系をより詳しく研究する基盤が出来るのではないかと考えられる。

# 序章

## 呼吸鎖電子伝達系

Figure 0-1にミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系の模式図を示す。呼吸鎖電子伝達系はミトコンドリア中で酸素を還元する反応によって生成したプロトン駆動力 ( $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ ) を利用しATPを合成する。呼吸基質から遊離された電子はNADH dehydrogenase、 $bc_1$  complex、Cytochrome *c* (cyt.*c*)、Cytochrome *c* Oxidase (CcO) を経て分子状酸素まで伝達される。それぞれの複合体がプロトンをポンプし、 $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ を発生する。 $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ は $\Delta\text{pH}$  (プロトン濃度勾配)、 $\Delta\Psi$  (膜電位) からなり、「 $\Delta\mu_{\text{H}^+} (\text{mV}) = \Delta\Psi - 2.3RT/F \cdot \Delta\text{pH}$ 」である。<sup>[1]</sup> この $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ を利用し、 $F_0F_1$ ATPaseを駆動し、ATPを合成する。ADP濃度は電子伝達速度およびATP生成速度を調節している。呼吸基質とリン酸の供給が十分であれば、ミトコンドリアの最大酸素消費速度はADP濃度が高く、ATP濃度が低い時にみられる。逆の場合では酸素消費速度は最大値の5~10%になる。これは呼吸の受容体調節 (acceptor control) と呼ばれている。<sup>[2-5]</sup> また、ATPを添加することで還元型 cyt.*c*から $\text{NAD}^+$ への逆向き電子伝達も起こる。<sup>[6]</sup> このように電子伝達速度はADP濃度により制御され、この現象は”呼吸調節”と呼ばれている。

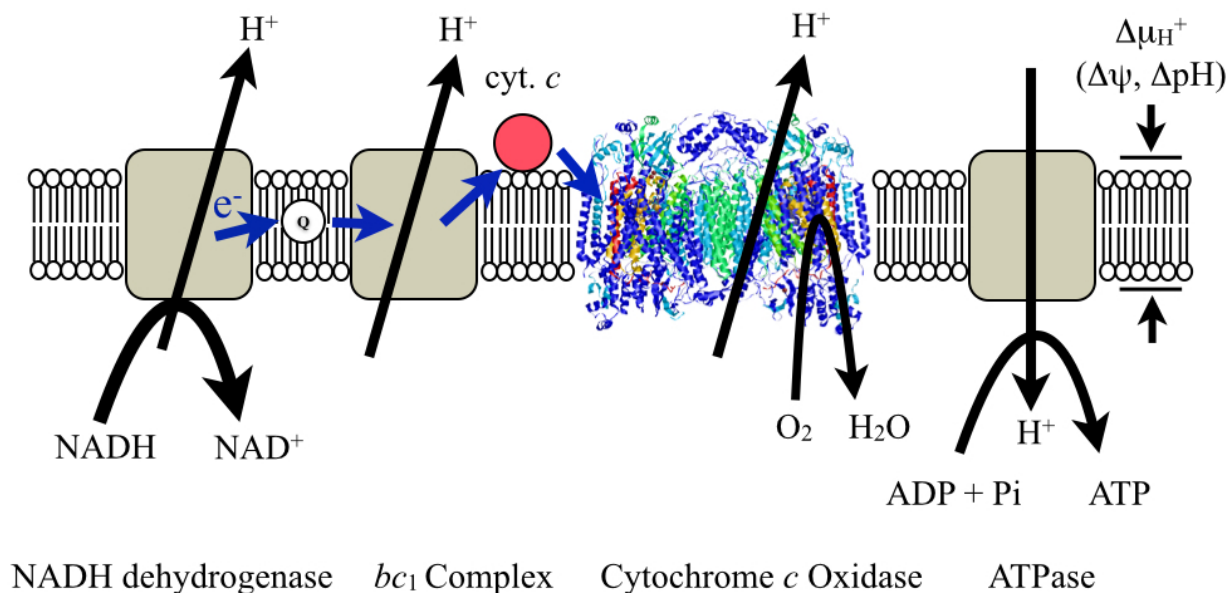


Figure 0-1  
ミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系の模式図

## Cytochrome *c* Oxidase (CcO)

CcOは電子伝達系の末端酵素で、分子状酸素を水にまで還元し、それと共役してプロトンをポンプする。この酵素のプロトンポンプ機能は1977年にMarten K. F. Wikstromによりラットのミトコンドリアを用いて $\Delta pH$ をモニタした実験により初めて示された<sup>[7]</sup>。CcOの酸素還元反応について特筆すべき事は、細胞にとって”毒”になる活性酸素種を一切出さないことにある。酸素の還元に使われる電子は膜間スペースのcyt.*c*より供給され、プロトンはマトリクスから供給される。酸素還元反応速度が還元型、酸化型cyt.*c*の濃度の比率によって制御され<sup>[8]</sup>、それに伴い $\Delta\mu_H^+$ も制御される。

CcOはX線結晶構造解析<sup>[9, 10]</sup>により、その酸化還元部位に2つのhemeと2つのcopper siteを持っている事がわかっている。ミトコンドリアのCcOは2つのheme Aを補欠分子として持っており、その構造は2位に長いアルキル側鎖、8位に電子求引性のホルミル基がある。CcOのhemeのうち一方は2つのヒスチジンが配位し、もう一方はヒスチジンが1つだけ配位している。前者をheme *a* (Figure 0-2左側) と呼び、プロトンポンプを駆動すると提唱されている。後者はheme *a*<sub>3</sub> (Figure 0-2右側) と呼び、O<sub>2</sub>、及び呼吸阻害剤のCO、CN<sup>-</sup>、N<sub>3</sub><sup>-</sup>の結合部位である。電子は還元型cyt.*c*からCu<sub>A</sub>、heme *a*を経由してheme *a*<sub>3</sub>に伝達される。<sup>[11]</sup>

プロトンの経路は3つあり、2つはO<sub>2</sub>の還元に使われるためのもの、もう1つは膜を介したプロトンポンプを行う経路である。膜を介したプロトンポンプ経路はH-pathwayと呼ばれている。H-pathwayのコンフォメーション変化の模式図をFigure 0-3<sup>[10]</sup> に示す。左から酸化型、COもしくはNO結合型、完全還元型もしくは完全還元CN結合型である。赤と青で記した場所はheme *a* の酸化に関係する水分子の位置で、黒丸は金属サイトの酸化に無関係な水分子である。中央部の黒で書かれた部分はheme *a*とその側鎖である。このようにプロトンポンプはX線結晶構造解析によりその経路が示唆されているものの、これを決定づける証拠は未だ見つかっていない。

CcOの反応サイクルは共鳴ラマン分光法により詳細に調べられており<sup>[12-15]</sup>、Figure 0-4のように示される。これらの構造はミトコンドリア中のCcOの構造と同じであることも確認されている。<sup>[16, 17]</sup> CcOは単離精製されたときはRestingである。Reducedで酸素を一分子受け取りOxygenated、Perferryl、Ferryl、Hydroxy、Oxidizedを経由し、酸素を水にまで段階的に還元し再びReducedに戻る。この間に膜の内側から外側に向かってプロトンを4つポンプする。<sup>[11]</sup>

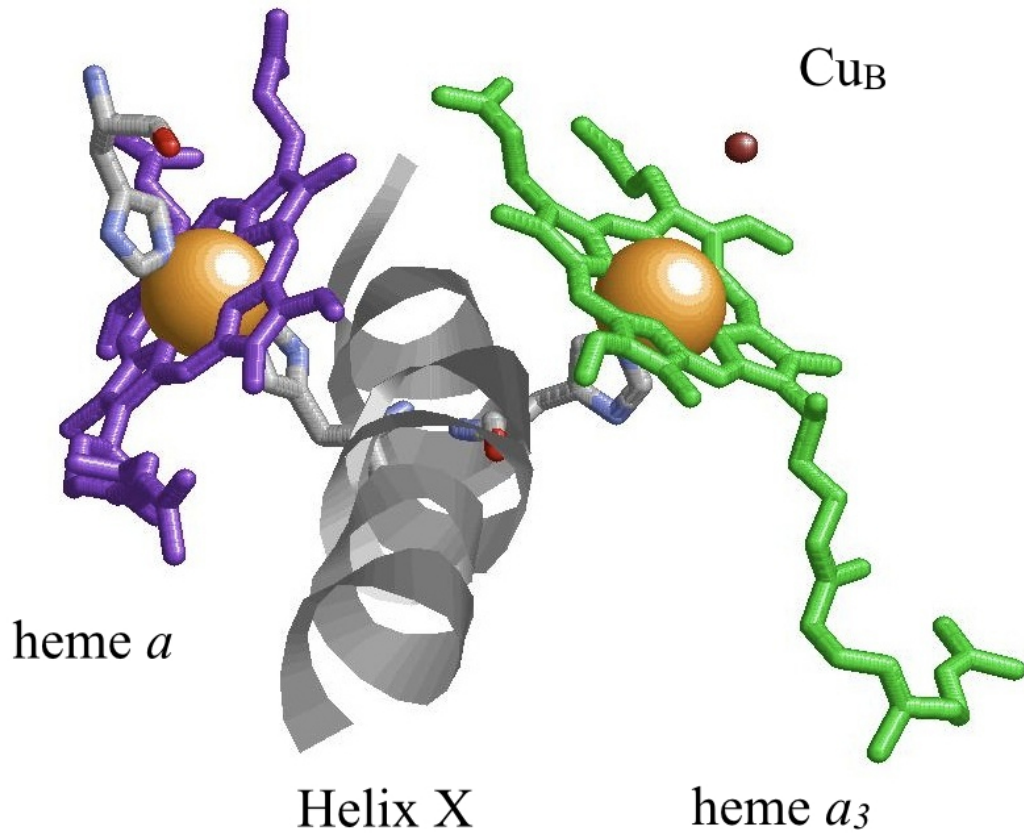


Figure 0-2  
CcOの活性中心[2EIJ]

左側をheme *a*と呼び、プロトンポンプを駆動すると提唱されている。右側はheme *a*<sub>3</sub>と呼び、O<sub>2</sub>、及び呼吸阻害剤のCO、CN<sup>-</sup>、N<sub>3</sub><sup>-</sup>の結合部位である。電子は還元型cyt.*c*からCu<sub>A</sub>、heme *a*を経由してheme *a*<sub>3</sub>に伝達される。

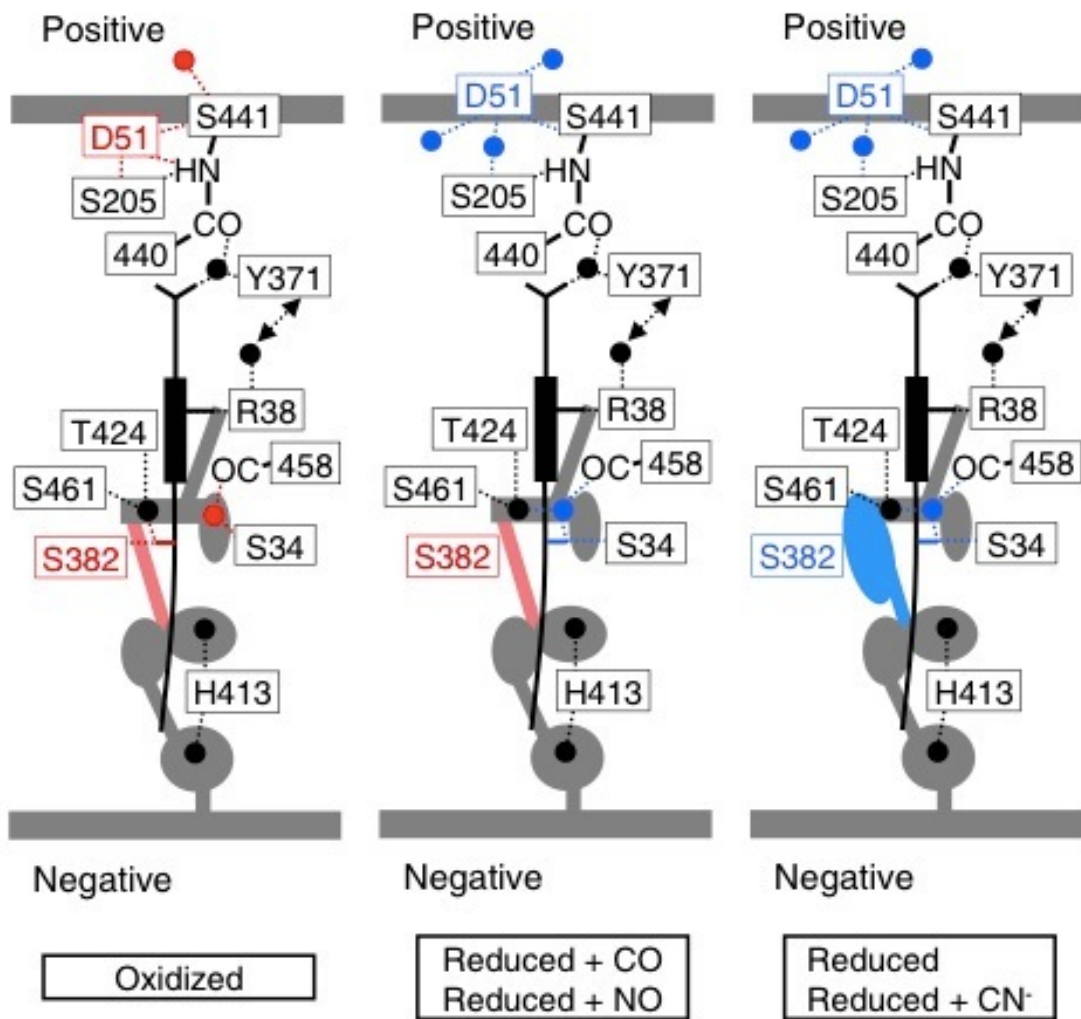


Figure 0-3

提唱されているプロトンポンプ経路<sup>[10]</sup>

左から酸化型、COもしくはNO結合同型、完全還元型もしくは完全還元CN結合同型である。赤と青で記した場所はheme *a* の酸化に関する水分子の位置で、黒丸は金属サイトの酸化に無関係な水分子である。中央部の黒で書かれた部分はheme *a* とその側鎖である。



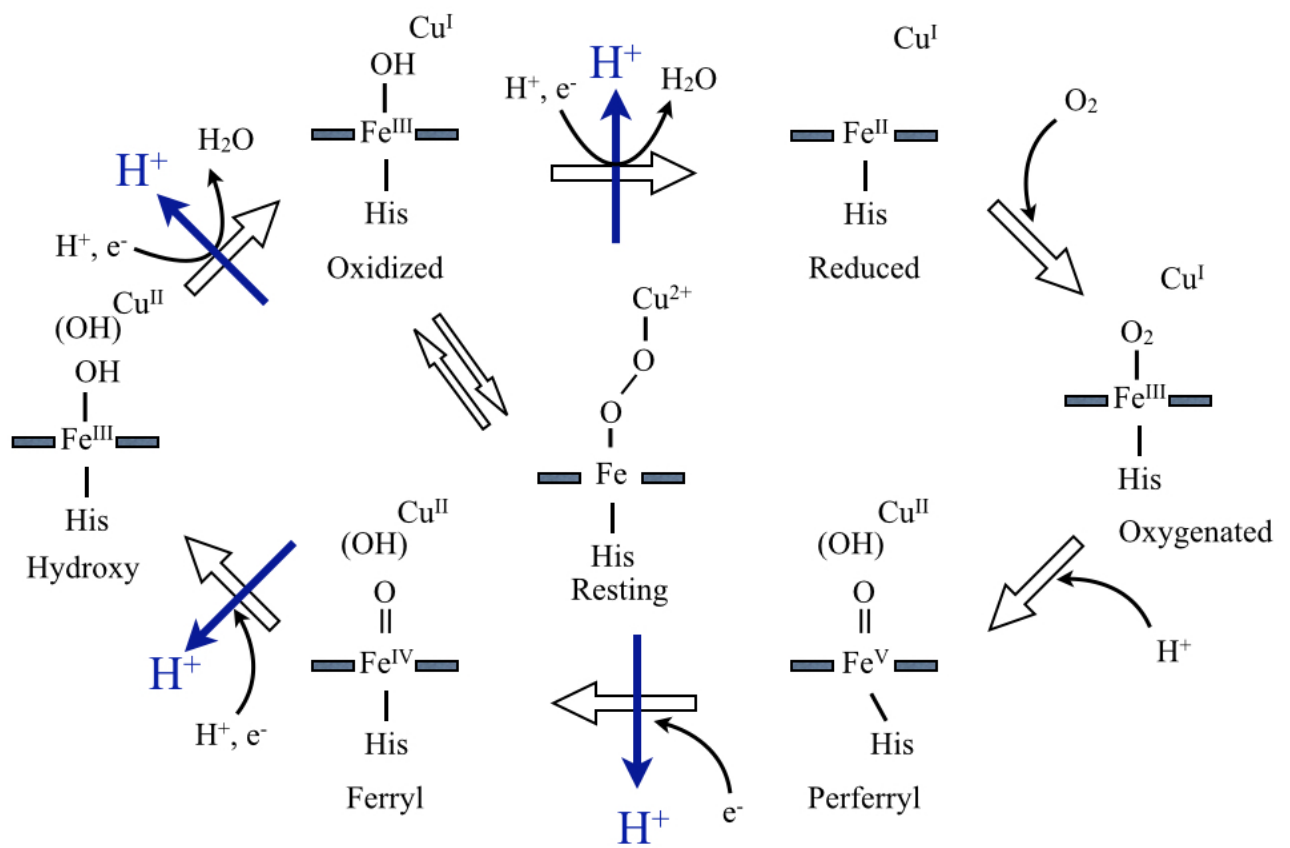


Figure 0-4  
CcOの酸素還元反応サイクル

## Cytochrome *c* Oxidase Reconstituted in Phospholipid Vesicles (COV)

CcOへの $\Delta\mu_{H^+}$ の影響を研究するにあたり、CcOをFigure 0-5のようにリン脂質二重膜小胞に再構成したCytochrome *c* Oxidase Reconstituted in Phospholipid Vesicles (COV) を用いて研究を行った。COVではCcOが膜中に存在することから、その酸素還元反応によるプロトンポンプで発生した $\Delta\mu_{H^+}$ の影響を受ける。この系を用いることで、CcOのミトコンドリア中における振る舞いにより近いものが観測される。COVの調製は1972年Hinkleらにより発表<sup>[18]</sup>された方法を元に行われてきた。COVを用いた研究はS. Papaら<sup>[19]</sup>によりプロトンポンプはどのタイミングで起こるのか等、化学量論に基づいた生化学的な研究<sup>[20-23]</sup>で、その構造についての研究はほとんどない。<sup>[24][15]</sup>

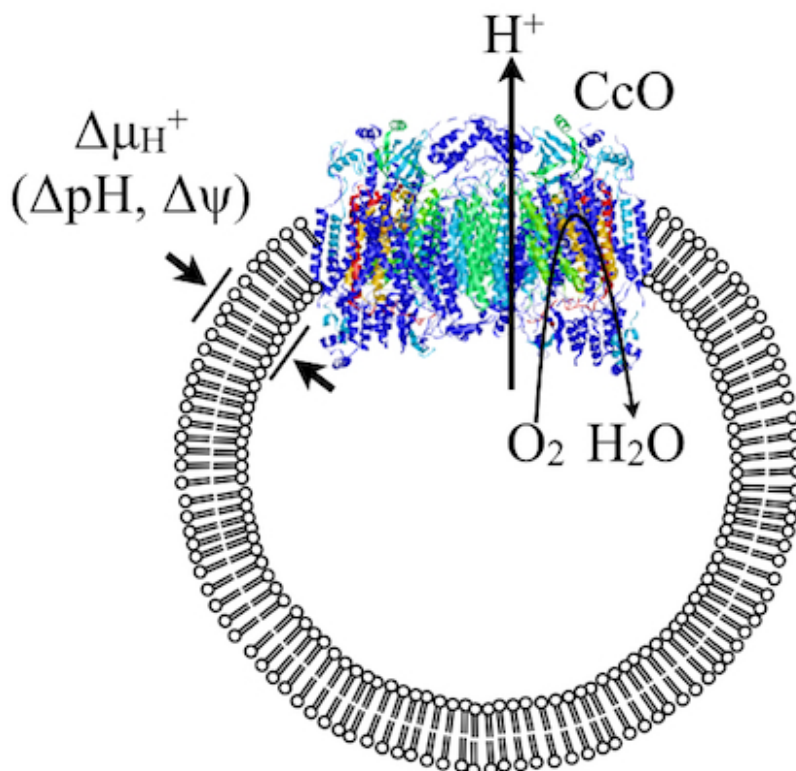


Figure 0-5  
COVの模式図

## 呼吸調節率 (RCR)

COVを用いて、適当なイオノフォアにより $\Delta\Psi$ 、 $\Delta\text{pH}$ の制御を行うと呼吸調節を観測することができる。本研究ではValinomycin、FCCP (carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone) を用いた。Valinomycinはカリウムイオンの透過を行うイオノフォアである本研究の系では大量の $\text{K}^+$ を含むのでCOVの $\Delta\Psi$ を解消する。一方FCCPはプロトンの透過を行うイオノフォアで、 $\Delta\text{pH}$ を解消する。この2つのイオノフォアを用いて呼吸調節を観測できる。この時のイオノフォア添加後と添加前の酸素還元反応速度の比を呼吸調節率 (RCR) と呼び、COVの質を評価できる。[25]

