

博士論文審査報告書

論文題目: 時間分解共鳴ラマン分光法によるウシ心筋チトクロム *c* 酸化酵素の構造ダイナミクスの研究

申請者: 石上 泉

1. 論文内容の要旨

ウシ心筋チトクロム *c* 酸化酵素 (CcO) は、ミトコンドリア内膜の呼吸鎖電子伝達系の末端酸化酵素であり、分子状酸素を還元し水を形成するとともに、プロトンをマトリクス側から膜間腔側へポンプする。CcO の機能単位は 13 個の異なるサブユニットからなり、分子量は約 210 kD である。機能単位当たり 4 つの酸化還元中心 (Cu_A 、ヘム *a*、ヘム a_3 、 Cu_B) を持つ。電子は、チトクロム *c* から Cu_A 、ヘム *a* そしてヘム a_3 と Cu_B からなる酸素還元中心へと伝達される。二つのヘムの間には Helix X と呼ばれる α -ヘリックスが配置され、それぞれの軸配位子 (His376、His378) は、このヘリックスを構成する。酸化還元状態や配位子結合状態の異なるいくつかの結晶構造 (完全酸化型、完全還元型、CO 結合型、CN 結合型など) に基づいてプロトンポンプ機構が提案されている。プロトンは、マトリクス側分子表面と膜間腔側のそれとを繋ぐ H-pathway を介してポンプされ、ヘム *a* の酸化還元により駆動される。この経路は、酸素還元部位の配位構造と電子状態に依存した Helix X のコンフォメーション変化によって、マトリクス側とのつながりが遮断される。言わば経路にはゲートが配備され、それが開閉する。ゲートは、プロトンを H-pathway の内部に補充し、その後プロトンの逆流を防ぐ役割をもつ。このように X 線結晶構造解析により H-pathway の構造変化が検出され、その役割が提案されている。しかし、提案されている機構が、速いプロトンポンプ反応を説明する妥当な機構であるか否かを検討するためには構造ダイナミクスの研究が不可欠である。本論文では、時間分解共鳴ラマン分光法を CcO に適用し、ヘムおよびその近傍の構造ダイナミクスを研究し、反応機構に関する新しい提案をした。

2. 論文審査結果

本論文では、一酸化炭素 (CO) 結合型 CcO から、CO を光解離させて始まる還元型への構造ダイナミクスを、時間分解共鳴ラマン分光法により追跡した。CO 結合型は、プロトンポンプゲートが閉じた構造をもち、一方還元型は開いた構造をもつため、ゲート開閉の構造ダイナミクスを検討することが可能である。ゲートを構成するタンパク質部分と相互作用をするヘム周辺部位について以下の知見を得た。

(1) ヘム a_3 の配位子である His とヘム鉄との間の Fe-His 伸縮振動数は、光解離後 10 ns から 100 ns の間は CO 型の値を示し、その後、時定数 0.6 μs で指数関数的に還元型の値に変化した。この結果は、プロトンポンプゲートは時定数 0.6 μs で開くことを示唆する。一

方、閉じる反応は、生理的条件下で O_2 が完全還元型に結合する反応（10 μs で起きると報告されている）内には終わっていると推測される。したがって、ゲートの開閉は（0.6 μs および 10 μs ）酵素が一回転するのに要する時間（3 ms）に比べて充分速い。本研究によって、Helix X がプロトンゲートとして働くというモデルは速度論的に可能であることが明らかになった。

（2）Fe-His 伸縮振動に由来するラマン線の強度は、光解離後 10 ns から減少し始め 100 ns 以降一定値をとり、振動数とは異なる時間変化を示した。これは、Fe-His 結合距離とヘムの位置が、完全還元型と異なる還元型分子種を捕捉できたことを意味する。以上の結果は、ヘム a_3 からの配位子解離過程に中間的コンフォメーションが存在することを示唆する。この中間的コンフォメーションの Fe-His 伸縮振動は、この分子種の配位子親和性が完全還元型より 2 桁以上高いことを示唆する。したがって配位子結合過程では、この分子種を介して配位子が結合するモデルが考えられる。本研究により、ヘム a_3 の過渡的還元型が検出された。反応機構研究を進める新規な知見である。

（3）本ダイナミクス研究により、新たにヘム a 側鎖ビニル基の振動モードが帰属された。その結果、ヘム a_3 およびヘム a の側鎖ビニル基に CO 光解離後 10 ns から 5 ms まで構造変化は見られず、5 ms 以降に構造変化が認められ、両ヘムでのビニル基の構造変化の時間的挙動が一致することがわかった。以上の結果は、ヘリックス X を介した二つのヘムの協同性を強く示唆する。ヘム間の協同性メカニズムを解明するための手段が得られた。

以上のように、本論文は CcO の反応機構の研究を前進させたものである。

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 24 年 1 月 25 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 印

副査： 島田秀夫 印

： 樋口芳樹 印

： 水谷泰久 印

（大阪大学大学院理学研究科、教授）