

博士論文審査報告書

論文題目：高酸化型ヘムタンパク質の活性部位の振動分光学的研究

申請者：池村賢一郎

1. 論文内容の要旨

ヘム（鉄ポルフィリン）を活性中心に持つヘムタンパク質は、生命活動において重要な役割を果たしている。鉄イオンは通常 2 価または 3 価で存在するが、酵素タンパク質におけるヘム鉄は反応サイクル中に 4 価あるいは 5 価に相当する高酸化状態をとる。高酸化状態のヘムは酵素の機能発現のために必須であり、その構造と反応性を詳しく調べることは、ヘム酵素の反応機構を明らかにするために不可欠である。本論文では、チトクロム *c* 酸化酵素（CcO）と西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）における Fe=O 型高酸化状態ヘムの構造と電子状態をおもに共鳴ラマン分光法を用いて調べた。

CcO は、ミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系にあり、分子状酸素を水にまで還元する反応を触媒する。この電子伝達反応に共役して水素イオンが膜を隔てて能動輸送されるが、ここで生じる電気化学ポテンシャルは ATP 合成の駆動力となる。酸素還元反応における反応中間体のうち P 中間体は鉄 5 価に相当する高酸化状態ヘムを持つ。高酸化状態であるにもかかわらず、非常に安定であることが指摘されていた。P 中間体は 805 cm^{-1} にラマン線を与えるが、これは $^{18}\text{O}_2$ および $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ 同位体の実験結果より $\nu_{\text{Fe=O}}$ （Fe=O 伸縮振動）モードと帰属されていた。同時に P 中間体は 356 cm^{-1} にも酸素同位体敏感ラマン線を与えることが知られており、それは $\delta_{\text{O=Fe-N}}$ （O=Fe-N(His)変角振動）モードと提案されていたが、異論もあった。申請者は、細菌を用いて ^{15}N 標識した CcO を単離・精製した。そして、天然 CcO と ^{15}N 標識 CcO について、P 中間体の共鳴ラマンスペクトルを詳しく解析した。その結果、 356 cm^{-1} のラマン線は ^{15}N 標識 CcO では 3 cm^{-1} だけ低波数シフトすることを見出した。この結果に基づき 356 cm^{-1} のラマン線を $\delta_{\text{O=Fe-N}}$ モードと帰属した。さらに密度汎関数理論による基準振動計算を行い、上記の帰属が妥当であることを示した。また、申請者はラマン活性の選択則に基づき、P 中間体においては O=Fe-N 結合が非直線であり、このことが P 中間体の安定化に寄与すると結論した。本論文では、さらに、P 中間体の安定性について温度および重水の効果を調べ新たな知見を得た。

HRP は過酸化水素を酸化剤として有機化合物を酸化する反応を触媒する。その反応サイクルに現れる Compound II は、 $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ ヘムを持つことが知られている。その $\nu_{\text{Fe=O}}$ モードは pH 11 において 787 cm^{-1} に現れる。申請者は、 $\nu_{\text{Fe=O}}$ モードのラマン線の 300 nm～700 nm における励起プロファイルを決定した。得られた励起プロファイルには、407 nm と 580 nm に極大があった。407 nm の極大は以前に報告されていたものにほぼ一致した。一方、580 nm

の極大は申請者により見出された。2つの極大波長はヘムの吸収極大（421, 530, 552 nm）に一致しない。このことから $\nu_{\text{Fe=O}}$ モードの407 nmと580 nmにおける共鳴増大は、Fe=O部位への電荷移動遷移によるものと結論づけた。以上の性質がHRPだけでなくほかの高酸化状態ヘムにも当てはまるかどうか調べるため、申請者はほかの4種類のFe=O酵素の590 nm励起の共鳴ラマンスペクトルを測定したところ、すべて $\nu_{\text{Fe=O}}$ モードが検出された。590 nm付近の赤色光励起共鳴ラマンスペクトルでは、ヘムの吸収が青色光励起（Soret 帯励起）の場合に比べて小さいため $\nu_{\text{Fe=O}}$ モードの強度がポルフィリンモードの強度に比べて相対的に大きくなる。その結果、青色励起共鳴ラマンスペクトルにおいてポルフィリンモードと重なっていたため、誤って報告されていた $\nu_{\text{Fe=O}}$ モードの振動数を訂正した。このことは赤色励起共鳴ラマン分光法が高酸化状態ヘムの構造研究に有効な方法であることを意味する。

2. 論文審査結果

本論文は、チトクロム c 酸化酵素（CcO）について、従来、帰属の確定していなかったラマン線の帰属を決定した。それをもとに反応中間体の性質に対する理解を深めた。ペルオキシダーゼ（HRP）においては共鳴ラマン分光法を用いる、これまでより優れた構造決定法を提案するとともにFe=O型高酸化状態ヘムの電子状態に関する新しい知見を得た。

本論文では、CcOのP中間体の与える 356 cm^{-1} の酸素同位体敏感ラマン線を $\delta_{\text{O=Fe-N}}$ モードに帰属し、それをもとに、O=Fe-N(His)軸が折れ曲がっていることを明らかにした。P中間体を一電子還元してできるF中間体にはこれに対応するラマン線は観測されない。また、ほかのヘム酵素やモデル化合物にも観測されていない。したがって、P中間体の軸配位構造は特有のものであり、それが高酸化状態の維持に役立つという提案は新しい。HRPのCompound IIにおいて $\nu_{\text{Fe=O}}$ モードのラマン励起プロファイルを調べ、この複合体の新たなエネルギー準位を見出した。このことはCompound IIの反応を解析する上で役立つことが期待される。また、赤色励起共鳴ラマン分光法が、Fe=O型高酸化状態ヘムの構造研究に有効であることを示したが、今後、ヘムタンパク質およびそのモデル化合物の研究において応用されていくものと考えられる。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。

また、平成21年1月22日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

主査： 小倉尚志 ㊞

副査： 島田秀夫 ㊞

： 水谷泰久 ㊞

（大阪大学大学院理学研究科、教授）

： 吉川信也 ㊞