Figure 0-6に呼吸調節率を計算する時に用いるチャートを示す。これは還元型cyt.cの550 nmの吸光度を観測し、cyt.cがCOVに電子を奪われて酸化型になっていく様子をモニタしている。この傾きは電子伝達速度を表しており、COV添加後からイオノフォア添加までの電子伝達速度を $V_1$ 、ValinomycinとFCCPを添加し、 $\Delta\Psi$ 及び $\Delta\text{pH}$ を解消した後の電子伝達速度の初速度を $V_2$ とすると、RCRは式 (1) のように表される。

$$\text{RCR} = V_2 / V_1 \cdots (1)$$

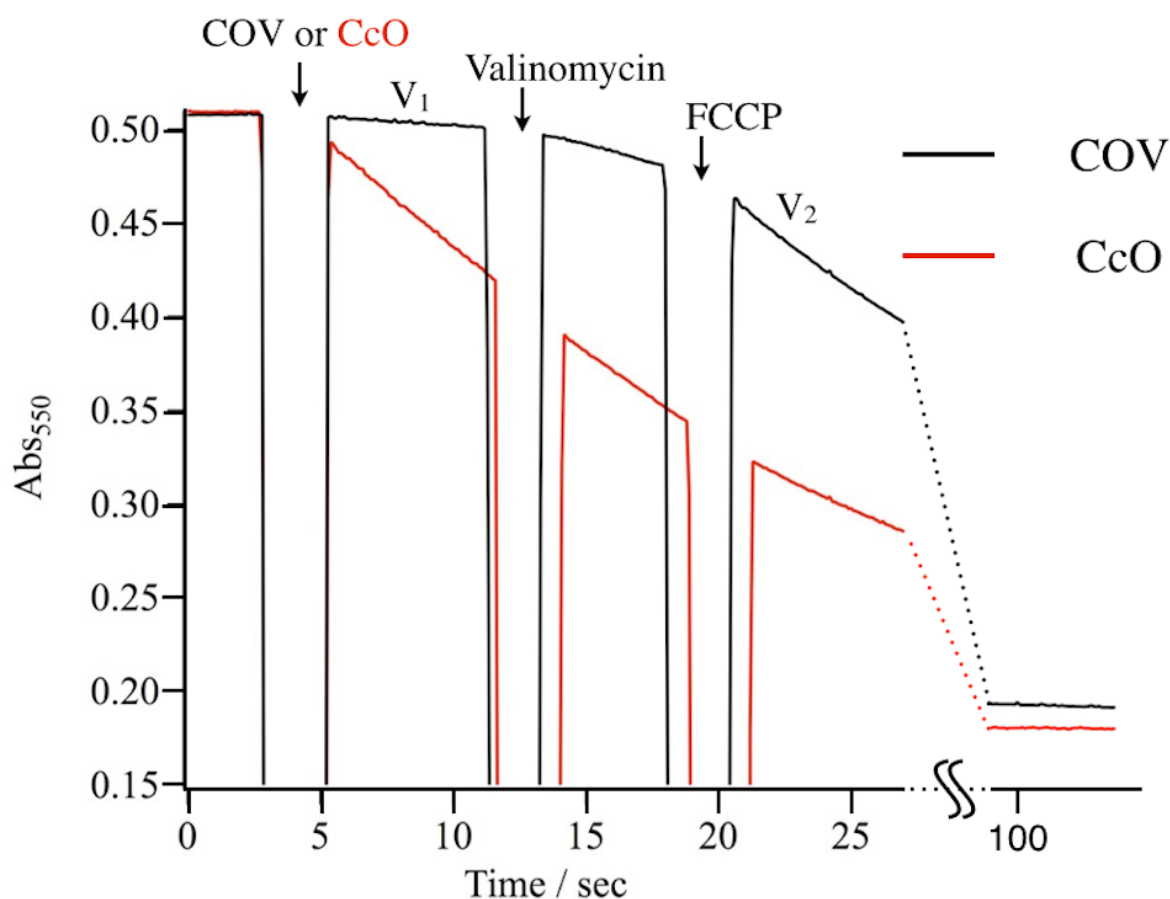


Figure 0-6  
還元型cyt.cの550 nmにおける吸光度の時間変化

黒 : COV、赤 : 可溶化CcO。

還元型cyt.cの550 nmの吸光度を観測し、cyt.cがCOVに電子を奪われて酸化型になっていく様子をモニタしている。この傾きは電子伝達速度を表す。COVは呼吸調節によりイオノフォア添加前後で傾き (電子伝達速度) が変化しているのに対し、可溶化CcOはイオノフォアを添加してもその傾きは変わらない。

## ラマン分光法

原子が光と相互作用する場合を考える (Figure 0-7)。原子は通常、負電荷 (電子雲) の重心は陽電荷 (原子核) の重心と同じ場所にある。しかし、その原子に光を照射すると光が持つ電場が作用し、電子雲が光の電場の陽極側に引っ張られる。このモデルでは光の電場が図中の原子の上下にある電極によって与えられると考える。この時、原子核は非常に重いのでその場にとどまる。その結果、負電荷の重心と陽電荷の重心がズレるので双極子モーメントが発生する。光の電場は交換電場であるため、次の瞬間には原子は先ほどとは逆向きに双極子になる。その結果、振動数 $\nu_0$ の光を原子に照射すると原子の双極子も $\nu_0$ でその向きを変える。これにより、原子は振動数 $\nu_0$ のレイリー光と呼ばれる光を発生する。

次に分子が振動数 $\nu$ で振動している場合を考える (Figure 0-8)。振動数 $\nu$ は入射光の振動数 $\nu_0$ よりずっと小さいとする。電子雲の動きは非常に速いため原子核の動きに追随する。そこへ光が相互作用すると、先程と同様に原子の陽電荷 (原子核) と負電荷 (電子雲) による双極子が振動数 $\nu_0$ で振動する。ここで、原子の陽電荷と負電荷による双極子は $\nu_0$ と $\nu$ という2つの波が重なっている。これにより”うなり”が発生し、先ほど説明したレイリー散乱の他に振動数 $\nu_0+\nu$ および $\nu_0-\nu$ のラマン散乱光を同時に発生する。振動数 $\nu_0-\nu$ のラマン散乱光をストークス光、振動数 $\nu_0+\nu$ のラマン散乱光をアンチストークス光と呼ぶ。入射光 $\nu_0$ に対する散乱光のズレ (ラマンシフト) は分子の振動数に一致する。これを量子論的に表すと Figure 0-9になる。入射光のエネルギーにより、分子は瞬間的に励起され、すぐさま元に戻ってくる。この時はじめのエネルギー準位より1つ高い準位に電子が落ちてくる。この時に発せられる散乱光がストークス光、元の準位より一つ低いところへ落ちるのがアンチストークス光である。実際には、ラマン過程は二光子過程であり、励起と散乱は同時に起きる。ラマン分光法では入射光 ( $\nu_0$ ) と散乱光 ( $\nu_0\pm\nu$ ) の差 (ラマンシフト) を振動数とする。このようにして、ラマン分光法により、分子の振動数を測定することができる。

## 共鳴ラマン効果

共鳴ラマン効果とは分子の吸収帯に励起波長を近づける事で実在する電子状態まで励起され、非常に強いラマン散乱光 ( $\times 10^3\sim 4$ 程度) を与える。これにより吸収帯に関与する特定の発色団の分子構造を選択的に解析する事ができるようになるため、共鳴ラマン分光法は反応機構を詳細に調べるにあたって非常に強力な手段である。たとえば、ヘムタンパク質やレチノイドタンパク質では、濃度0.1 mM程度で質の高い共鳴ラマンスペクトルが得られ、広く利用されている。

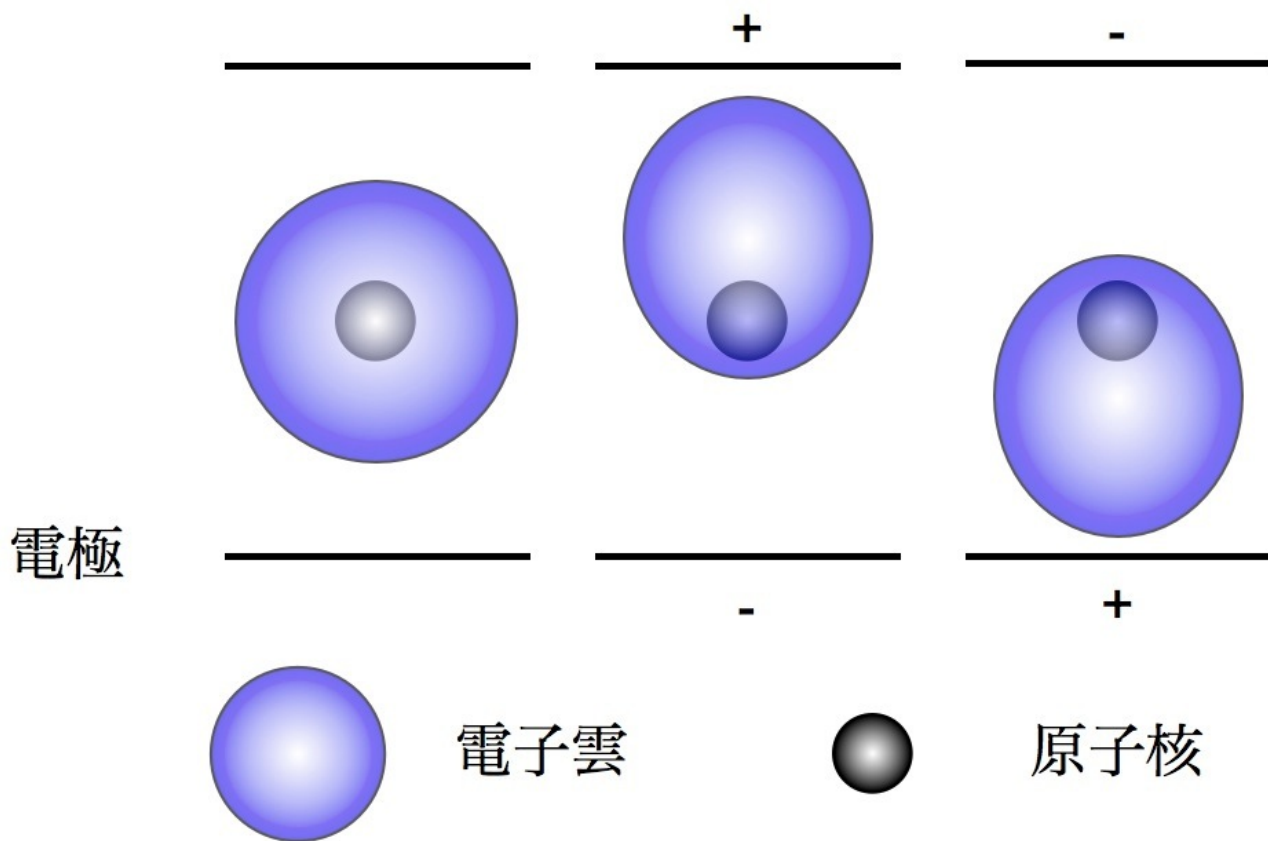


Figure 0-7  
原子からの光の散乱

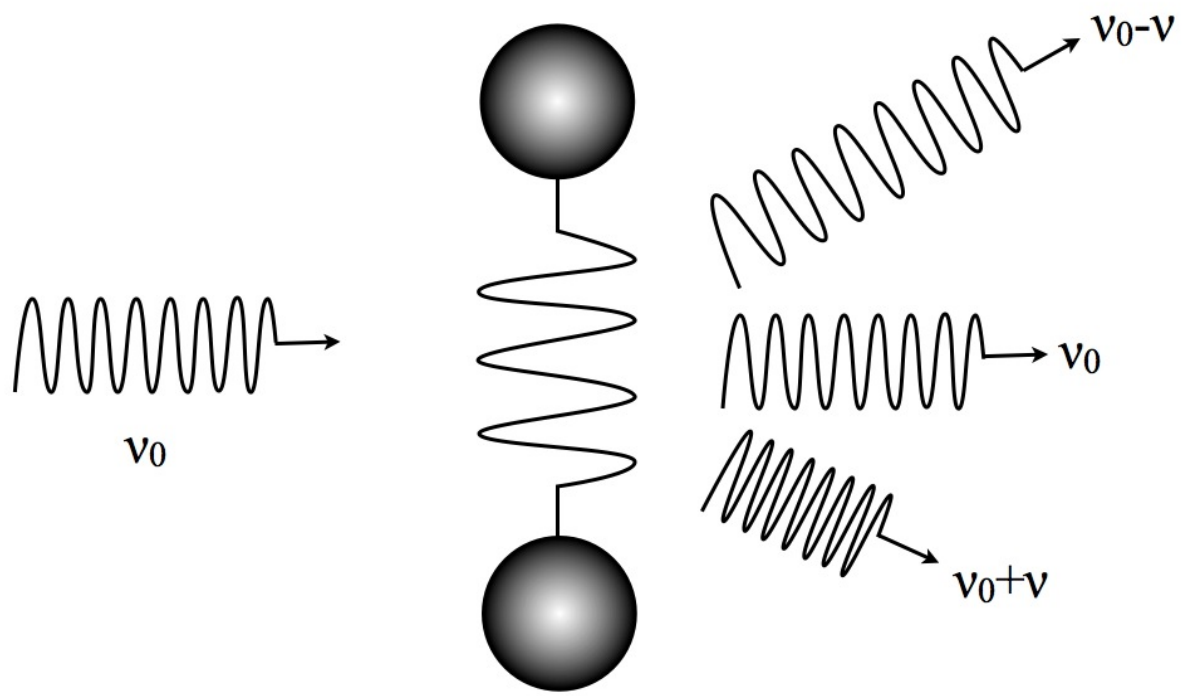


Figure 0-8  
分子による光の散乱

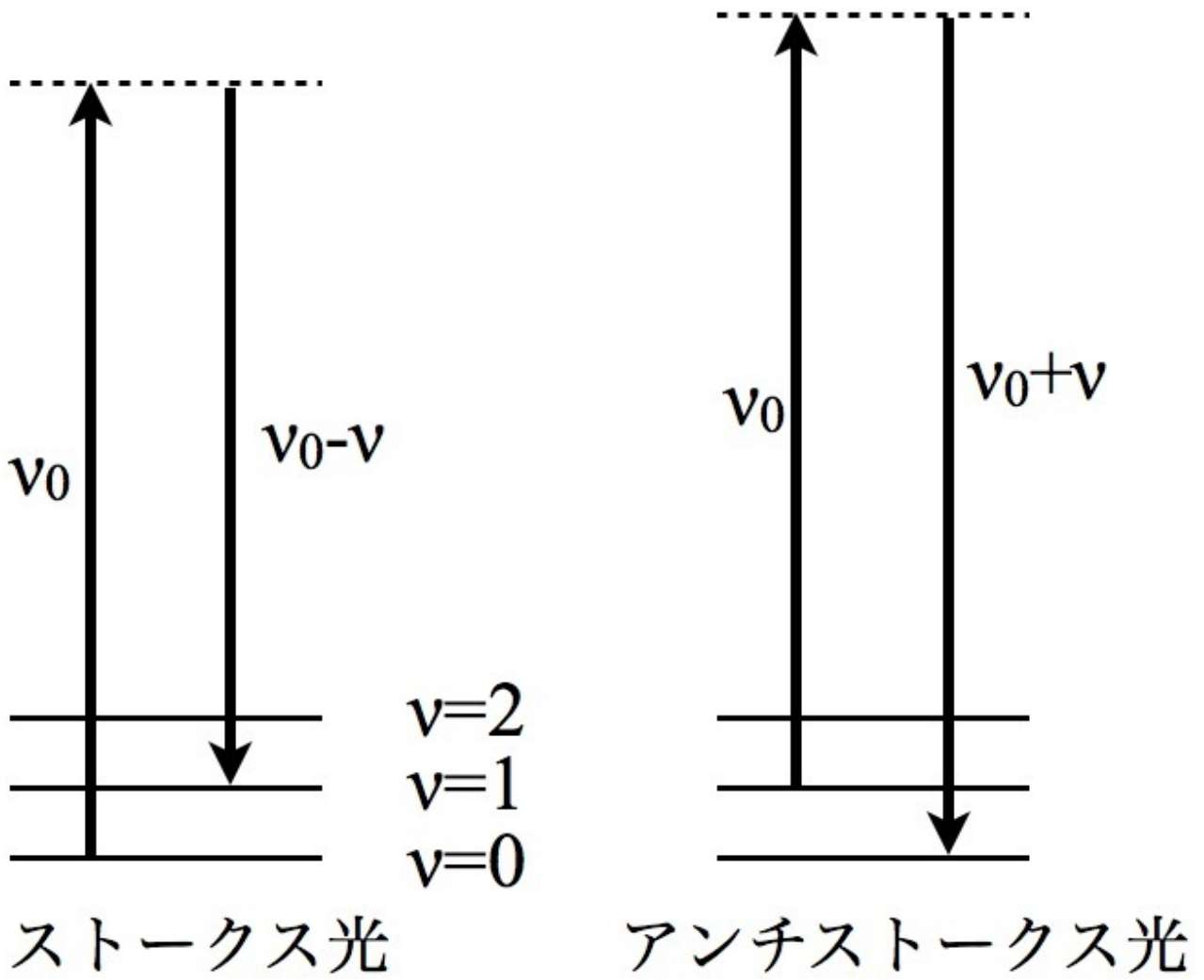


Figure 0-9  
 ストークス光とアンチストークス光

# 第一章 COVの調製



## 1-1目的

COVの調製は1972年にHinkleらによって行われたコール酸透析法<sup>[18]</sup>によって行われる。これは界面活性剤（コール酸）存在下で適当な比率でCcO、脂質を混合し、透析により界面活性剤を取り除き再構成を行う方法である。この方法は非常に簡単かつ均一なCOVが調製できる事が分かっている。

しかしながら、本研究に用いるCOVには高濃度かつ共鳴ラマンスペクトル測定の際に照射するレーザーへの耐性が不可欠である。これまで行われてきたCOVの調製法では共鳴ラマンスペクトル測定時のレーザー照射によりRCRが低下した。これはレーザーの照射によりCOVが損傷を受け、その機能が失われた事を意味する。高濃度でレーザー照射後も高いRCRを示すCOVを調製する為に様々な条件で調製を行った。

## 1-2 方法

### Method 1

Avanti社製のクロロホルムで溶解されたPC (L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine (Egg, Chicken) )、PE (L- $\alpha$ -Phosphatidylethanolamine (Heart, Bovine) )、CL (Cardiolipin (Heart, Bovine-Disodium Salt) ) を10 mg、1.6 mg、1.6 mgの割合で分注したものを100 mlのナスフラスコに入れ、Arガスを吹き付けながら底部に薄膜を形成した。これを1時間乾燥させて1 mlの脂質溶解Buffer (100 mM HEPES-Na, 25 mM Cholic acid) を添加し、気泡が出来ないように静かに手で振り素早く溶解した。この脂質懸濁液を0.2  $\mu$ mのフィルター (Cellulose Acetate Membrane Filters, ADVANTEC) を通して濾過した。脂質の懸濁液にCcO (終濃度1  $\mu$ M)<sup>[26]</sup> を添加し5  $^{\circ}$ Cで5分間攪拌し、よく混合した。その後、Table 1-1に示す4種の透析Bufferで24時間透析し酵素をリポソームに再構成した。透析終了後、直径10 mmのカラムにDEAE-Sepharoseを3 cm程度充填し、陰イオン交換クロマトグラフィーにかけた (ここで用いたBufferをTable 1-2に示す)。カラムに透析した溶液を添加し2 ml平衡化buffer、7 ml洗浄buffer、7 ml溶出bufferの順番で流した。これにより、逆向きに再構成されたCOV、余分な脂質を取り除いた。その後、600 ml ラマン測定用Buffer (2.5 mM HEPES-Na (pH 7.4), 49 mM KCl, 16 mM Sucrose, 80 mM Choline Chloride) で10分間の透析を3回行なった。最後に、限外濾過膜 (UFPI Millipore, TKK) を用いて、Arガスを満たしたシリンジで加圧して濃縮した。

Table 1-1  
透析Bufferの組成と時間

組成	時間
200 ml 100 mM HEPES-Na (pH 7.4)	4 hour
400 ml 10 mM HEPES-Na (pH 7.4) , 27 mM KCl, 73 mM Sucrose	4 hour
400 ml 1 mM HEPES-Na (pH 7.4) , 30 mM KCl, 80 mM Sucrose	12 hour
400 ml 2.5 mM HEPES-Na (pH 7.4) , 250 mM Sucrose, 22.5 mM K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4 hour

Table 1-2  
陰イオン交換クロマトグラフィー用Buffer

平衡化buffer	2.5 mM HEPES-Na (pH 7.4) , 250 mM Sucrose, 22.5 mM K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
洗浄buffer	5 mM HEPES-Na (pH 7.4) , 200 mM Sucrose, 45 mM K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
溶出buffer	20 mM HEPES-Na (pH 7.4) , 150 mM K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

## Method 2

PC、PE、CLを20 mg、3.2 mg、3.2 mgを混合し、Arガスを吹き付けながら底部に薄膜を形成した。これを1時間乾燥させて3 mlの脂質溶解Buffer (100 mM HEPES-Na, 25 mM Cholic acid) で気泡が出来ないように静かに手で振り素早く溶解した。この脂質懸濁液を0.2 μmのフィルター (Cellulose Acetate Membrane Filters, ADVANTEC) を通して濾過した。脂質の懸濁液にCcO (終濃度1 μM) を添加し5 °Cで5分間攪拌し、よく混合した。脂質および脂質溶解Bufferの増量に伴いTable 1-3で示すように透析Bufferの体積を増やして合計24時間透析し酵素をリポソームに再構成した。透析終了後、直径10 mmのカラムにDEAE-Sepharoseを3 cm程度充填し、陰イオン交換クロマトグラフィーにかけた (ここで用いたBufferをTable 1-2に示す)。カラムに透析した溶液を添加し2 ml平衡化buffer、7 ml洗浄buffer、7 ml溶出bufferの順番で流した。これにより、逆向きに再構成されたCOV、余分な脂質を取り除いた。その後、600 ml ラマン測定用Buffer (2.5 mM HEPES-Na (pH 7.4) , 49 mM KCl, 16 mM Sucrose, 80 mM Choline Chloride) で10分間の透析を3回行なった。最後に分子量10万のメンブレンフィルター (Amicon Ultra Centrifugal Filter Device, MILLIPORE) で900×g、30分間の遠心を2回行い濃縮した。

Table 1-3  
透析Bufferの組成と透析時間

組成	時間
300 ml 100 mM HEPES-Na (pH 7.4)	4 hour
600 ml 10 mM HEPES-Na (pH 7.4) , 27 mM KCl, 73 mM Sucrose	4 hour
600 ml 1 mM HEPES-Na (pH 7.4) , 30 mM KCl, 80 mM Sucrose	12 hour
600 ml 2.5 mM HEPES-Na (pH 7.4) , 250 mM Sucrose, 22.5 mM K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4 hour

## Method 3

Method 2をベースに界面活性剤を吸着する樹脂であるCALBIOSORB™ Absorbentという樹脂をTable 1-4に示す通り最終透析Bufferに添加した。

Table 1-4  
透析Bufferの組成と時間

組成	時間
300 ml 100 mM HEPES-Na (pH 7.4)	4 hour
600 ml 10 mM HEPES-Na (pH 7.4) , 27 mM KCl, 73 mM Sucrose	4 hour
600 ml 1 mM HEPES-Na (pH 7.4) , 30 mM KCl, 80 mM Sucrose	12 hour
600 ml 2.5 mM HEPES-Na (pH 7.4) , 250 mM Sucrose, 22.5 mM K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 3 g CALBIOSORB™ Absorbent	4 hour

#### Method 4

Method 3をベースにTable 1-5に示す通り over nightの透析前に更に2時間の透析を加えて再構成した。

Table 1-5  
透析Bufferの組成と透析時間

組成	時間
300 ml 100 mM HEPES-Na (pH 7.4)	4 hour
600 ml 10 mM HEPES-Na (pH 7.4) , 27 mM KCl, 73 mM Sucrose	4 hour
600 ml 1 mM HEPES-Na (pH 7.4) , 30 mM KCl, 80 mM Sucrose	2 hour
600 ml 1 mM HEPES-Na (pH 7.4) , 30 mM KCl, 80 mM Sucrose	12 hour
600 ml 2.5 mM HEPES-Na (pH 7.4) , 250 mM Sucrose, 22.5 mM K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 3 g CALBIOSORB™ Absorbent	4 hour

#### COV中のCcO配向の確認

配向の確認はcyt.c還元した時のスペクトルとジチオナイト還元した時のスペクトルを比較して行った。cyt.cによる還元はCcOのCu<sub>A</sub>がベシクルの外側になればCOVは還元されない。一方、ジチオナイトによる還元はCcOの配向に関係なく起こるので、この事を利用して配向を確認した。

測定用セルにCOV、アスコルビン酸 (終濃度25 mM) 、 cyt.c (終濃度 6.75 μM) の混合溶液を200 μlとり、セプタムで蓋をし、パラフィルムで密閉した。気相を窒素ガス置換し、10分間静置した後吸収スペクトルを測定した。吸収スペクトルを測定したらジチオナイト水 (調製方法は第四章に記す) を終濃度が5 mMになるように添加し、吸収スペクトルを測定した。

#### 還元型Cytochrome c (cyt.c) 調製

cyt.cの還元にはジチオナイトを用いた。約60 mgのcyt.c (from Horse Heart, nacalai tesque) を500 μlのリン酸ナトリウムBuffer (100 mM, pH 7.4) に溶解し、ジチオナイトを十分量加えた。その後、ラマン測定用Bufferで平衡化したカラムに添加し、ラマン測定用Bufferを流しゲル濾過 (Sephadex G-25f) をしてジチオナイトを除去し、還元型cyt.cとした。濃度決定はFigure 1-1に示すような吸収スペクトルから550 nmの酸化還元吸光度差 ( $\epsilon=18.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) を用いて決定した。

## RCR測定

RCRは還元型cyt.cの550 nmの吸光度変化から計算する分光学的手法を用いた。測定温度は20 °Cで、吸収分光器は日本分光株式会社製のV-630を用いた。光路長1 cmのキュベットにラマン測定用Bufferにcyt.c (終濃度20 μM) を添加して全量を2 mlとした。COV (終濃度 約2 nM)、Valinomycin (終濃度 1.5 μM)、FCCP (終濃度 10 μM) の順で添加し、得られたFigure 6のようなチャートからRCRを求めた。

## レーザー照射への耐性の確認

Method 2, 3, 4で調製されたCOVについてレーザー照射への耐性を調べた。100 μlのCOVを一辺4.5 mmのキュベットに取り、441.6 nmのレーザーを60分間照射した。レーザーはラマンスペクトル測定時と同様にf=100のシリンドリカルレンズで集光した。照射するレーザーのパワーはそれぞれ0, 5, 10 mWで、Method 4で調製されたCOVについては2, 3, 4 mWのレーザー照射も行った。

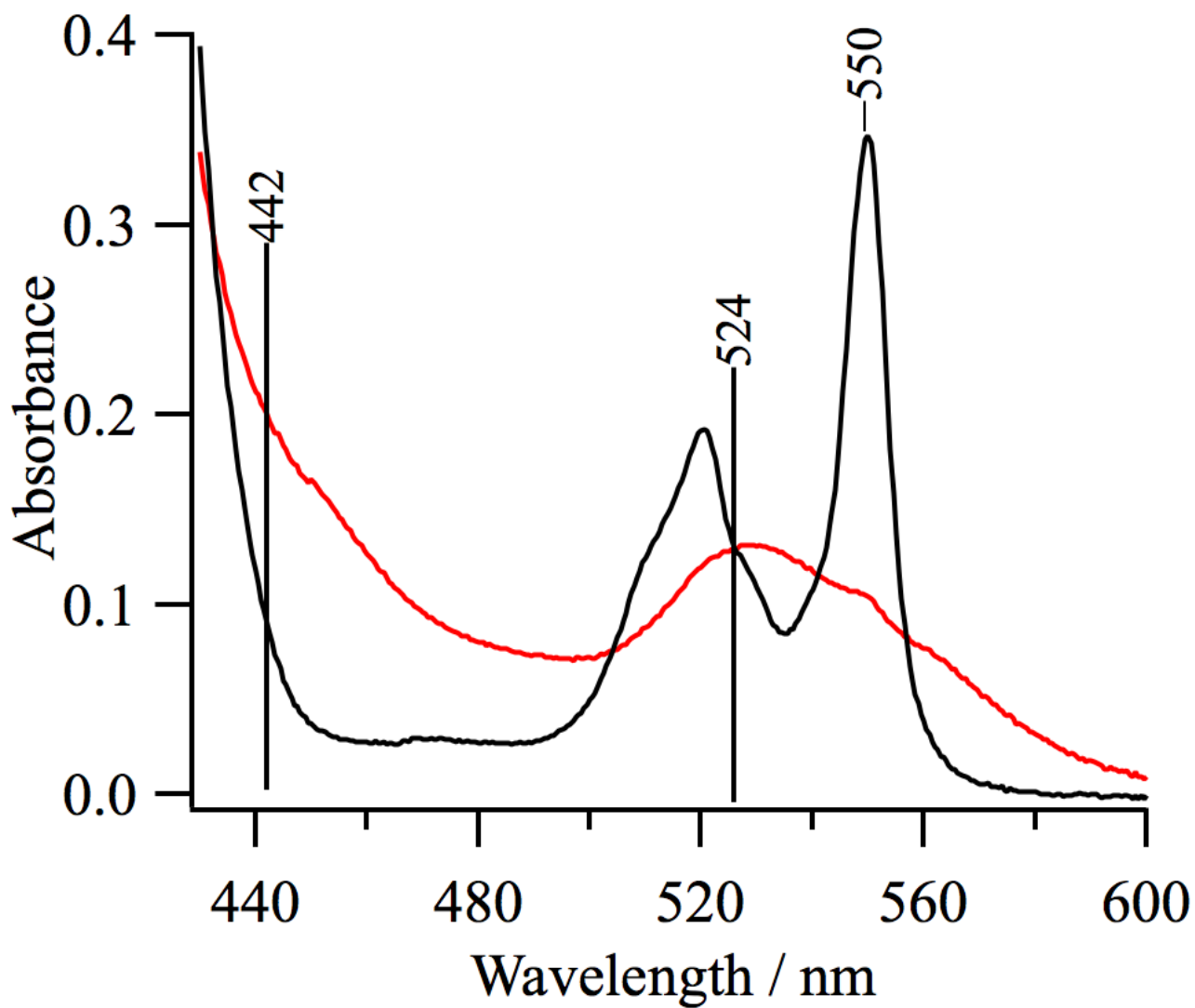


Figure 1-1  
cyt.cの吸収スペクトル  
黒：還元型cyt.c、赤：酸化型cyt.c

## 1-3 結果

Method 1で調製されたCOVのRCRは15程度あり十分であったが、濃度が非常に低く (1  $\mu$ M以下)、量も少ないためにラマンスペクトルの測定が困難であった。そこで濃度、収量の増加を目指して調製法を改良した。Method 2で得られたCOVは濃度が2  $\mu$ Mで、収量も1,500  $\mu$ lと測定には十分な濃度、量であった。

本研究で用いるCOVは、ラマンスペクトル測定を前提としているので、スペクトル測定時のレーザー照射への耐性が必須である。調製法を改良して得られたCOVのレーザー照射後のRCRをTable 1-6に示す。Method 2のCOVはレーザー照射前はRCRが16.5と十分高い<sup>[18] [21]</sup>が、レーザー照射への耐性は殆ど無く、10 mWのレーザー照射でRCRが大幅に低下した。Method 2で得られたCOVの最終透析Bufferを20 ml程度取り、振り混ぜてみたところBufferが泡立った。透析前のBufferは泡立たず、更にCALBIOSORB™ Absorbentを添加したMethod 3, 4では泡立つことがなかった。このことからMethod 2の最終透析Bufferを振り混ぜて泡立った原因は透析により取り除くことが出来なかった界面活性剤(コール酸)によるものであることが分かった。また、Method 4で得られたCOVのRCRは30以上とこれまで報告されてきたCOVより圧倒的に高い値を示した。<sup>[18, 20-23]</sup> Method 3, 4を比較すると、Method 4のCOVの方がMethod 3のCOVに比べてレーザー照射後にRCRが大きく低下している。しかし、Method 3のCOVのレーザー照射前のRCRより高い値 (20以上) を示していることから、本研究ではMethod 4により調製されたCOVを用いた。Method 3, 4で得られたCOVのRCRを測定した時のチャートをFigure 1-3に示す。Method 3のRCRは22、Method 4のRCRは34と大きく異なるが、FCCP添加までの酸素還元反応速度は同じであった。しかし、イオノフォアを添加してプロトン駆動力が無くなった後の酸素還元反応に違いがあることが分かった。Figure 1-4を見るとイオノフォア添加前の酸素還元反応速度はレーザー照射前と変化しないにも関わらず、イオノフォア添加後の酸素還元反応速度が低下した。

Method 4で調製されたCOVはFigure 1-5で示すような直径20-30 nm程度の均一なベシクルであった。このCOV中のCcOの配向を確認するため、cyt.c還元した時とジチオナイト還元した時の吸収スペクトル (Figure 1-6) を測定した。差スペクトルに現れる444 nm (還元型COVのソーレー帯) の吸光度からcyt.cで還元できなかったCOVの濃度を算出し、逆向きに再構成されたCOVの比率を見積もった。この場合は逆向きのCOVが2%存在していることが分かった。この結果から本研究で用いるCOVは98%同じ向きに再構成されていることがわかった。

Table 1-6  
各COVのレーザー照射 (60 min) 後のRCR

Laser power / mW	RCR		
	Method		
	2	3	4
0	16.5±4.1 (n=3)	18.5±4.3 (n=3)	35.8±4.8 (n=13)
2	-	-	26.3±1.7 (n=3)
3	-	-	26.7±2.1 (n=3)
4	-	-	25.6±2.8 (n=3)
5	14±2.2 (n=3)	16.7±0.5 (n=3)	23.7±2.0 (n=4)
10	8.7±1.7 (n=3)	16±1.4 (n=3)	22.4±0.5 (n=3)

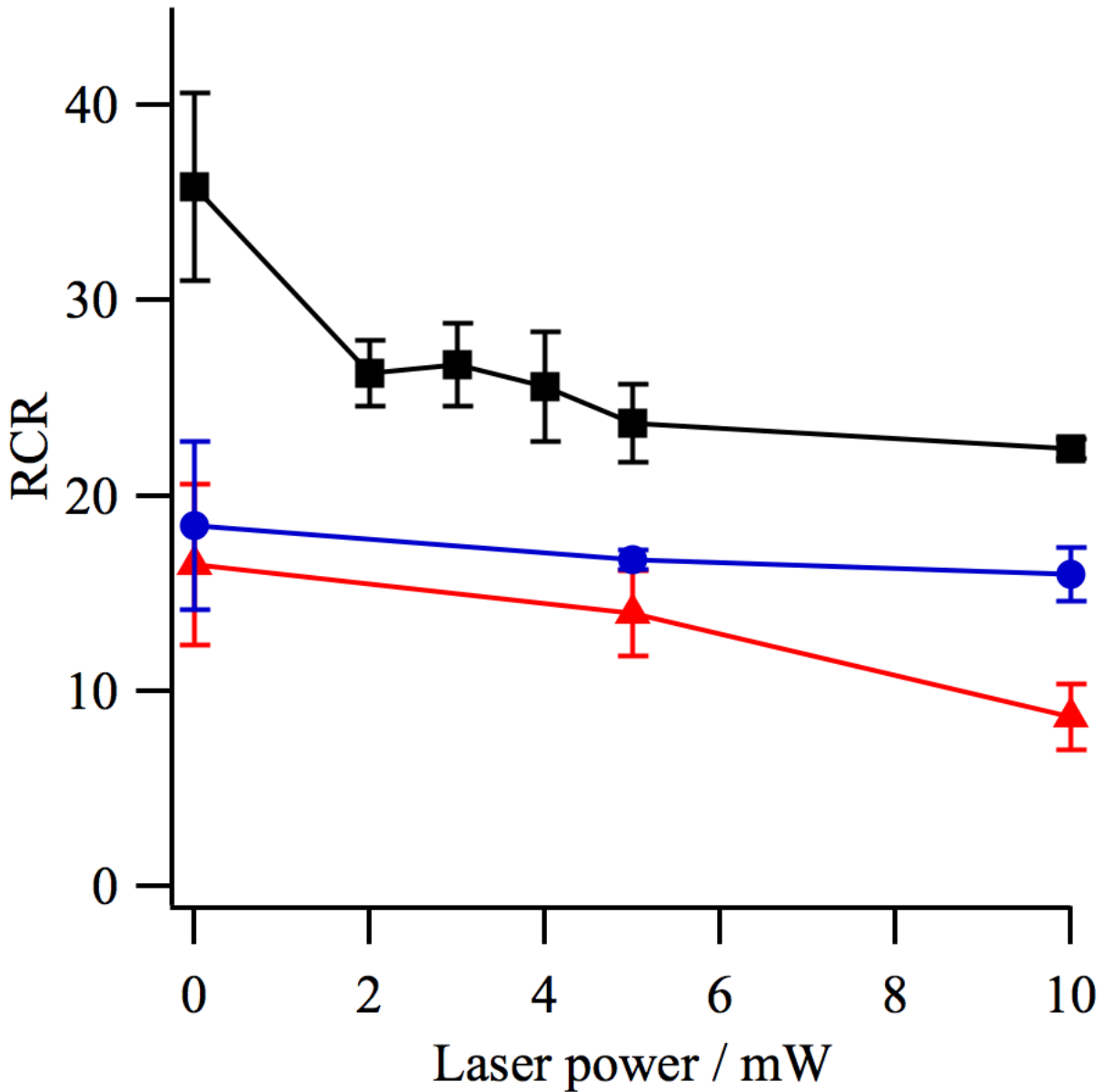


Figure 1-2  
 各調製方法で得られたCOVのRCR測定チャート  
 (赤) : Method 2、(青) : Method 3、(黒) : Method 4

それぞれ一時間のレーザー照射後にRCRを測定して得られた結果(Table 1-6)を元に作成した。10 mWのレーザー照射後、Method 2で得られたCOVのRCRは10以下になった。Method 3, 4はレーザー照射後もRCRが10以上を保っている。RCRの低下率はMethod 4の方が大きいですが、10 mWのレーザー照射後でもMethod 3に比べて高いRCRを保持しているため本研究ではMethod 4のCOVを用いることにした。



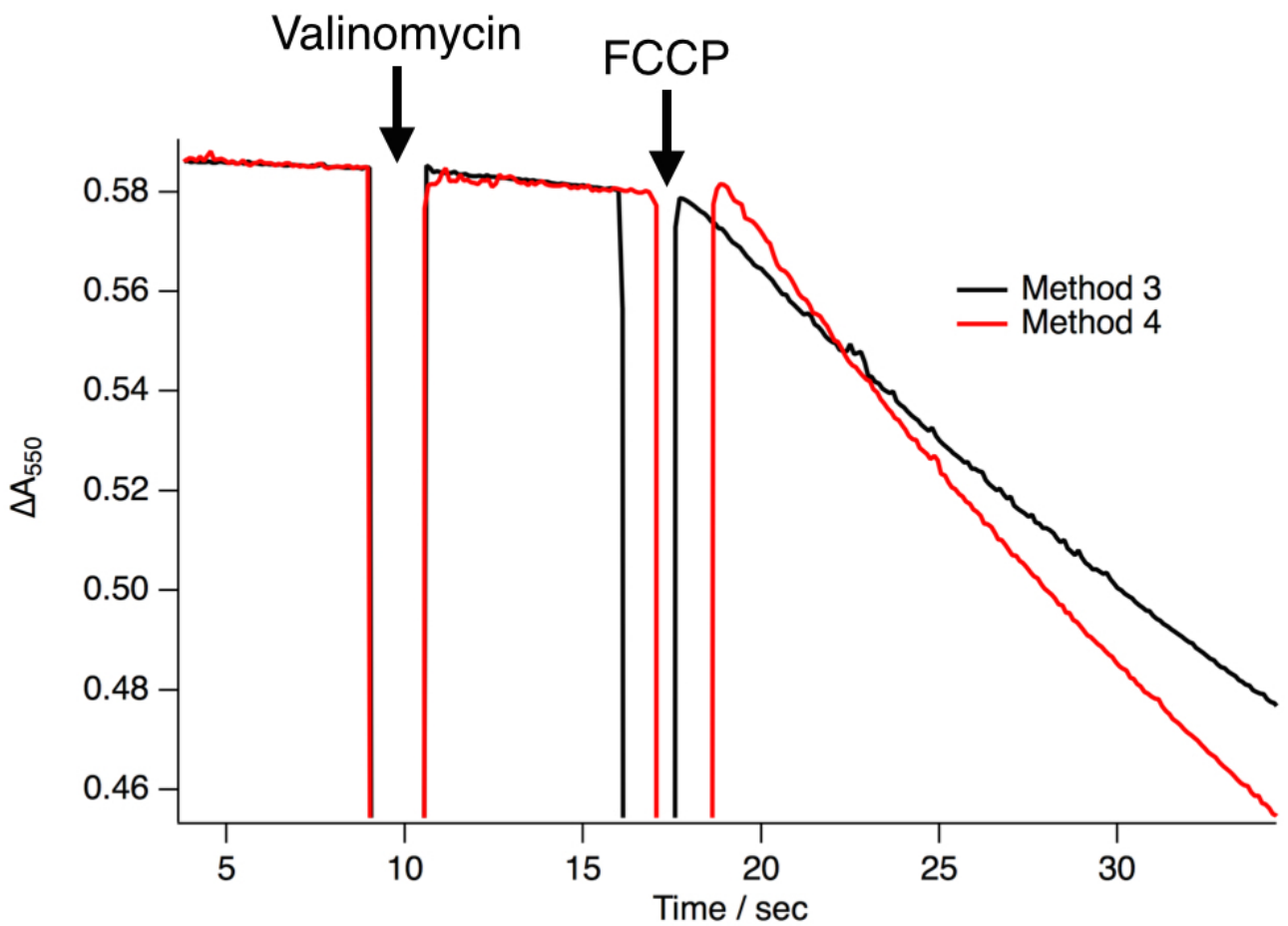


Figure 1-3

Method 3, 4で得られたRCRの測定チャート

縦軸は還元型cyt.cの吸収極大である550 nmの吸光度、横軸は時間である。COV添加後のチャートを示す。黒はMethod 3で得られたCOV (RCR 22)、赤はMethod 4で得られたCOV (RCR 34)

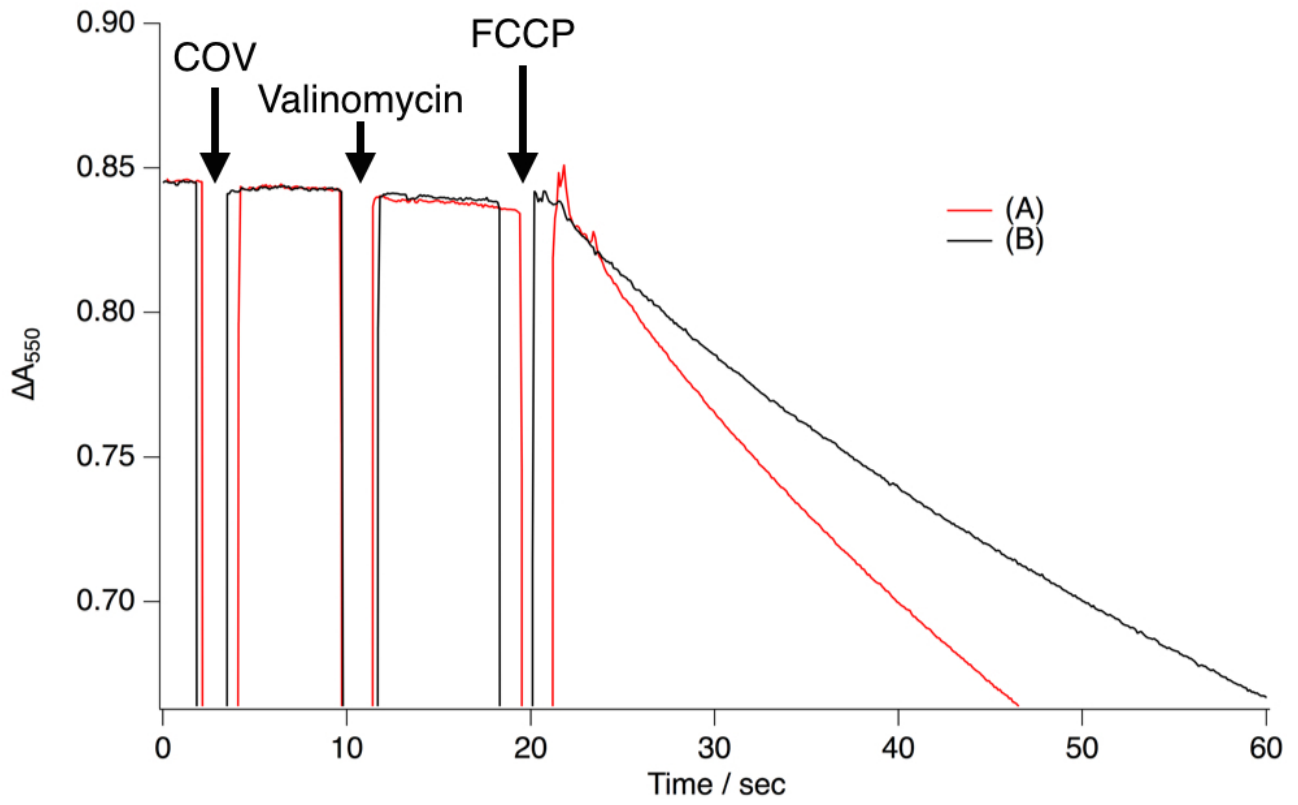


Figure 1-4  
 レーザー照射前後のRCRチャート  
 (A) Method 4レーザー照射前、(B) Method 4レーザー照射後 (4 mW)

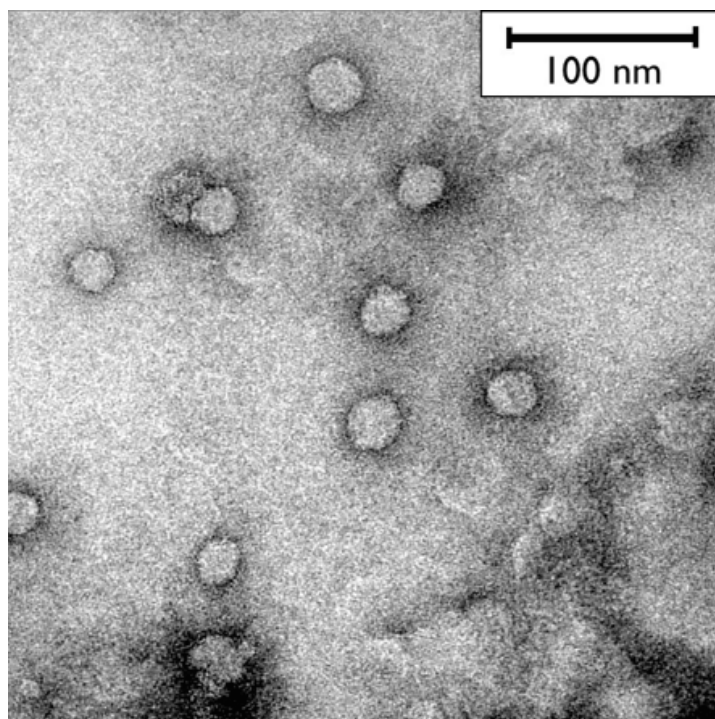


Figure 1-5  
COVの電子顕微鏡写真

13 nM COVをネガティブ染色し、3  $\mu$ lを銅グリッド上にアプライ。日本電子 JEM-2010で撮影(依頼撮影)

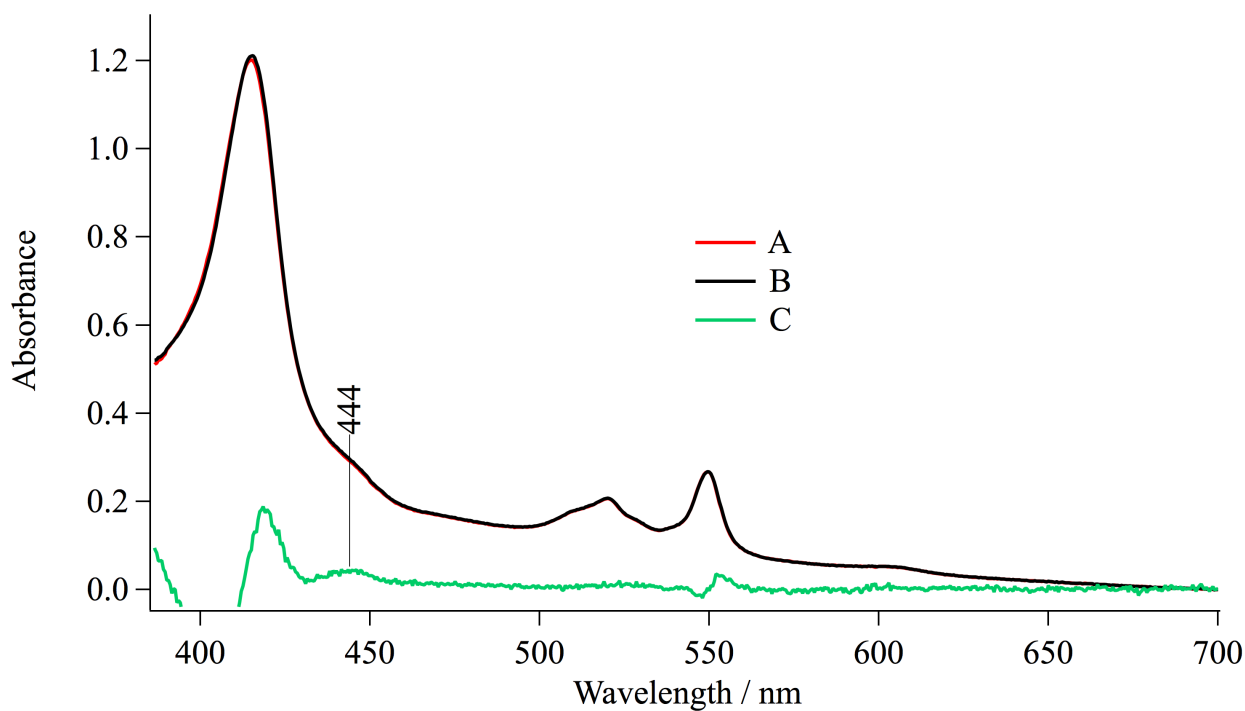


Figure 1-6

cyt.c還元した還元型COVとジチオナイト還元した還元型COVの吸収スペクトル

A: cyt.cで還元した還元型COV、B:ジチオナイト還元した還元型COV、C: B-Aを10倍に拡大  
 差スペクトルに現れる444 nm (還元型COVのソーレー帯) の吸光度からcyt.cで還元できなかったCOVの濃度を算出し、逆向きに再構成されたCOVの比率を見積もった。この場合は逆向きのCOVが2%存在していることが分かった。

## 1-4 考察

調製法の改良によって得られたCOVは全てベシクルの外側にCu<sub>A</sub>がある配向の揃ったCOVである。陰イオン交換クロマトグラフィーを行うことにより、外側に負電荷を持つcyt.c結合部位があるCOVのみがカラムに吸着されて、CcOが挿入されなかった空のベシクルや余分なCcOは全てカラムを素通りする。カラムにかけなくても90 %程度は正しい向きに再構成されるが、その原因は未だ明らかになっていない。

Method 1で得られたCOVは濃度が1  $\mu$ M以下で体積も非常に少ない。収率が100%であったとしても濃度を2  $\mu$ Mまで濃縮すると体積は500  $\mu$ lしかなく、ラマンスペクトル測定には量が不十分である。それに対してMethod 2, 3, 4では十分に濃縮しても体積が1500  $\mu$ l程度あるので測定に十分であるといえる。

Method 3, 4で界面活性剤を取り除く樹脂を添加したところレーザー照射への耐性が飛躍的に向上した。Method 4のCOVについてTable 1-1、Figure 1-2を見ると2 mW以上のレーザー照射でRCRはほとんど変化しないことから、COVに対してレーザーが与える影響はパワーに依存しないと考えられる。Figure 1-3を見るとRCRが高いCOVはイオノフォアを添加してプロトン駆動力を解消させた後の反応速度が高い。調製に使用した可溶性のCcOはMethod 3,4共に同じで、COVの調製にかかる時間はMethod 4の方が長いので、酸素還元反応速度の違いがCcOの損傷によるものであるとは考えにくい。残る可能性はベシクルの質が考えられる。現時点ではその違いを明らかにすることは出来ないが、Method 4で調製されたCOVのベシクルはMethod 3のものより質が高くCcOにとってミトコンドリア中での状態に近いことからMethod 4の方がイオノフォア添加後の酸素還元反応速度が高いのではないかと考えられる。Method 3,4のCOVのイオノフォア添加前の酸素還元反応速度が同じなのはMethod 3のCOVの方がベシクルの質が低く、十分な $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ を生成出来ず、呼吸調節による酸素還元反応速度の抑制も不十分であるため、CcOの酸素還元反応速度が低いにもかかわらず、呼吸調節状態において見かけ酸素還元反応速度はMethod 3, 4共に同じに見えていると考えられる。

Figure 1-4を見ると、レーザー照射によりイオノフォア添加後の酸素還元反応速度が低下している。にも関わらずイオノフォア添加前の酸素還元反応速度はレーザー照射前のものと変わらない。CcO自体が損傷を受け、酸素還元反応速度が低下していると仮定すると、イオノフォア添加前の速度も低下しているはずである。しかし、イオノフォア添加前の呼吸調節状態にあるCOVの酸素還元反応速度はレーザー照射前後で変わらない。つまり、レーザー照射によりベシクルがダメージを受け、十分な $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ を生成出来ず、呼吸調節による酸素還元反応速度の抑制も不十分であると考えられる。この事から、レーザー照射がCOVに与える影響については、ベシクルだけでなくCcO自体も損傷を受けると考えられる。

## 第二章 吸収、ラマンスペクトル同時測定装置の開発

## 2-1 目的

COVのラマン分光法による研究は報告がほとんどなく、ラマンスペクトル測定時に吸収スペクトルも同時に測定し、測定中のCOVの状態に関する情報を詳細に記録するのが望ましい。また、本実験では測定中に試薬の添加が必要な為、測定用のセル上部が開いておりセルを固定している。そのためセルの下部にはスターラーを設置し試料を攪拌する必要がある。このような測定を行う場合、既存の装置では測定が出来ないため新たに開発する必要がある。そこで光学系、セルホルダーの設計を行い、装置の安定性について詳細に調べた。

## 2-2 装置概要

使用した機材は以下のとおりである。

- ラマン分光器

MC1-100DG (リソー応用光学) 1 m single polychromator、回折格子 : 1200 grooves/mm

CCD-1024×256-OPEN-1LS (堀場製作所) CCD (140 Kに液体窒素冷却)

- 励起光

He - Cd Laser (Kimmon Koha) 441.6 nm

- 吸収分光器

USB4000 (Ocean Optics) 検出範囲 : 200~1100 nm

- 吸収測定用光源

タングステンランプ (Ocean Optics)

COVの研究では共鳴ラマンスペクトル測定時にイオノフォアなどの試薬を測定中でも添加することが出来る必要がある。一般的な共鳴ラマンスペクトルの測定では、測定用セルは「回転セル」と呼ばれるセル自体が回転することで内部の試料を攪拌するセルが用いられることが多い。この場合セル自体が回転するので、測定中の試薬の添加は困難である。そこで本研究ではFigure 2-1に示すようなセルとホルダーを作製し、スターラーバーによって試料を攪拌することにした。測定用セルは石英製で、下部は内寸4.5 mm×4.5 mm×50 mmの直方体、上部はセプタムで密閉するために直径6 mmの円筒状になっている。セルホルダーはアルミ製で、恒温循環水を流すことで試料温度が一定(20°C)になるようにした。このようなセルホルダーを用いることから、励起光はサンプルに向けて斜め上から照射する135°散乱法によってラマンスペクトルを測定した。(Figure 2-2)

吸収スペクトルの測定はマルチチャンネル吸収分光器USB4000 (Ocean optics)、光源にタングステンランプを用いて行った。吸収スペクトル測定の光路はFigure 2-2の略図で示されるように、ラマンスペクトル測定と直交するようにした。タングステンランプの光を光ファイバーでサンプル点まで導きコリメーターで光を平行光に成形した。サンプルを透過した光は再びコリメーターを通し光ファイバーに入れ、吸収分光器まで導いた。

光源となるタングステンランプは650 nm付近の光が強いため短時間の露光でCCDが検出限界になり、hemeのソーレー帯 (400-450 nm) 付近の測定のために十分な光量が得られなかった。これはhemeのソーレー帯の吸収が特に大きいためである。(Figure 2-4灰色) そこで光源と光ファイバーの光路上にFigure 2-4赤色で示すように650 nm付近の光を通さないシャープカットフィルターを挿入し、光源から出る光の一部をカットした。(Figure 2-3) これにより、650 nm付近の光が抑えられ、露光時間を伸ばす

ことができ、ソーレー帯付近の光も十分な光量を得られるようになった。この時の光源のスペクトルをFigure 2-4に、それぞれの光源で測定した吸収スペクトルをFigure 2-5に示す。Figure 2-5を見るとシャープカットフィルターで光の一部をカットし露光時間を伸ばすことで広い範囲 (350 ~ 700 nm) で綺麗なスペクトルを測定することが可能となった。

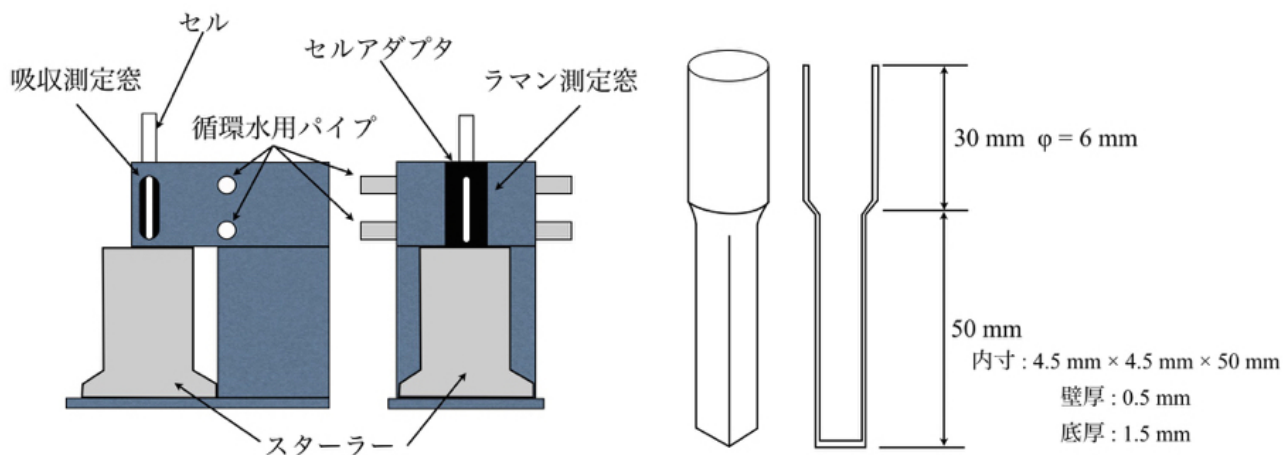


Figure 2-1  
測定用セルとセルホルダー

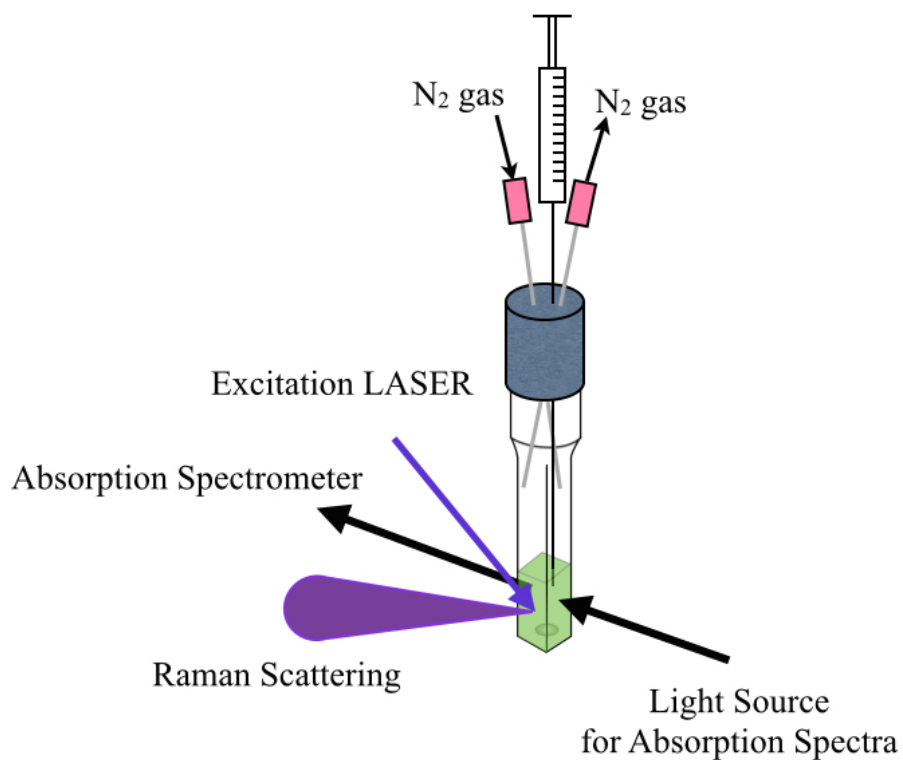


Figure 2-2  
サンプル点付近の光学系の模式図



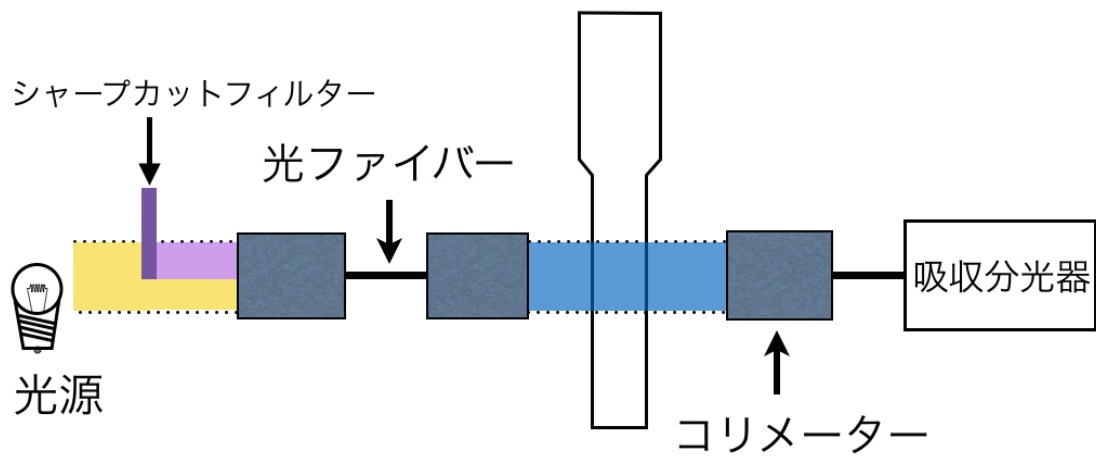


Figure 2-3  
吸収分光の光学系 (模式図)

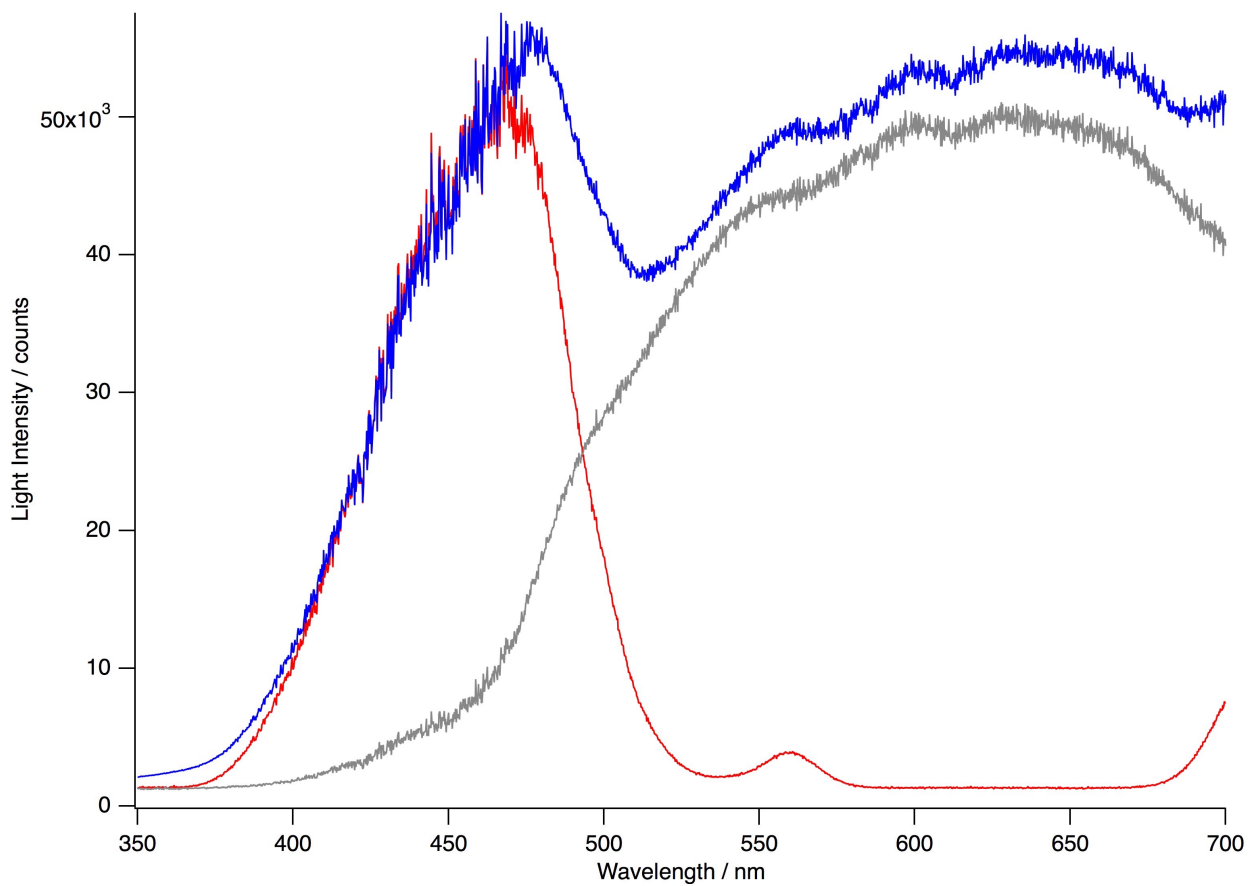


Figure 2-4  
USB4000で取得した光源のスペクトル

灰：シャープカットフィルターなし (露光時間：1.5 msec)、赤：シャープカットフィルターあり (露光時間：25 msec)、青：シャープカットフィルターで光を一部カット (露光時間：25 msec)

USB4000 (Ocean Optics)で測定

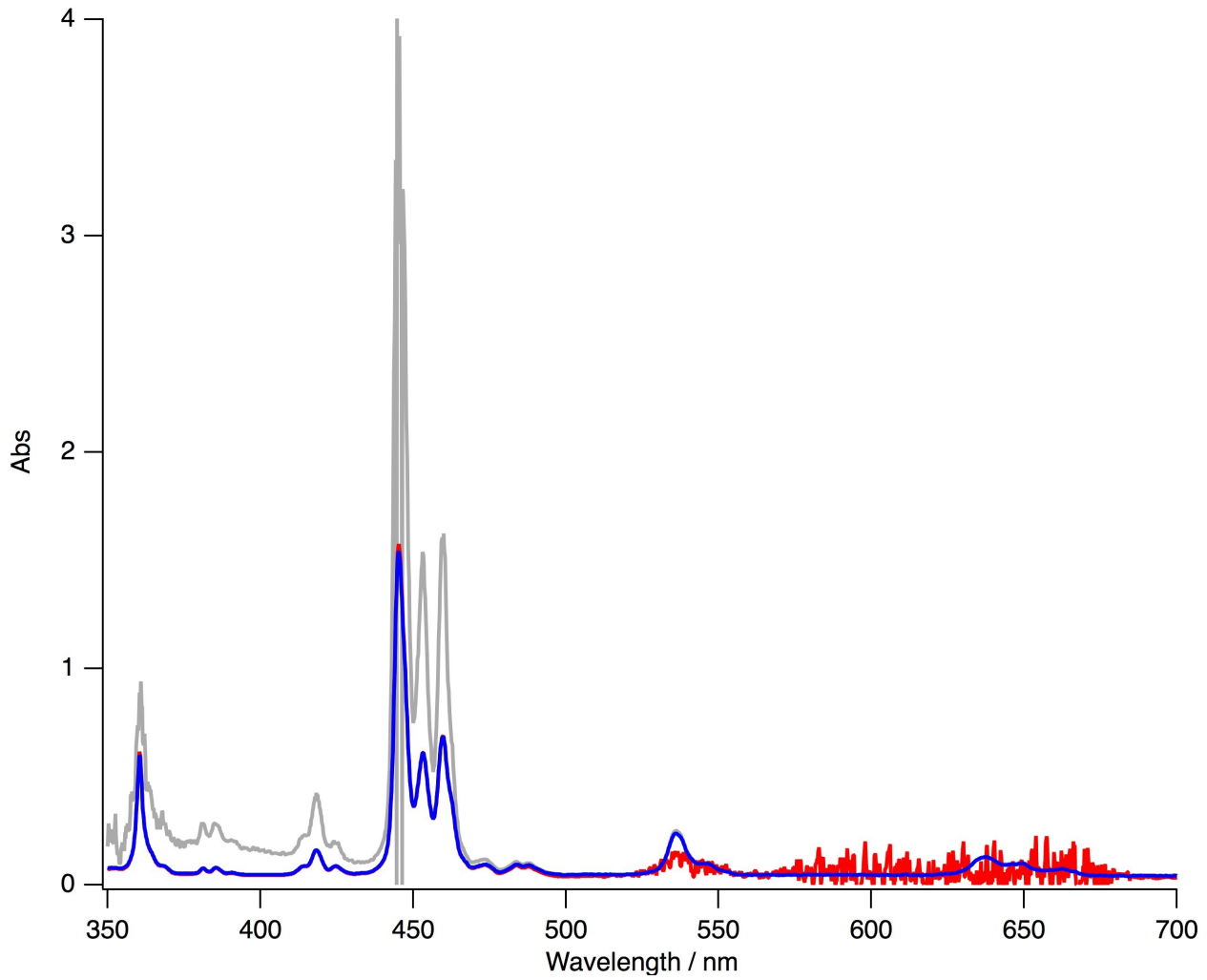


Figure 2-5

各光源を用いて測定した吸収スペクトル

灰：シャープカットフィルターなし (露光時間：1.5 msec)、赤：シャープカットフィルターあり (露光時間：25 msec)、青：シャープカットフィルターで光を一部カット (露光時間：25 msec)

USB4000 (Ocean Optics)で測定

## 2-3 安定性の検証

分光器、光源、室温の温度を測り取得されるスペクトルと比較した結果、室温及び分光器の温度変化とスペクトル変化が同期していることが分かった。Figure 2-6は室温と検出された光源の強度の経時変化である。このように検出される光の強度と室温 ( $20 \pm 0.6^\circ\text{C}$ ) の変化と同期していた。室温のこれ以上のコントロールは困難であるため、吸収分光器を発泡スチロール製の箱に入れ、光ファイバーに断熱材を巻くことで室温の変化の影響を取り除くことにした。

吸収分光器を発泡スチロール製の箱のなかに入れることで外部の温度変化の影響を受けなくなった。この時の箱内の温度は  $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$  であった。用いる吸収分光器は冷却装置を備えていおらず装置の温度は外気に依存する。そのため、室温の変化の影響を直に受けることでこのような周期的なノイズが起これると考えられる。Figure 2-7の179 nmや890 nmのように受光していない素子 (暗電流のみ) では現れないことから、熱による光子の検出感度の変化に由来すると考えられる。これらの事から本研究で用いる吸収分光器は温度変化が  $0.1^\circ\text{C}$  以内で安定に動作する事が分かった。

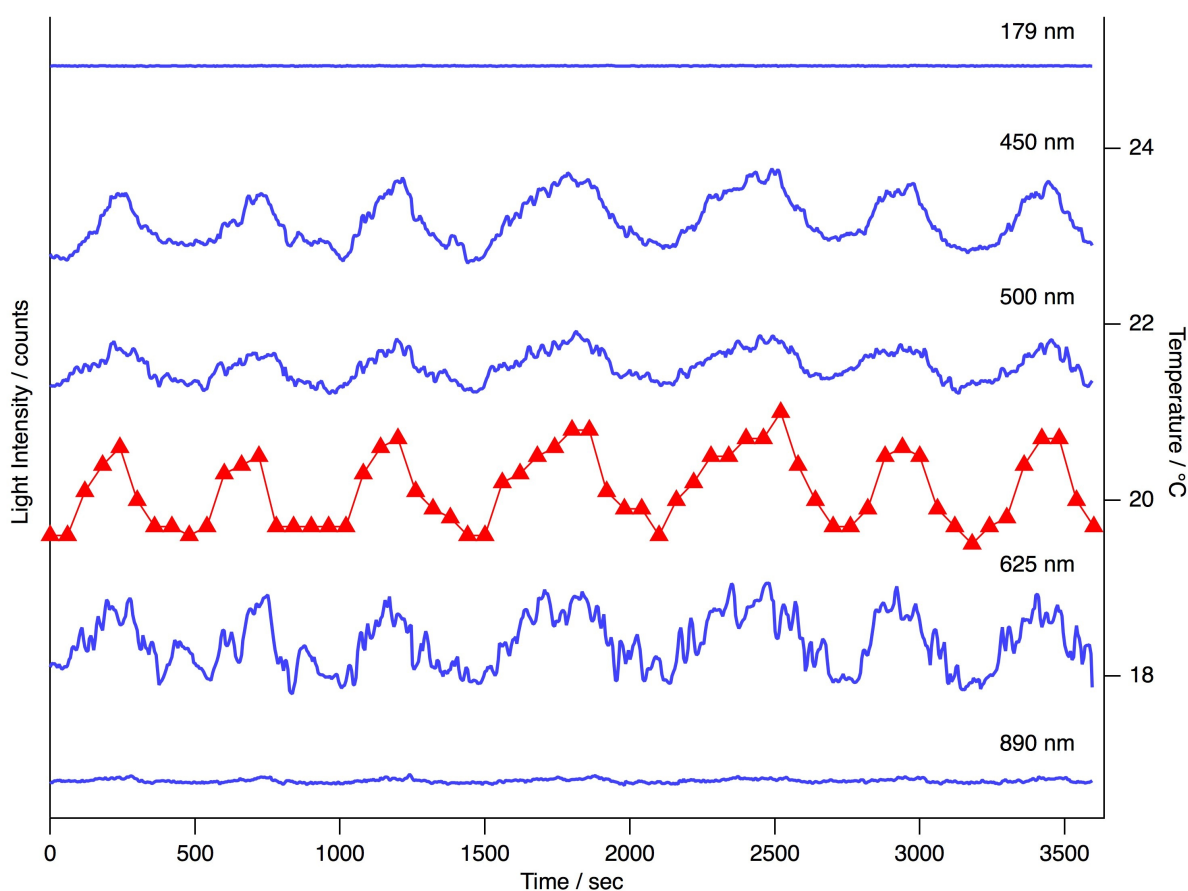


Figure 2-6

検出される光源の強度変化および室温の変化

青線：検出される光源の強度変化、三角：室温の変化

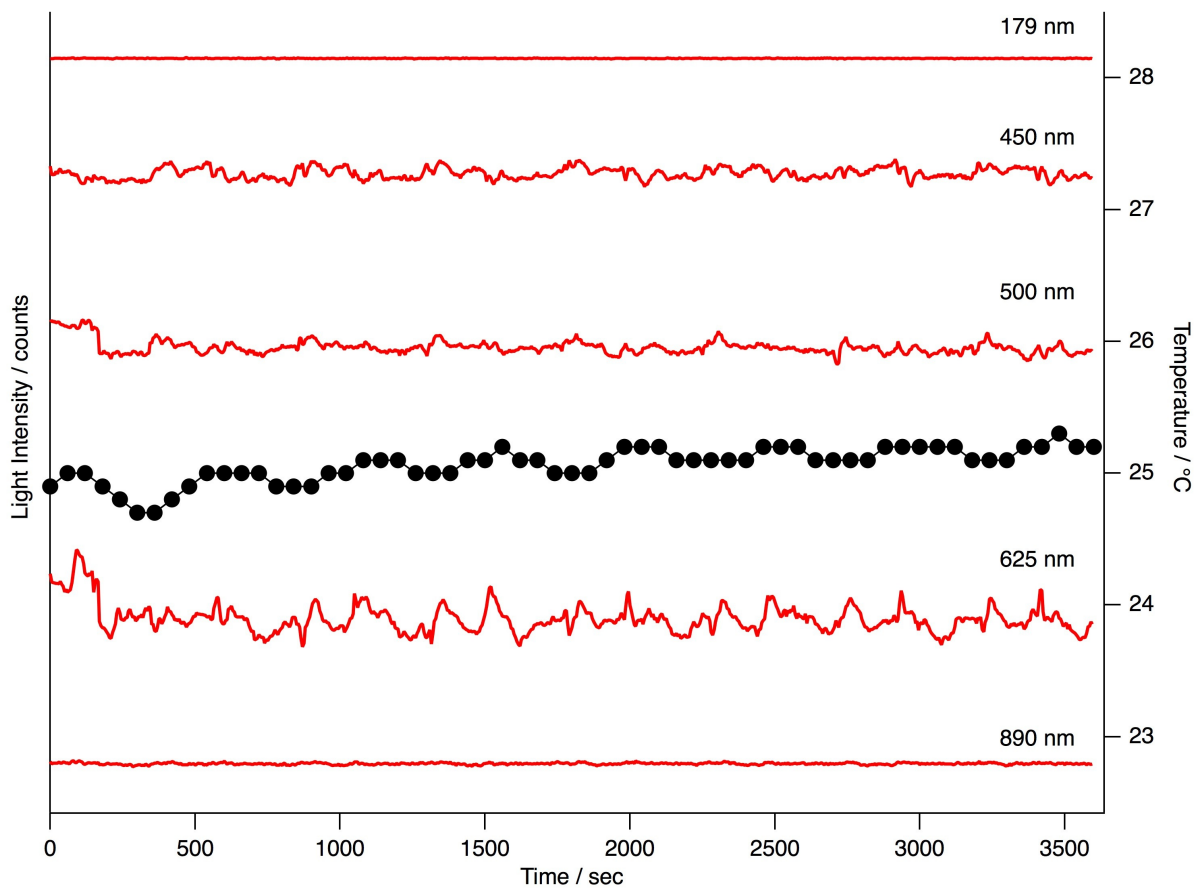


Figure 2-7  
 発泡スチロール製の箱に入れた時の検出される光源の強度変化および箱内の温度変化  
 赤線：検出される光源の強度変化、丸：箱内の温度変化

## 第三章 Rhodamine123による膜電位 ( $\Delta\Psi$ ) の検出

### 3-1目的

COVを用いて呼吸調節の仕組みを解明するために、 $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ 存在下でのスペクトル測定をする必要がある。そのため、共鳴ラマンスペクトル測定中の電位の検出は必要不可欠である。電位を測る方法として代表的なものにパッチクランプ法がある。この方法は直接電位を測定することができるが、COVのような試料には向いていない。新たな電位の検出法として蛍光色素による電位の検出を考えた。ここで用いるRhodamine123は生細胞中のミトコンドリアを染色する事に用いられる。<sup>[27]</sup> Rhodamine123は正の電荷を持っており、電位を生じるミトコンドリアに取り込まれて染色する。この時蛍光 (吸収) スペクトルが変化する。この性質を応用してCOVでの $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ の検出を行うことを試みた。しかしながら、染色方法としては確立されているものの電位の検出に用いられた例がないので、その手法の確立を目指した。

### 3-2 方法

粉末のRhodamine123を水に溶解し、終濃度1 mMにしたものを1 ml程度分注し、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。光路長1 cmのキュベットにRhodamine123を20  $\mu\text{l}$ 取り、水 (もしくはエタノール、ブタノール) で希釈 (終濃度10  $\mu\text{M}$ ) して吸収スペクトルを測定した。

CcOを含まない空のリポソーム (脂質濃度8.8 mg/ml)にRhodamine123 (終濃度10  $\mu\text{M}$ ) を添加した。この試料にNaOHを添加し、全体をアルカリ性にした後にHClを添加すると、リポソームの内外で $\Delta\text{pH}$ が生じ $\Delta\Psi$ を生成する。この現象を利用してRhodamine123の性能を評価した。

ラマン測定用セルにRhodamine123を含む空のリポソームを150  $\mu\text{l}$ 取りNaOHを添加して十分時間 (30分程度) 放置し全体をアルカリ性にした。ここからUSB4000を用いて5秒おきに吸収スペクトルを測定した。測定開始から5分後、HClを添加し外液のpHを中性にした。その後、プロトンがリークする事でベシクルの内外のpHは一定になり、 $\Delta\Psi$ が消失する。

pHは実際の測定用セルでは測定できないため、一辺10 mmのキュベットに測定用Bufferを2mlとり、NaOH、HClを添加した時のpHをpH電極を用いて測定した。

### 3-3 結果と考察

Rhodamine123の吸収スペクトルをFigure 3-1に示す。Rhodamine123は異なる疎水性条件下で吸収スペクトルが変化する。Figure 3-1を見ると疎水性が強くなるにつれて吸収極大が長波長シフトし、吸光度が大きくなる事が分かった。

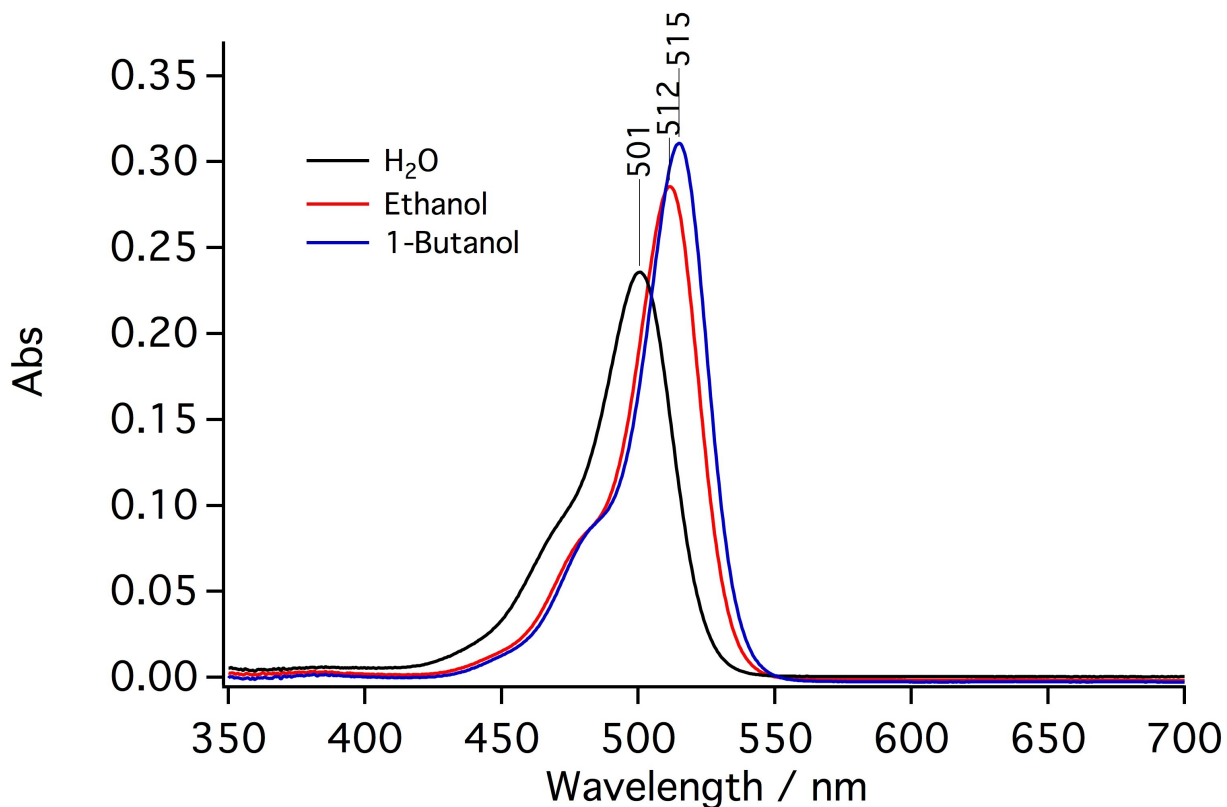


Figure 3-1  
Rhodamine123の吸収スペクトル

Figure 3-2にpH変化に伴う $\Delta\Psi$ の生成による吸収スペクトル変化を示す。アルカリ性条件下の空のリポソームにHClを添加すると、リポソーム内がアルカリ性、外液が酸性になり $\Delta\Psi$  ( $\text{pH}_{\text{inside}}=11.1$ ,  $\text{pH}_{\text{outside}}=6.75$ )を生成する (Figure 3-2A)。その後、プロトンがリークする事で膜内外のpHが等しくなり ( $\text{pH}_{\text{inside}}=6.75$ ,  $\text{pH}_{\text{outside}}=6.75$ )、 $\Delta\Psi$ が消失する。Figure 3-2Cを見ると、 $\Delta\Psi$ が生成すると524 nmに吸収が現れることが分かった。 $\Delta\Psi$ の生成によって長波長側に吸収が現れる事から、 $\Delta\Psi$ 生成時にはRhodamine123は疎水性条件下にあると考えられる。つまり $\Delta\Psi$ の生成に伴いRhodamine123が脂質膜中に引き込まれてこのように吸収が変化するのではないかと考えられる。

そこで、524 nmの吸光度変化を記録したものをFigure 3-3に示す。(a)はHClの添加で $\Delta\text{pH}=2.25$  ( $\text{pH}_{\text{inside}}=9.25$ ,  $\text{pH}_{\text{outside}}=7.0$ )の $\Delta\Psi$ が発生する時の吸光度変化、(a')はHClの添加で $\Delta\text{pH}=4.35$  ( $\text{pH}_{\text{inside}}=11.1$ ,  $\text{pH}_{\text{outside}}=6.75$ )の $\Delta\Psi$ が発生する時の吸光度変化、(b) (b')は(a) (a')にそれぞれイオノフォア (15  $\mu\text{M}$  valinomycin, 10  $\mu\text{M}$  FCCP)を添加したものである。(a) (a')を見ると電位の生成に伴い吸光度の上昇が見られた。この上昇値は $\Delta\text{pH}$ に比例していることが分かった。(Figure 3-4)しかし、外側がアルカリ性の時は $\Delta\Psi$ のインディケータにはならない。しかし、COVではそのような方向の $\Delta\Psi$ は生じないことから、Rhodamine123はCOVにおける $\Delta\Psi$ のインディケータとして用いることが可能であることが分かった。

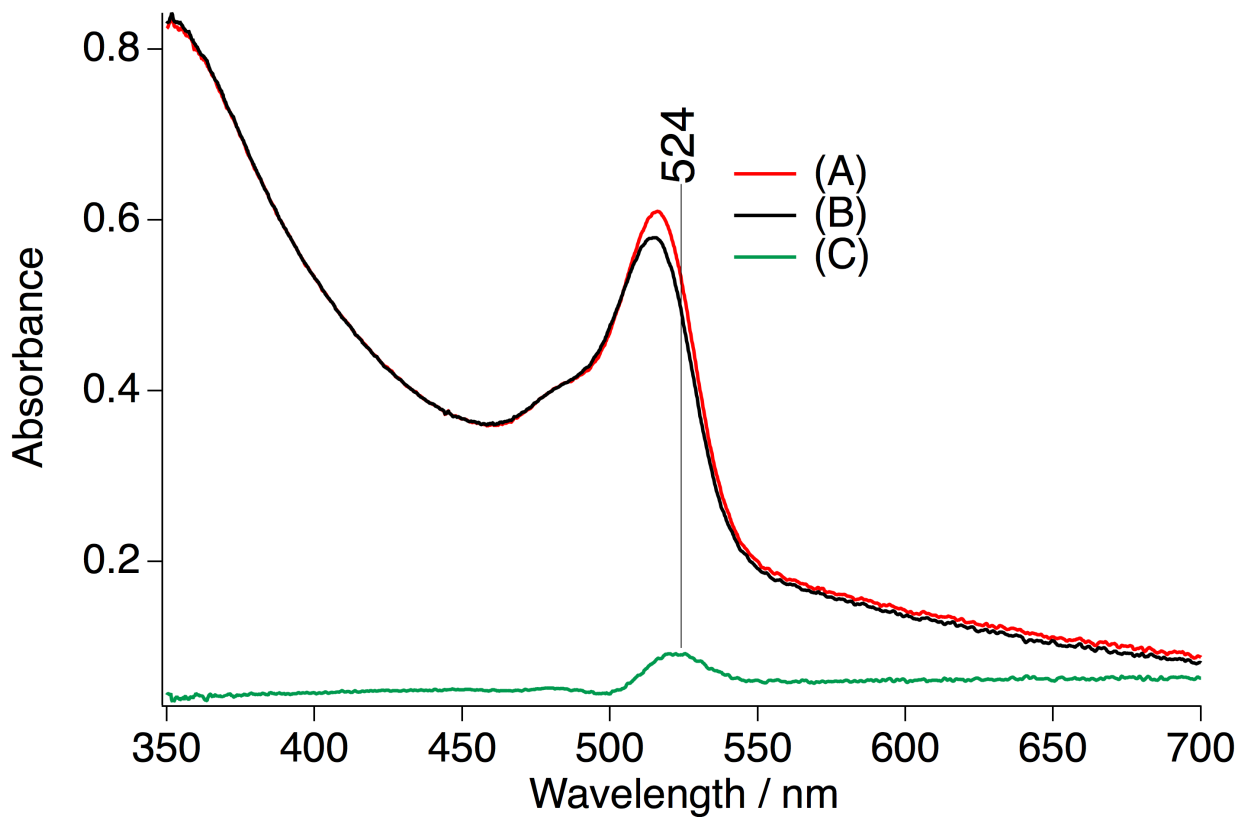


Figure 3-2  
Rhodamine123の吸収スペクトル

A :  $\Delta\Psi$ 発生時 ( $\text{pH}_{\text{inside}}=11.1$ ,  $\text{pH}_{\text{outside}}=6.75$ ) の吸収スペクトル、B :  $\Delta\Psi$ 消失後 ( $\text{pH}_{\text{inside}}=6.75$ ,  $\text{pH}_{\text{outside}}=6.75$ ) の吸収スペクトル、C : A-B。空のリポソームにRhodamine123を添加 (終濃度  $10 \mu\text{M}$ )



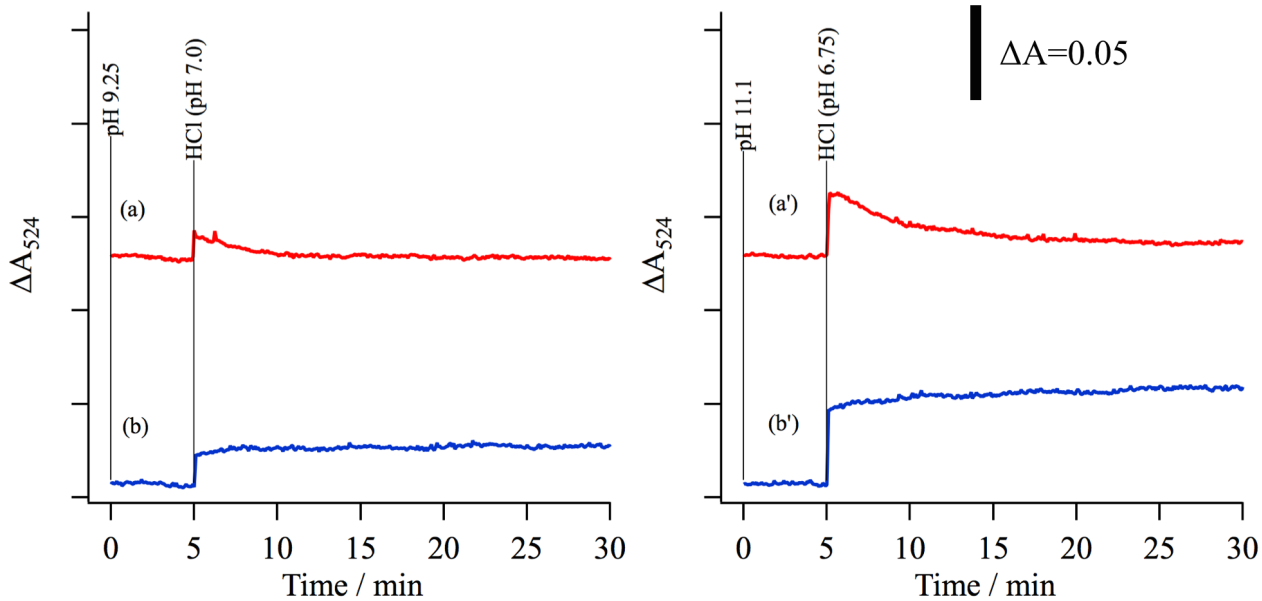


Figure 3-3  
524 nmの経時変化

(a) : HClの添加で $\Delta\text{pH}=2.25$  ( $\text{pH}_{\text{inside}}=9.25$ ,  $\text{pH}_{\text{outside}}=7.0$ ) の $\Delta\Psi$ が発生する時の吸光度変化、(a') : HClの添加で $\Delta\text{pH}=4.35$  ( $\text{pH}_{\text{inside}}=11.1$ ,  $\text{pH}_{\text{outside}}=6.75$ ) の $\Delta\Psi$ が発生する時の吸光度変化、(b) (b') : (a) (a') と同様の方法で測定開始前にイオノフォア (15  $\mu\text{M}$  valinomycin, 10  $\mu\text{M}$  FCCP) を添加

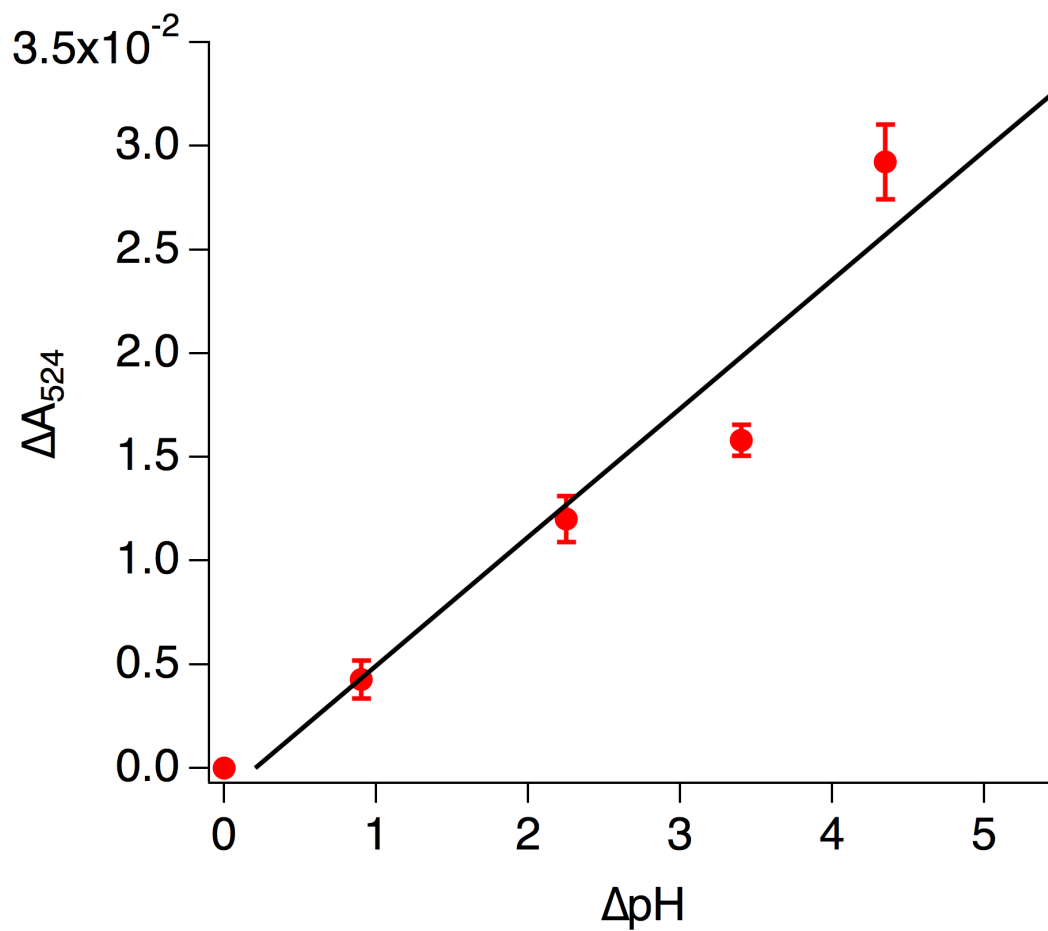


Figure 3-4

$\Delta\text{pH}$ に対する524 nmの吸光度変化量

各 $\Delta\text{pH}$ について3回ずつ測定。その結果の平均を算出し、標準偏差を求めてエラーバーを付した。直線は最小二乗法により各点からの誤差が最も小さくなる直線を引いた。

## 第四章 共鳴ラマンスペクトルの測定

## 4-1 目的

共鳴ラマン分光法により、COVのような巨大な超分子系であっても活性中心のhemeの構造のみを詳細に調べることができる。ここで言う「構造」とは化学式としての単純な構造ではなく、原子間の距離、分子の角度、hemeの電子状態やポルフィリン平面のゆがみ等を含んでいる。これらの情報は基質との親和性などと関係しており、CcOの機能を理解する上で必要不可欠である。これまでによく調べられてきた可溶化のCcO<sup>[13-15]</sup>と異なり、ウシ心筋CcOを用いて調製されたCOVの共鳴ラマンスペクトルの報告は未だない。

COVではCcOが膜に埋め込まれており、その構造はミトコンドリア中でのCcOの構造に非常に近いと考えられる。CcOが膜に埋め込まれていることでタンパク質構造に影響を与えることも考えられる。そこで定常状態のCOVについて吸収、ラマンスペクトル測定を行い、その構造を詳細に調べる必要がある。種々の中間体のうち完全還元型は調製が容易で、長時間安定であるため、まずは還元型COVについて詳しく調べる事にした。また、Mixed-valence CN-結合型 (heme  $a^{2+}$ , heme  $a_3^{3+}$ -CN $^-$ ) COVの共鳴ラマンスペクトルを測定し完全還元型COVと比較する事でheme  $a^{2+}$ , heme  $a_3^{2+}$ 由来のバンドを区別し<sup>[28]</sup>、より詳しくCOVの構造を比較する。

また、呼吸調節状態、つまりCcOが $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ を生成し酸素還元反応速度が低下している時は、その速度を制御するために何らかの構造変化が起こっていると考えられる。この構造変化を観測するためにCOVを用いて $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ を伴うCcOの共鳴ラマンスペクトルを測定する。調製したCOVの共鳴ラマンスペクトルを測定して、 $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ が発生している時のCOVとしていない時のCOVのhemeの構造を比較して呼吸調節状態におけるCOVの構造について詳細に調べた。

## 4-2 方法

### ジチオナイト水の調製

COVの還元にはジチオナイト水を使用した。試験管にイオン交換水を適量入れ、セプタムで蓋をした。セプタムに注射針を液面に触れないように刺した。この注射針に窒素ガス流入用の細長い注射針を先端が試験管の底に届くように差し込んだ。ここに窒素ガスを1時間以上流し $\text{O}_2$ を取り除き $\text{N}_2$ に置換した水を作った。

試験管に粉末のジチオナイト ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , 分子量 174) 87 mgを取り、セプタムで蓋をしてセプタムと試験管の間に隙間ができないようにパラフィルムをしっかりと巻きつけた。真空ラインで十分に脱気窒素置換し、 $\text{N}_2$ に置換した水を1 ml加えた。 $\text{N}_2$ に置換した水を加えた後、素早く数回脱気窒素置換をして500 mMジチオナイト水とした。

100 mMジチオナイト水の場合は同様の手順で粉末ジチオナイト17.4 mgに対し窒素水1 mlを加えた。

### 完全還元型COVの調製法

200  $\mu\text{l}$ のCOV (1.5~2.1  $\mu\text{M}$ ) を測定用セルに入れ、セプタムで蓋をしてセプタムと測定用セルの間に隙間ができないようにパラフィルムをしっかりと巻きつけた。十分に脱気、窒素置換し、500 mMジチオナイト水を2  $\mu\text{l}$  (終濃度5 mM) 添加し、10分程度静置し完全還元型COVとした。可溶化CcOの場合は測定用Bufferにデシルマルトシド (終濃度0.2 %) を加え、同様の手順で調製した。

## Mixed-valence CN結合型COVの調製法

Mixed-valence CN結合型COVはRousseauらの方法に基づいて調製を行った<sup>[28]</sup>。200  $\mu$ lのCOV (1.5~2.1  $\mu$ M) を十分に脱気、窒素置換し、100 mMジチオナイト水を2  $\mu$ l (終濃度1 mM) 添加し、30分静置した。そこへ100 mM KCN (in 100 mM NaOH) を4  $\mu$ l (終濃度2 mM) 添加した。この時pHが大きく変化 (pH7.2から10.1) するので、HClを添加してpH7.2程度まで速やかに戻した。その後、空気を導入して十分に攪拌しMixed-valence CN結合型COVを調製した。可溶化CcOの場合は測定用Bufferにデシルマルトシド (終濃度0.2 %) を加え、同様の手順で調製した。

## スペクトル測定

各スペクトル測定は第二章に記した装置で行った。測定条件はレーザーパワー10 mW、分光器のスリット幅は150  $\mu$ mで測定を行った。吸収スペクトル測定はU-3310 (日立) で行った。完全還元型COV、Mixed-valence CN結合型COVの共鳴ラマンスペクトルの積算時間は30分で行った。取得した共鳴ラマンスペクトルは直線でフィッティングしてベースラインを差し引いた。

## $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ を伴う還元型COVの調製法

$\Delta\mu_{\text{H}^+}$ はCOV自身の酸素還元反応に伴うプロトンポンプにより生成した。

COVをアスコルビン酸存在下でcyt.cと反応させると酸素還元反応が始まる。この時プロトンポンプが行われ $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ が生成する。酸素還元反応は還元型COVに酸素が結合することで始まる (Figure 0-4) ので酸素の供給がなければ、COVの反応サイクルは還元型で停止する。この事を利用して $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ を伴う還元型COVを調製した。測定用のセルに $\Delta\Psi$ のインディケーターであるRhodamine123を終濃度10  $\mu$ Mになるように添加したCOV (1.5~2.1  $\mu$ M) を200  $\mu$ l入れ、セプタムで蓋をしてパラフィルムで密閉した。吸収スペクトル、共鳴ラマンスペクトルの測定を開始し、1 min後にアスコルビン酸 (終濃度25 mM) を添加、更に2 min後にcyt.cを添加すると酸素還元反応が始まった。その1 min後からセル内に窒素ガスを流し、セル内の気相を窒素ガス置換した。窒素ガスはセル内の乾燥を防ぐためにしっかりと水をバブリングして加湿した。また、これによりセル内が結露しないように、加湿装置をセルホルダーを冷却する恒温槽に入れ、窒素ガスの温度とセル内の温度を一致させた。測定開始から60分間、USB4000で吸収スペクトルを5 sec毎に取得し、共鳴ラマンスペクトルはレーザーパワー10mW、積算時間1 minで記録し続けた。

測定用のセルにRhodamine123を終濃度10  $\mu$ Mになるように添加したCcO (2  $\mu$ M) を200  $\mu$ l入れセプタムで蓋をし、パラフィルムで密閉した。測定開始1 min後にアスコルビン酸 (終濃度25 mM) を添加、更に2 min後にcyt.cを添加すると酸素還元反応が始まった。その1 min後からセル内に窒素ガスを流し、セル内の気相を窒素ガス置換した。この時添加するcyt.cの終濃度を5, 10, 20, 30  $\mu$ Mで実験を行い還元型CcOのソーレー帯 (442 nm) の吸光度変化から時定数を求め、適切なcyt.c濃度を決定した。

### 4-3 結果と考察

Figure 4-1に還元型COV、還元型CcOの吸収スペクトルを示す。444 nmにソーレー帯が、604 nmに $\alpha$ 帯が見られる。COVとCcOのスペクトルはソーレー帯や $\alpha$ 帯など本質的には同じであった。しかし、COVではベシクルによる光の散乱の為に短波長側にいくほど見かけの吸光度が高くなっていった。

Figure 4-2の完全還元型COV、CcOの共鳴ラマンスペクトルを比較すると、800-1700  $\text{cm}^{-1}$ の高波数領域では両者に違いは見られなかった。この領域は一般的にヘムの骨格振動が現れるが、この領域で違いが見られないということは、膜への再構成はhemeの構造へは直接影響は与えないものと考えられる。しかし、低波数側を見るとCcOとCOVでは構造に違いがあった。低波数領域ではhemeに結合する分子の振動モードや側鎖の振動モードが見られるFigure 4-2を見るとCOVとCcOではheme  $a^{2+}$ の $\delta_{\text{vinyl}}$  ( $C_{\beta}$ -CH=CH<sub>2</sub> bending) である436  $\text{cm}^{-1}$ のバンド<sup>[28, 29]</sup>はCOVでは可溶性のCcOに比べて低波数シフトしており、214  $\text{cm}^{-1}$ のheme  $a_3$ の $\nu_{\text{Fe-His}}$ <sup>[30]</sup>の強度が変化していた。681  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_7$ )および745  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{16}$ )もCOVでは低波数シフトしていることが分かったが、これらのバンドの挙動と構造変化の関係はよく分かっていない。

$\delta_{\text{vinyl}}$ の低波数シフトはHelix Xによるheme  $a$ のビニル基への立体障害の影響が減少しているためであると考えられる。また、 $\nu_{\text{Fe-His}}$ の強度の変化はheme平面とFe-His結合の角度の変化やヒスチジン平面の回転、heme平面とFe原子の相対位置の変化のいずれかが原因であると考えられる。<sup>[31, 32]</sup> Fe-His結合の変化は酸素分子との結合の親和性に影響を与える<sup>[33]</sup> ことが分かっており、これが呼吸調節に関わっていることも考えられる。

Figure 4-3にCOVの完全還元型、mixed-valence CN結合型の吸収スペクトルを示す。mixed-valence CN結合型CcOでは、heme  $a_3$ にCNが結合することで、heme  $a_3$ に由来する吸収帯が425 nmにシフトするため、441.6 nmで励起して共鳴ラマンスペクトルを測定するとheme  $a$ のみが共鳴効果を受け観測される。

Figure 4-4に完全還元型CcO (COV) とmixed-valence CN結合型CcO (COV) の共鳴ラマンスペクトルを示す。(A)は完全還元型COV ( $a^{2+}$ ,  $a_3^{2+}$ )、(B)はmixed-valence CN結合型COV ( $a^{2+}$ ,  $a_3^{3+}$ -CN<sup>-</sup>)、(C)はA-B (COV heme  $a_3^{2+}$ )、(D)は完全還元型CcO、(E)はmixed-valence CN結合型CcO、(F)はD-E (CcO heme  $a_3^{2+}$ )、(G)はheme  $a_3^{2+}$ のCOVとCcOの差スペクトル (F-C) である。Figure 4-4GにはCcOが膜に再構成されることで現れる構造変化のうち、heme  $a_3^{2+}$ に由来する構造変化が現れる。しかし、差として現れたバンドの挙動と実際の構造の変化の関係については今後の研究が必要である。

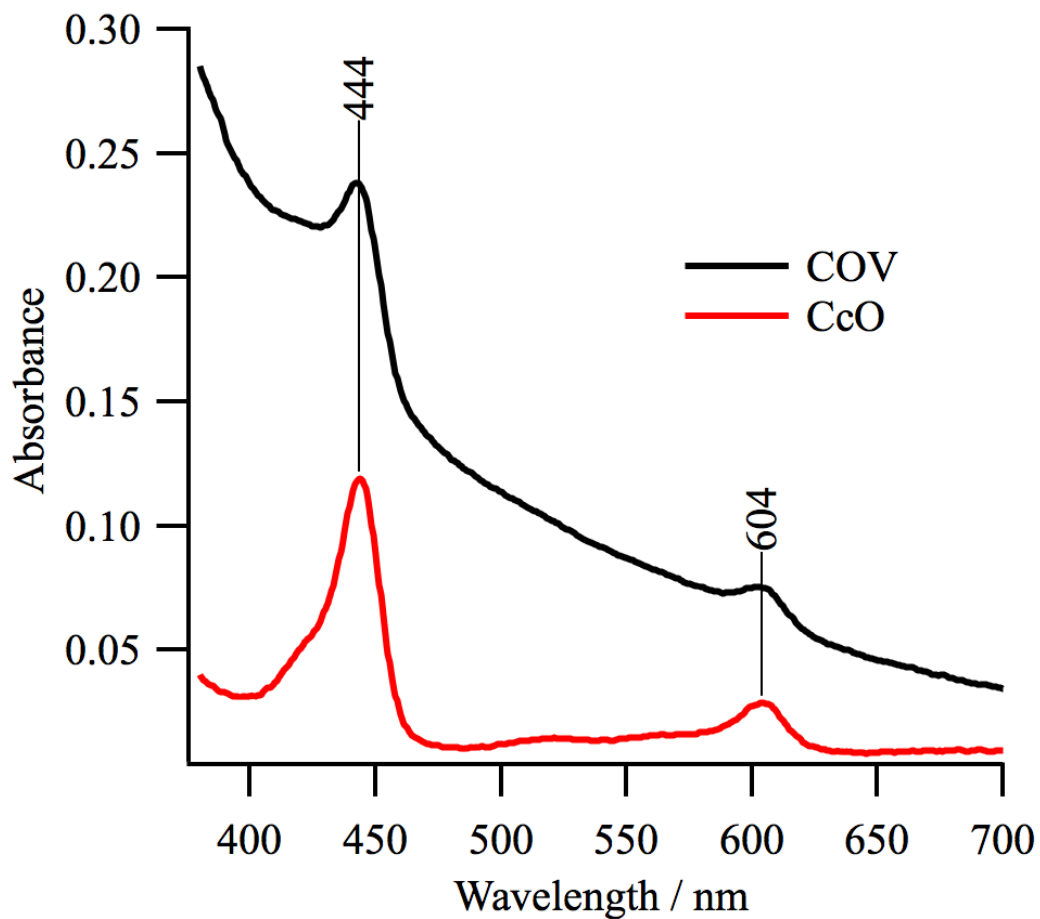


Figure 4-1  
還元型COV、還元型CcOの吸収スペクトル

COVの吸収スペクトルにおいて短波長側の吸光度が徐々に大きくなるのはベシクルの散乱により見かけの吸光度が大きくなっていく為である。

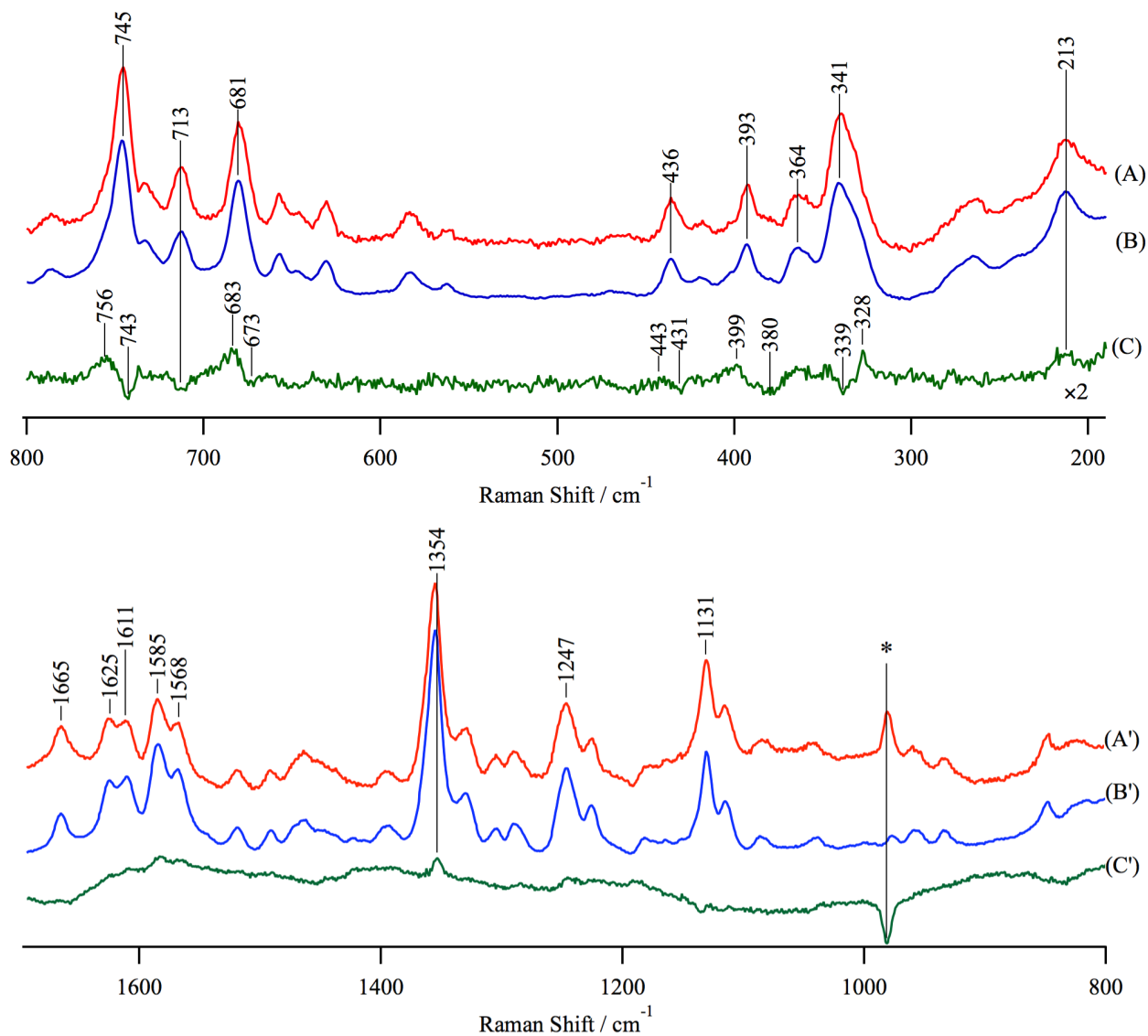


Figure 4-2  
還元型COV、還元型CcOの共鳴ラマンスペクトル

A, A': 還元型COVの共鳴ラマンスペクトル、B, B': 還元型CcOの共鳴ラマンスペクトル

C: B - A, C': B' - A'

励起波長は441.6 nmで積算時間は30分。COV濃度は1.7 $\mu$ M、CcO濃度は2 $\mu$ Mで測定した。

\*はCOVの調製時に用いるCcOに含まれる(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>に由来するバンドである。



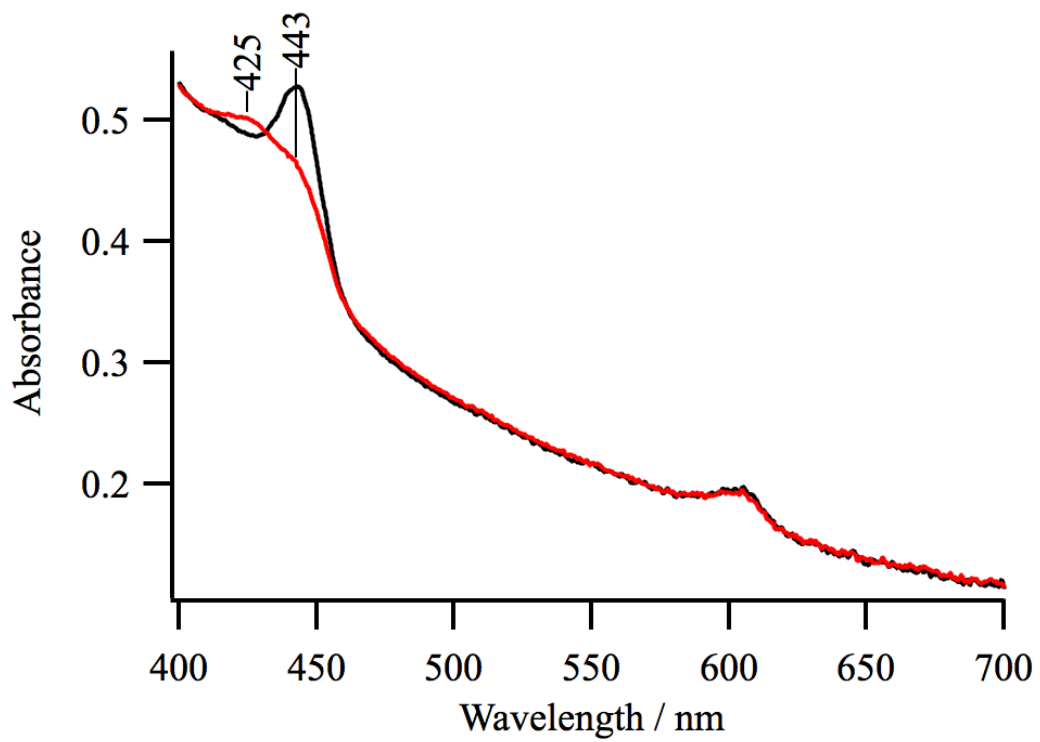


Figure 4-3

完全還元型COV ( $a^{2+}a_3^{2+}$ , 黒) と mixed-valence CN<sup>-</sup>結合型COV ( $a^{2+}a_3^{3+}$ -CN<sup>-</sup>, 赤) の吸収スペクトル USB4000で測定した。COV濃度は1.7 $\mu$ Mである。

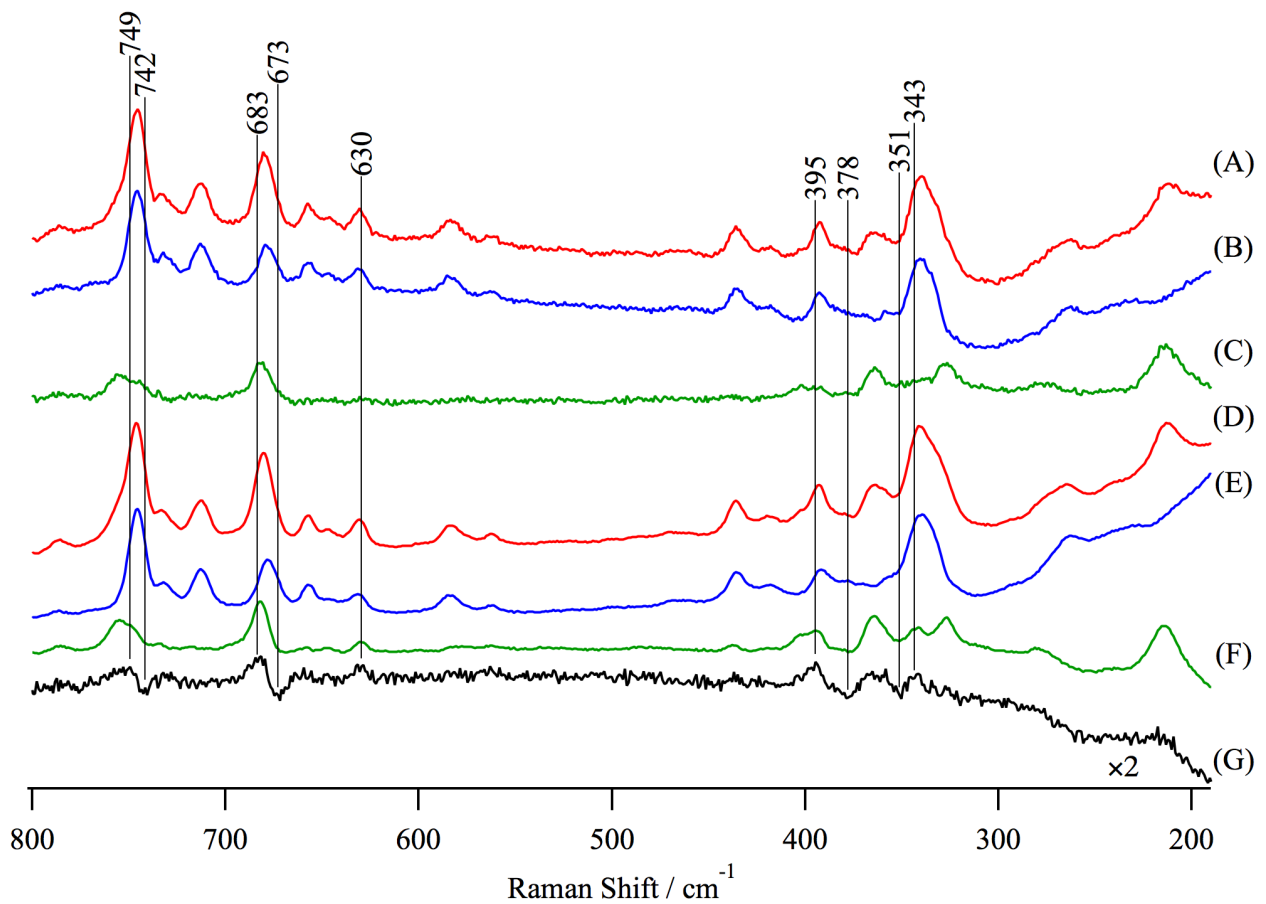


Figure 4-4  
COVおよびCcOの共鳴ラマンスペクトル

A : 完全還元型COV ( $a^{2+}$ ,  $a_3^{2+}$ )、B : mixed-valence CN<sup>-</sup>結合型COV ( $a^{2+}$ ,  $a_3^{3+}$ -CN<sup>-</sup>)、C : A - B ( $a_3^{2+}$ )、D : 完全還元型CcO ( $a^{2+}$ ,  $a_3^{2+}$ )、E : mixed-valence CN<sup>-</sup>結合型CcO ( $a^{2+}$ ,  $a_3^{3+}$ -CN<sup>-</sup>)、F : D - E ( $a_3^{2+}$ )、G : F - C  
励起波長は441.6 nmで積算時間は30分。COV濃度は1.7 $\mu$ M、CcO濃度は2 $\mu$ Mで測定した。

$\Delta\mu_{H^+}$ を伴う還元型COVを調製する時のcyt.c濃度の検討を行った。2  $\mu\text{M}$ 可溶化のCcOを用いてcyt.c濃度を5, 10, 20, 30  $\mu\text{M}$ で還元型CcO(2  $\mu\text{M}$ )の生成速度を調べた。Figure 4-5に還元型CcOのソーレー帯 (442 nm) の吸光度変化を示す。CcO、アスコルビン酸存在下で測定を開始し、測定開始2分後にcyt.cを更に1分後に気相の窒素ガス置換を開始すると、溶液中の酸素が尽きたところで還元型CcOが生成される。この時Figure 4-5に示すような吸光度の上昇が観測される。cyt.c 20  $\mu\text{M}$ 以上の時、cyt.c添加直後に吸光度の減少が見られる。これはFigure 1-1で示した通り、還元型cyt.cの442 nmの吸光度が酸化型cyt.cよりも小さく、その変化が顕著に見えるからである。測定開始60分後にジチオナイトを添加した。この時吸光度が減少した。吸光度の減少率を計算したところ、ジチオナイト添加に伴う体積増加による全体の濃度の減少が原因であることが分かった。

吸光度変化から計算された各濃度における還元型生成の時定数はTable 4-1の通りである。これは還元型生成時の大きな吸光度変化が終了した後に現れるゆっくりとした変化をフィッティングして得られたものである。この吸光度変化は5秒毎に測定した吸収スペクトルから得られたものである。つまり、cyt.c濃度が30  $\mu\text{M}$ の時は検出限界以下であり、CcOに対してcyt.cが十分に存在し溶液内の酸素が尽きると瞬時にすべてのCcOが還元型になるといえる。

Table 4-1  
各濃度における還元型CcO生成の時定数

cyt.c ( $\mu\text{M}$ )	$\tau$ (sec)
5	$65 \pm 6$
10	$34 \pm 3$
20	$7 \pm 1$
30	$< 5$

この条件で $\Delta\mu_{H^+}$ を伴う還元型COVを調製した時のcyt.c (550 nm)、Rhodamine123 (524 nm)、還元型COVのソーレー帯 (443 nm) の吸光度変化をFigure 4-6に示す。COV、Rhodamine123存在下で測定を開始し、 $T_1$ でアスコルビン酸を終濃度25mMになるように添加、その後 $T_2$ でcyt.cを終濃度が30  $\mu\text{M}$ になるように添加した。この時550, 524, 443 nmすべての波長で吸光度の上昇が観測された。これはcyt.cに由来する吸収のためである。cyt.cは550 nm還元型の吸収極大、524 nmに酸化還元等吸収点、443 nmにソーレー帯の裾がある。各波長ともイオノフォア存在、非存在下では上昇幅が異なる。550, 443 nmはCOVのturn-overの速度の違いによるもので、イオノフォア存在下では呼吸調節が行われないため、酸素還元反応速度が大きい。そのためイオノフォア存在下では酸化型cyt.cの割合が還元型cyt.cの割合より高いので、550 nmの上昇幅が小さい。一方443 nmはFigure 1-1に示したとおり、酸化型の方が443 nmの吸光度が大きいので上昇幅が大きい。524 nmでの上昇幅の違いは $\Delta\Psi$ によるもので、イオノフォア非存在下ではプロトンポンプに伴うプロトン駆動力が生じるのでRhodamine123による吸光度の上昇が大きい。その後、 $T_3$ よりセル内に窒素ガスを流すと気相から酸素が無くなり、溶液中の酸素が尽きたところ ( $T_4$ ,  $T_5$ ) でCOVは還元型になった。

酸素が尽きた後の443, 524 nmの吸光度変化の時定数を二成分あるとしてフィッティングすると、443 nmの上昇の時定数は $3.0 \pm 1.4$  minと $14 \pm 11$  min (n=3)、524 nmの減少の時定数が $5.0 \pm 0.9$  minと $95 \pm 54$  min (n=3)であった。524 nmの減少について、時定数95分のゆっくりと変化する成分はRhodamine123の退色など、 $\Delta\Psi$ による変化とは異なると考えられる。つまり、 $\Delta\Psi$ の変化に関わる時定数は5分であり、

これは443 nmの吸光度変化の時定数( $3.0 \pm 1.4$  min)と同じであると言える。この時のT<sub>5</sub>から5分間 (もしくは1分間) のスペクトル、完全還元型のスペクトル、それらの差スペクトルをFigure 4-7に示す。差スペクトルを見ると $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ の有無によって強度変化が見られた。

T<sub>5</sub>以降の443, 524 nmの吸光度変化を見ると時定数が一致していることから、443 nmの吸光度変化は $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ が関わっていると考えられる。Figure 4-8にT<sub>5</sub>の時点での吸収スペクトル、測定開始60分後の $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ の消失後の吸収スペクトル、それらの差スペクトルを示す。差スペクトルに現れる444 nmの吸光度から還元型hemeの割合を算出すると $45 \pm 5\%$  (n=4) である。また、Figure 4-7A'を見るとheme a<sub>32+</sub>に特徴である213 cm<sup>-1</sup>の $\nu\text{Fe-His}$ [30] が消失している。更に364 cm<sup>-1</sup>はheme a<sub>32+</sub>の $\gamma_6$ [34-36]、357 cm<sup>-1</sup>はheme a<sub>2+</sub>の $\gamma_6$ [28] である。これらは酸化還元マーカーとして用いられており、Figure 4-7Cで357 cm<sup>-1</sup>に差が見られず、364 cm<sup>-1</sup>が強度変化していることから、 $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ が発生している間はheme aは2価の状態、heme a<sub>3</sub>は3価の状態であるといえる。また、この差スペクトルはFigure 4-4Cとも一致している事もa<sub>2+</sub>、a<sub>33+</sub>であることを支持している。これらの結果から $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ が最大の時は酸素が無く、cyt.cからの十分な電子供給があるにも関わらず、heme aからheme a<sub>3</sub>への電子伝達が起こらないと考えられる。定常状態における分子内の律速段階はheme aからheme a<sub>3</sub>への電子伝達であることが分かっている。[37] heme a、heme a<sub>3</sub>の鉄原子はCcO中での垂直位置はほとんど変わらないことから、 $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ による電場がhemeに与える影響はheme a、heme a<sub>3</sub>共に同じであると考えられる。この事からheme aからheme a<sub>3</sub>への電子伝達を制御するのはhemeの側鎖もしくはHelix Xへの電場の影響である可能性が高い。Helix Xはheme aとheme a<sub>3</sub>の間に存在し、His378とHis376を介してそれぞれ結合している。[38] Helix Xはheme a<sub>3</sub>の酸化還元、配位子の変化により構造が変化することが分かっており、H-pathway上のH<sup>+</sup>もしくは水分子のゲートの役割をすることが提唱されている。[10, 39] そしてHelix Xの軸の配向はミトコンドリア内膜と垂直になっておりC=O...HNで電気的雙極子モーメントを形成しているため、 $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ の影響を受けた結果、反応の制御を行うのかもしれない。[39, 40]

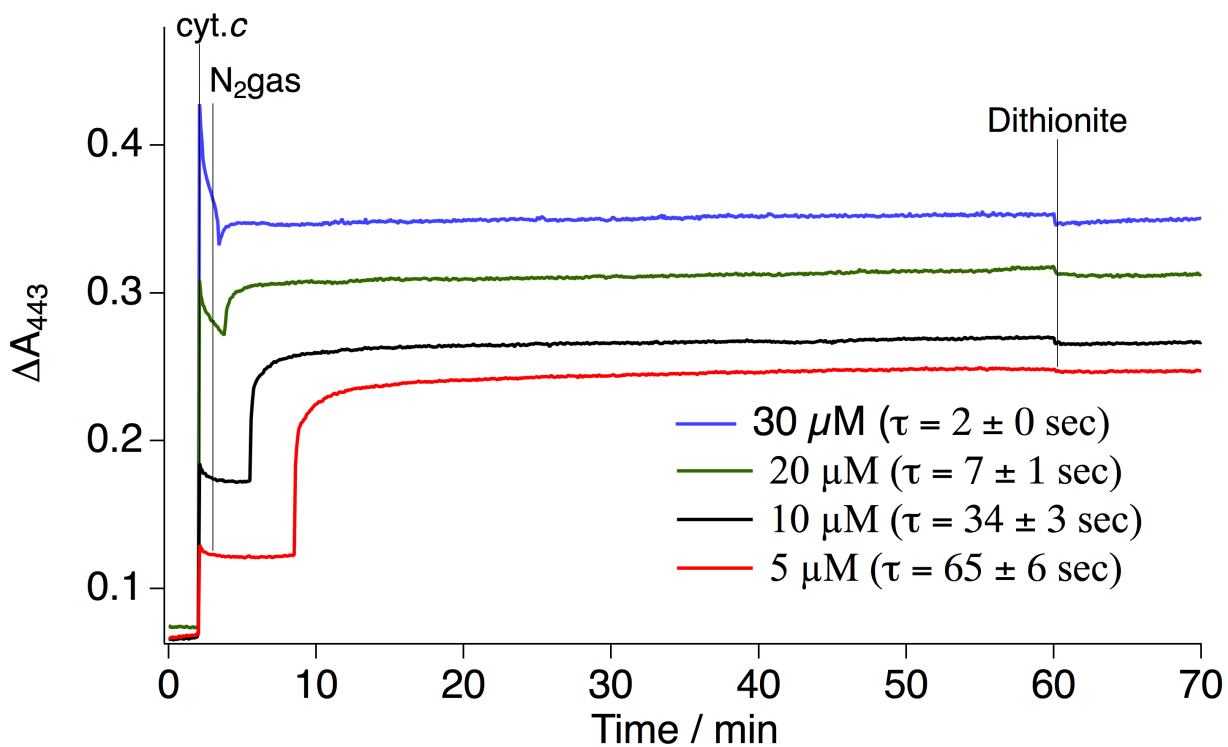


Figure 4-5  
還元型CcOのソーレー帯 (443 nm) の吸光度変化

CcO (2  $\mu\text{M}$ )、アスコルビン酸 (25 mM) 存在下で測定を開始し、測定開始2分後にcyt.cを更に1分後に気相の窒素ガス置換を開始した。溶液中の酸素が尽きたところで還元型CcOが生成された。測定開始60分後にジチオナイトを添加し、完全に還元した。

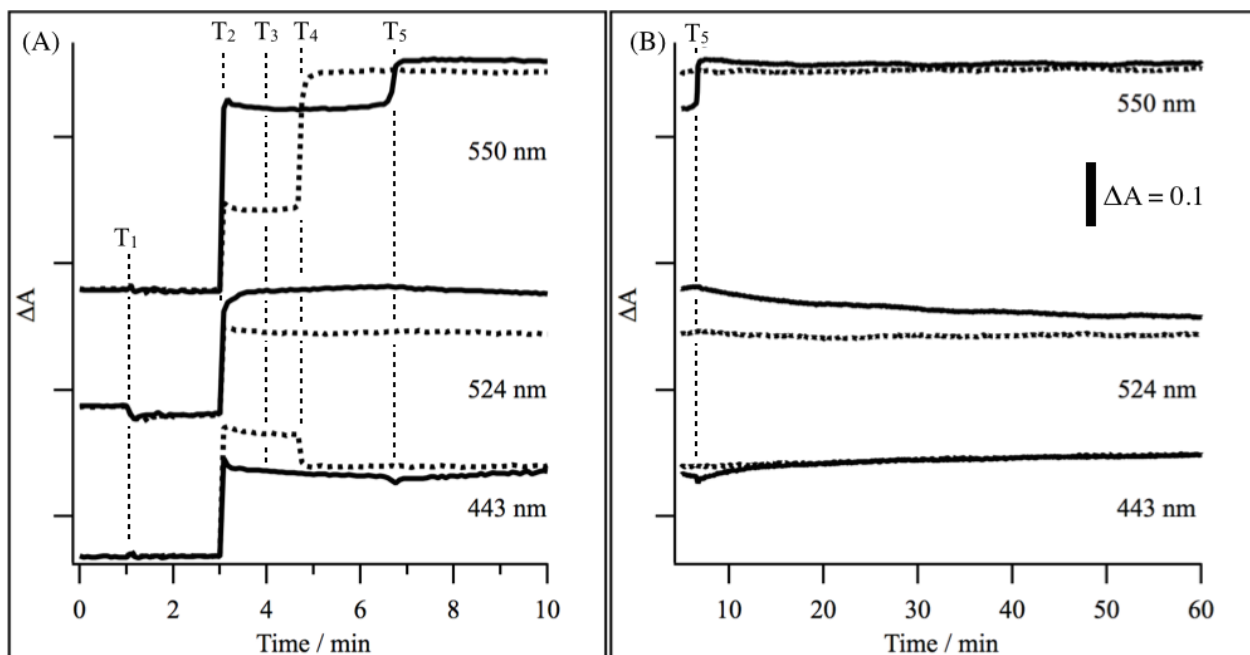


Figure 4-6

cyt.c (550 nm)、rhodamine123 (524 nm)、還元型COVのソーレー帯 (442 nm) の吸光度変化

実線はイオノフォアを含まない $\Delta\mu_H^+$ を生じるCOVでの測定結果で、破線はイオノフォアを含む $\Delta\mu_H^+$ が生じない時の測定結果である。測定開始から1分後 ( $T_1$ ) でアスコルビン酸 (終濃度25 mM) を添加し、その2分後 ( $T_2$ ) にcyt.c (終濃度30  $\mu\text{M}$ ) を添加した。cyt.c添加から1分後に測定用セルに窒素ガスを流した。溶液中の酸素が全て消費され、気相が窒素ガスに置換された時 (破線では $T_4$ 、実線では $T_5$ ) COVは還元型になった。この時のCOV濃度は1.8 $\mu\text{M}$ である。

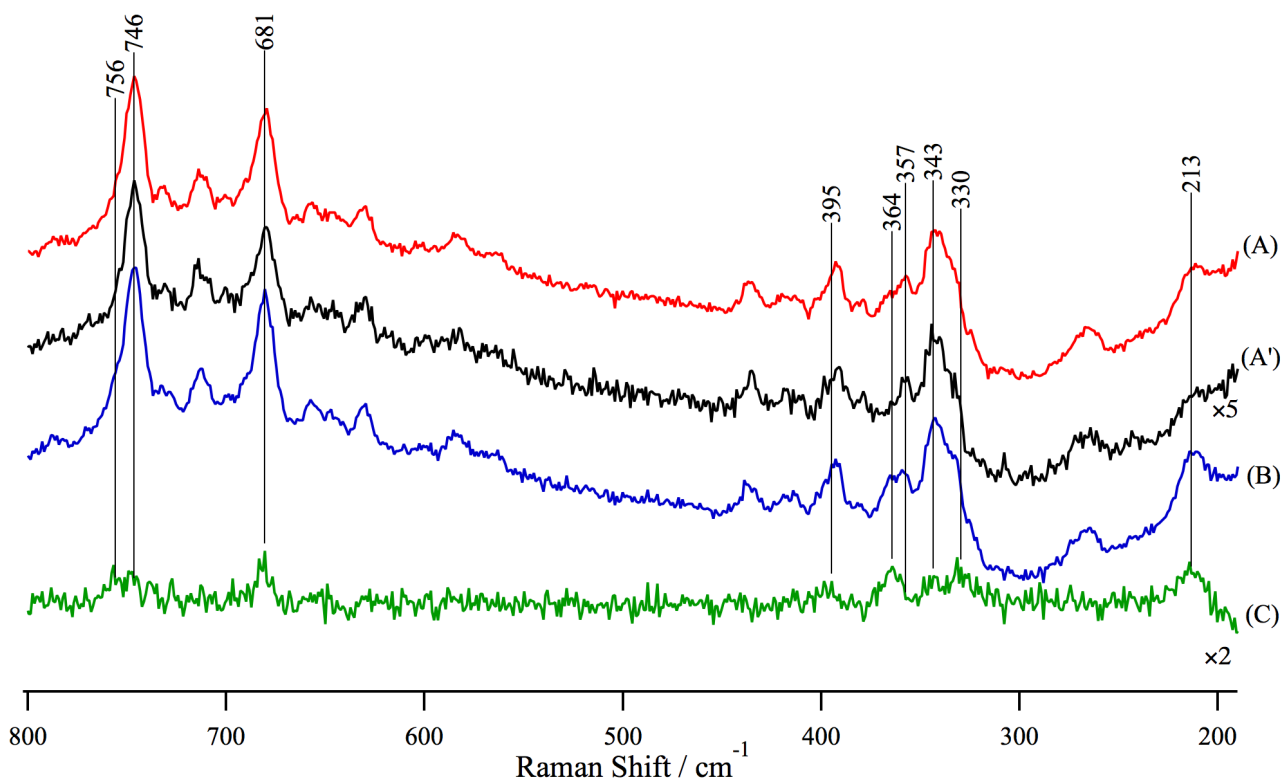


Figure 4-7

$\Delta\mu_{H^+}$ 存在、非存在下における還元型COVの共鳴ラマンスペクトル

A : Figure 4-6T<sub>5</sub>から5分間測定した共鳴ラマンスペクトル、A' : Figure 4-6T<sub>5</sub>から1分間測定した共鳴ラマンスペクトル、B : 測定開始60分から65分の5分間の共鳴ラマンスペクトル、C : 差スペクトル (B - A)

共鳴ラマンスペクトルは5回分の測定結果を足しあわせたもので、そこから差スペクトルを計算した。COV濃度は1.7  $\mu$ Mである。

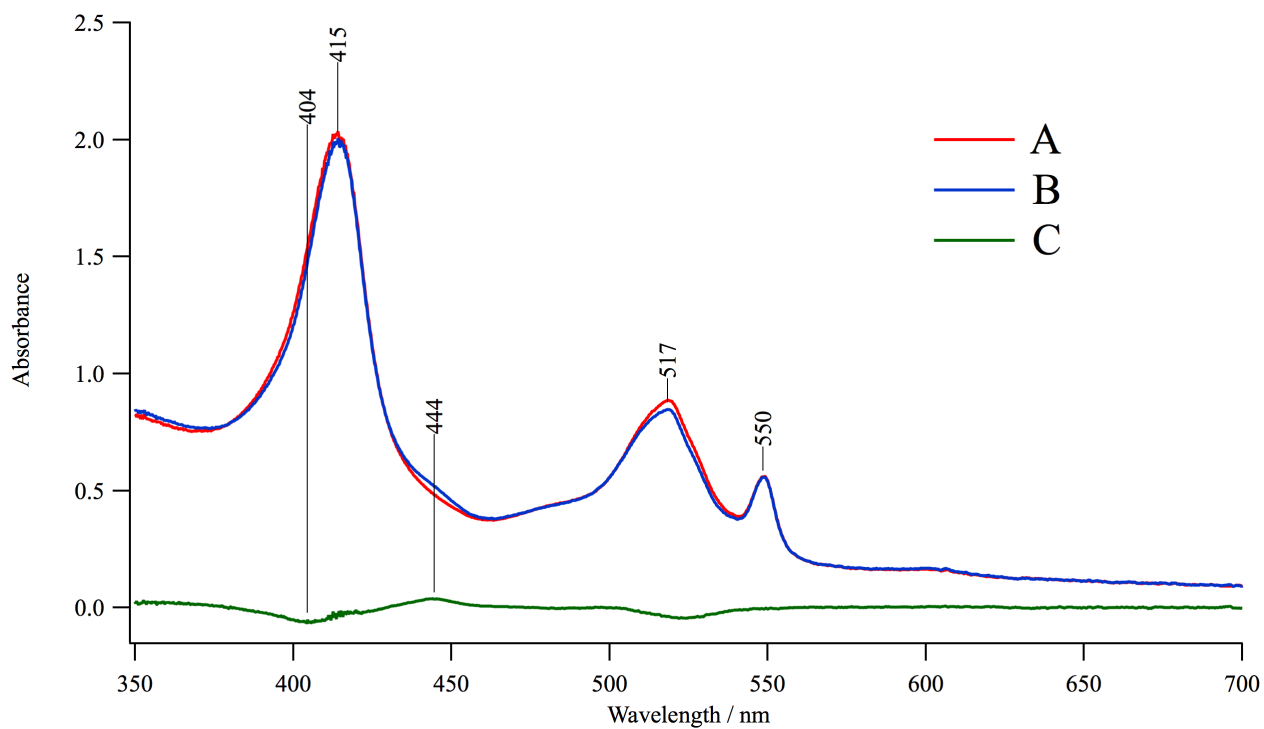


Figure 4-8

Figure 4-6のT<sub>5</sub>および60 minにおける吸収スペクトル

A : T<sub>5</sub>の吸収スペクトル、B : 60 minでの吸収スペクトル、C : B-C

差スペクトルに現れる444 nm (ソーレー帯)の吸光度からAとBの濃度差を計算し、T<sub>5</sub>時点での還元型 hemeの存在比を計算した。



## 第五章 総括

本研究では呼吸鎖電子伝達系で行われる反応制御である呼吸調節の原理を解明する為に研究を行った。特に電子伝達系の末端に存在するCcOの $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ による酸素還元反応速度の制御に着目した。

CcOをリン脂質二重膜小胞に再構成したCOVの調製法を改良する事により、RCRが高く、共鳴ラマンスペクトル測定に適したレーザー照射後でも高いRCRを保持しているCOVの調製に成功した。この方法を応用することで、今まで共鳴ラマンスペクトルのような測定が困難だった他の再構成した膜タンパク質も研究ができるようになるかもしれない。

CcOの呼吸調節の仕組みを解明するために、 $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ を生じた還元型COVについて共鳴ラマンスペクトル測定を行った結果、酸素が無く、十分な電子供給源があるにもかかわらずheme *a*からheme *a*<sub>3</sub>への電子伝達が行われないことが分かった。呼吸調節状態にあるCcOはheme *a*からheme *a*<sub>3</sub>への電子伝達を制御する事で酸素還元反応速度の調整を行っていると考えられる。 $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ による電場がhemeに与える影響はheme *a*、heme *a*<sub>3</sub>共に同じであると考えられる。この事からheme *a*からheme *a*<sub>3</sub>への電子伝達を制御するのはhemeの側鎖もしくはHelix Xへの電場の影響である可能性が高い。特にHelix Xは2つのhemeの間に存在し、His376とHis378を介して繋がっている。完全還元型についてCOVとCcOを比較した結果、heme *a*<sup>2+</sup>の $\delta_{\text{vinyl}}$  (436 cm<sup>-1</sup>)、heme *a*<sub>3</sub>の $\nu_{\text{Fe-His}}$  (214 cm<sup>-1</sup>) が変化していた。 $\delta_{\text{vinyl}}$ の低波数シフトはHelix Xによるheme *a*のビニル基への立体障害の影響が減少しているためである。 $\nu_{\text{Fe-His}}$ の強度の変化は酸素分子との結合の親和性に影響を与えるような変化を意味し、これも呼吸調節に関わっていることも考えられる。これらの変化はHelix Xの周辺で起こっている。更にHelix Xはheme *a*<sub>3</sub>の酸化還元に伴い構造変化を起こし、H-pathway上で水分子のゲートの役割をしている。これらを踏まえると、本研究で見出されたheme *a*からheme *a*<sub>3</sub>への電子伝達の制御もHelix Xが関係している可能性が高い。しかしながら、本研究ではHelix Xやhemeの側鎖が電場の影響で構造変化が起こった事を支持するスペクトルの変化は観測されなかった。この系で芳香族アミノ酸の構造変化を鋭敏に検出できる紫外共鳴ラマンスペクトル測定<sup>[41]</sup>を行うと電子伝達を制御するような構造変化を観測できるかもしれない。紫外共鳴ラマンスペクトル測定は可溶化のCcOですで行われており<sup>[42]</sup>、COVの系でも適応可能であると考えられる。

COVの濃度は2  $\mu\text{M}$ 程度と可溶化のCcOの共鳴ラマンスペクトル測定の際の濃度に比べ10分の1程度とかなり低く、測定には不利である。更に共鳴ラマン分光法を用いればミトコンドリア中のCcOの測定も可能である。それらを踏まえると一見COVの研究に優位性がないようにも思える。しかしながら、COVは膜中のCcOを調べる上で最も単純な系であり、これまでの可溶化CcOの膨大なデータもある事から、様々な複合体(未知のタンパク質も存在する)を含むミトコンドリア中のCcOを調べるよりも遥かに容易である。また、紫外共鳴ラマン測定の場合はミトコンドリア中の他の複合体も共鳴効果を受けるため、その研究は困難を極める。このような背景からCOVを用いた研究はサンプルの濃度の低さや、測定の煩雑さを差し引いても十分な優位性があると考えられる。COVの研究が進み、様々なデータを得ることが出来ると、ミトコンドリア中における膜以外の影響による構造変化、例えば近年提唱されている呼吸鎖超複合<sup>[43-45]</sup>を形成した時のCcOの構造なども明らかになるかもしれない。

## 第六章 参考文献

- [1] Mitchell, P., and Moyle, J. (1969) Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria, *Eur. J. Biochem* 7, 471–484.
- [2] Niemeyer, H., Crane, R. K., Kennedy, E. P., and Lipmann, F. (1951) Observations on respiration and phosphorylation with liver mitochondria of normal, hypo-, and hyperthyroid rats, *Fed. Proc.* 10, 229.
- [3] Rabinovitz, M., Stullberg, M. P., and Boyer, P. D. (1951) The Control of Pyruvate Oxidation in a Cell-free Rat Heart Preparation by Phosphate Acceptors, *Science* 114, 641–642.
- [4] Lardy, H. A., and Wellman, H. (1952) Oxidative phosphorylations: role of inorganic phosphate and acceptor systems in control of metabolic rates, *J. Biol. Chem.* 195, 215–224.
- [5] Ernster, L., and Luft, R. (1964) Mitochondrial respiratory control: biochemical, physiological, and pathological aspects *Adv. Metab. Disord.* 1, 95–123.
- [6] Wikstrom, M. (1981) Energy-dependent reversal of the cytochrome oxidase reaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 4051–4054.
- [7] Wikstrom, M. K. F. (1977) Proton pump coupled to cytochrome *c* oxidase in mitochondria *Nature* 266, 271-273
- [8] Kadenback, B. (1986) Regulation of respiration and ATP synthesis in higher organisms: Hypothesis, *J. Bioenerg. Biomembr.* 18, 39–54.
- [9] Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1996) The Whole Structure of the 13-Subunit Oxidized Cytochrome *c* Oxidase at 2.8 Å *Science* 274, 1136-1144
- [10] Muramoto, K., Ohta, K., Shinzawa-Itoh, K., Kanda, K., Taniguchi, M., Nabekura, H., Yamashita, E., Tsukihara, T., and Yoshikawa, S. (2010) Bovine cytochrome *c* oxidase structures enable O<sub>2</sub> reduction with minimization of reactive oxygens and provide a proton-pumping gate, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 7740–7745.
- [11] Babcock, G. T., and Wikstrom, M. (1992) Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration, *Nature* 356, 301–309.
- [12] Oda, K., Ogura, T., Appelman, E. H. and Yoshikawa, S. (2004) The intrinsic stability of the second intermediate following the dioxygen-bound form in the O<sub>2</sub> reduction by cytochrome *c* oxidase *FEBS Letters* 570, 161-165
- [13] Ferguson-Miller, S., and Babcock, G. T. (1996) Heme/Copper Terminal Oxidases, *Chem. Rev.* 96, 2889–2908.
- [14] Kitagawa, T., and Ogura, T. (1997) Oxygen activation mechanism at the binuclear site of heme–copper oxidase superfamily as revealed by time-resolved resonance Raman spectroscopy, *Prog. Inorg. Chem.* 45, 431–479.
- [15] Han, S., Takahashi, S., and Rousseau, D. L. (2000) Time Dependence of the Catalytic Intermediates in Cytochrome *c* Oxidase, *J. Biol. Chem.* 275, 1910–1919.
- [16] Ogura, T. (2012) Resonance Raman applications in investigations of cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 575–578.
- [17] Takahashi, T., Kuroiwa, S., Ogura, T., and Yoshikawa, S. (2005) Probing the Oxygen Activation Reaction in Intact Whole Mitochondria through Analysis of Molecular Vibrations, *J. Am. Chem. Soc.* 127, 9970–9971.
- [18] Hinkle, P. C., Kim, J. J., and Racker, E. (1972) Ion Transport and Respiratory Control in Vesicles Formed from Cytochrome Oxidase and Phospholipids, *J. Biol. Chem.* 247, 1338–1339.
- [19] Capitanio, N., Capitanio, G., Nitto, E. D., Villani, G., and Papa, S. (1991) H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> stoichiometry of mitochondrial cytochrome complexes reconstituted in liposomes Rate-dependent changes of the stoichiometry in the cytochrome *c* oxidase vesicles, *FEBS Letters* 288, 179-182
- [20] Casey, R. P., Chappell, J. B., and Azzi, A. (1979) Limited-turnover studies on proton translocation in reconstituted cytochrome *c* oxidase-containing vesicles, *Biochem. J.* 182, 149–156.
- [21] Capitanio, N., Capitanio, G., Demarinis, D. A., De Nitto, E., Massari, S., and Papa, S. (1996) Factors Affecting the H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> Stoichiometry in Mitochondrial Cytochrome *c* Oxidase: Influence of the Rate of Electron Flow and Transmembrane ΔpH, *Biochemistry* 35, 10800–10806.
- [22] Sone, N., and Hinkle, P. C. (1982) Proton transport by cytochrome *c* oxidase from the thermophilic bacterium PS3 reconstituted in liposomes, *J. Biol. Chem.* 257, 12600–12604.

- [23] Salomonsson, L., Faxen, K., Adelloth, P., and Brzezinski P. (2005) The timing of proton migration in membrane-reconstituted cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 17624–17629.
- [24] Adar, F., and Erecinska, M. (1978) Resonance Raman spectra of whole mitochondria, *Biochemistry* 17, 5485–5488.
- [25] Paolo, S., Alfredo, C., Maurizio, B. T., Michael, W. T., and Eraldo, A. (1983) Kinetic studies on cytochrome *c* oxidase inserted into liposomal vesicles. Effect of ionophores, *Biochem. J.* 209, 81–89.
- [26] Yoshikawa, S., Choc, M. G., O'Toole, M. C., and Caughey, W. S. (1977) An infrared study of CO binding to heart cytochrome *c* oxidase and hemoglobin A. Implications re O<sub>2</sub> reactions, *J. Biol. Chem.* 252, 5498–5508.
- [27] Baracca, A., Sgarbi, G., Solaini, G., and Lenaz, G. (2003) Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F<sub>0</sub> during ATP synthesis, *Biochim. Biophys. Acta* 1606, 137–146.
- [28] Ching, Y.-C., Argade, P. V., and Rousseau, D. L. (1985) Resonance Raman spectra of CN-bound cytochrome oxidase: spectral isolation of cytochromes a<sup>2+</sup>, a<sub>3</sub><sup>2+</sup> and a<sub>3</sub><sup>2+</sup> (CN-), *Biochemistry* 24, 4938–4946.
- [29] Ishigami, I., Nishigaki, T., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Nakashima, S., and Ogura, T. (2012) An intermediate conformational state during ligand binding to cytochrome *c* oxidase detected by time-resolved resonance Raman analyses of heme peripheral groups, *Chem. Lett.* 41, 178–180.
- [30] Ogura, T., Hon-nami, K., Oshima, T., Yoshikawa, S., and Kitagawa, T. (1983) Iron-histidine stretching Raman lines of the aa<sub>3</sub>-type cytochrome oxidases, *J. Am. Chem. Soc.* 105, 7781–7783.
- [31] Bangcharoenpaupong, O., Schomacker, K. T., and Champion, P. M. (1984) A resonance Raman Investigation of Myoglobin and Hemoglobin, *J. Am. Chem. Soc.* 106, 5688–5698.
- [32] Stavrov, S. S. (1993) The Effect of Iron Displacement Out of the Porphyrin Plane on the Resonance Raman Spectra of Heme Proteins and Iron Porphyrins, *Biophys. J.* 65, 1942–1950.
- [33] Matsukawa, S., Mawatari, K., Yoneyama, Y., and Kitagawa, T. (1985) Correlation between the iron-histidine stretching frequencies and oxygen affinity of hemoglobins. A continuous strain model, *J. Am. Chem. Soc.* 107, 1108–1113.
- [34] Li, X.-Y., Czernuszewicz, R. S., Kincaid, J. R., and Spiro, T. G. (1989) Consistent porphyrin force field. 3. Out-of-plane modes in the resonance Raman spectra of planar and ruffled nickel octaethylporphyrin, *J. Am. Chem. Soc.* 111, 7012–7023.
- [35] Blackwood, M. E., Jr, Rush, T. S., III, Romesberg, F., Schultz, P. G., and Spiro, T. G. (1998) Alternative Modes of Substrate Distortion in Enzyme and Antibody Catalyzed Ferrochelation Reactions, *Biochemistry* 37, 779–782.
- [36] Podstawka, E., Mak, P. J., Kincaid, J. R., and Proniewicz, L. M. (1998) Low frequency resonance Raman spectra of isolated  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of hemoglobin and their deuterated analogues, *Biopolymers* 83, 455–466.
- [37] Ogura, T., Yoshikawa, S., and Kitagawa, T. (1985) Resonance Raman study on photoreduction of cytochrome *c* oxidase: distinction of cytochromes *a* and *a*<sub>3</sub> in the intermediate oxidation states, *Biochemistry* 24, 7746–7752.
- [38] Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1995) Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome *c* oxidase at 2.8Å, *Science* 269, 1069–1074.
- [39] Nakashima, S., Ogura, T., and Kitagawa, T. (2014) Infrared and Raman spectroscopic studies on the reaction mechanism of cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, in press.
- [40] Kubo, M., Nakashima, S., Yamaguchi, S., Ogura, T., Mochizuki, M., Kang, J., Tateno, M., Shinzawa-Itoh, K., and Yoshikawa, S. (2013) Effective Pumping Proton Collection Facilitated by a Copper Site (Cu<sub>B</sub>) of Bovine Heart Cytochrome *c* Oxidase, Revealed by a Newly Developed Time-resolved Infrared System, *J. Biol. Chem.* 288, 30259–30269.
- [41] Asher, S. A., Ludwig, M., and Johnson, C. R. (1986) UV resonance Raman excitation profiles of the aromatic amino acids, *J. Am. Chem. Soc.* 108, 3186 – 3197.
- [42] Aki, M., Ogura, T., Naruta, Y., Le, T. H., Sato, T., and Kitagawa, T. (2002) UV resonance Raman characterization of model compounds of tyr244 of bovine cytochrome *c* oxidase in its neutral, deprotonated anionic, and deprotonated neutral radical forms: effects of covalent binding between tyrosine and histidine, *J. Phys. Chem. A* 106, 3436 – 3444.

- [43] Luisa Genova, M. and Lenaz, G. (2014) Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes, *BBA* 1837, 4, 427 – 443
- [44] Mileykovskaya, E., Dowhan, W. (2014) Cardiolipin-dependent formation of mitochondrial respiratory supercomplexes, *Chemistry and Physics of Lipids* 179, 42–48
- [45] Ikeda, K., Shiba, S., Horie-Inoue, K., Shimokata, K. and Inoue, S. (2013) A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly regulates energy metabolism in muscle, *Nature Communications* 4, 2147

# 第七章 付録

## COVの調製法 (チャート)

ナスフラスコの底に脂質の薄膜 (20 mg PC, 3.2 mg PE, 3.2 mg CL) を形成し1.5時間乾燥する

↓

3 ml buffer (25 mM cholic acid, 100 mM HEPES-Na (pH 7.4) ) を添加して脂質を溶解

↓

0.2 μmのセルロースフィルターに通す

↓

CcO (終濃度 1 μM) 添加し4 °Cで5分間攪拌

↓

300 ml 100mM HEPES-Na (pH 7.4) (4°C、4時間透析)

↓

600 ml 10 mM HEPES-Na (pH 7.4) , 27 mM KCl, 73 mM Sucrose (4°C、4時間透析)

↓

600 ml 1 mM HEPES-Na (pH 7.4) , 30 mM KCl, 80 mM Sucrose (4°C、2時間透析)

↓

600 ml 1 mM HEPES-Na (pH 7.4) , 30 mM KCl, 80 mM Sucrose (4°C、12時間透析)

↓

600 ml 2.5 mM HEPES-Na (pH 7.4) , 250 mM Sucrose, 22.5 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 3 g CALBIOSORB™ Absorbent (4°C、4時間透析)

↓

陰イオン交換クロマトグラフィー

↓

600 ml 2.5 mM HEPES-Na (pH 7.4) , 49 mM KCl, 16 mM Sucrose, 80 mM Choline Chlorideで10分間3回透析

↓

濃縮



## $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ を伴う還元型COVの調製

COV (1.5-2.1  $\mu\text{M}$ )、Rhodamine123 (10  $\mu\text{M}$ ) の混合液を200  $\mu\text{l}$ 測定用セルにとりセプタムでフタをする

↓1 min

アスコルビン酸 (終濃度25 mM) 添加

↓2 min

還元型cyt.c (終濃度30  $\mu\text{M}$ ) 添加

↓1 min

$\text{N}_2$ ガス導入 (<1 L/min)

## Mixed-valence CN結合型COVの調製

COV (1.5-2.1  $\mu\text{M}$ ) 200  $\mu\text{l}$ 測定用セルにとりセプタムでフタをする

↓

脱気、気相を窒素ガス置換

↓

ジチオナイト水 (終濃度1 mM) 添加

↓30 min

KCN (終濃度2 mM) 添加

↓

HCl添加

# 第八章 謝辭

本研究において親切に指導していただき、また数多くのアドバイスにより新しいCOVの調製法の確立に導いてくださった、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の吉川信也特任教授、伊藤恭子准教授、前田友子さんに心より感謝します。

博士課程のカリキュラムの一環として行われた短期留学におきましては、全くの素人で無知な私を指導してくださった生体物質化学II講座の吉田秀郎教授、谷口麻衣助教、学生の皆様に心より感謝します。

研究室に配属当初、右も左も分からなかった私に基本的なラマン測定法の指導、分光に関する理論に関して一つ一つ丁寧に教えてくださり分光学者としての基盤を築いてくださった辻暁准教授、6年にも渡る長い期間本当に未熟だった私を根気強く指導して下さり本研究を導いてくださった小倉尚志教授、柳澤幸子助教に心より感謝します。

また、研究生活において辛い事があっても励まし支えてくれた研究室の先輩や後輩を始め関わった多くの方々に感謝します。

最後に、卒業まで影から支えてくれた両親に感謝します。