

博士論文審査報告書

論文題目：共鳴ラマン分光法によるチトクロムc酸化酵素の構造解析

申請者：坂口 美幸

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生成するとともに、プロトンマトリクス側から膜間腔側へポンプする。合計 4 当量の酸化還元部位として 2 つの銅部位 (Cu_A と Cu_B) と 2 つのヘム (ヘム *a*₃ と *a*) を持つが、ヘム *a*₃ は酸素還元部位であり、ヘム *a* はプロトンポンプの駆動部位である。X 線結晶構造解析によって、酸化還元状態そして配位子結合状態が異なる CcO 構造が精密に決定されている。しかし、提案されている構造と機構の検証に、そして構造に基づいた機能の理解には、ピコメートルレベルの構造の違いを検出でき、また高い時間分解能で測定可能な振動分光法による解析が不可欠である。本論文では、共鳴ラマン分光法を用いて、休止酸化型のヘムの配位構造の決定と、アミノ酸の部位特異的変異体を利用したヘム側鎖のラマン線の帰属を行うとともに、2 つのヘム部位でそれぞれ起こる反応の共役機構を理解するために行ったヘム間相互作用研究では新しい知見を得た。

2. 論文審査結果

本論文では、休止酸化型において X 線結晶構造解析により検出された Fe (ヘム *a*₃) と Cu_B の間を架橋する電子密度が O₂²⁻ (パーオキシイド) に由来することを強く示唆する結果を共鳴ラマン分光法により得た。そして、O-O 距離を 1.5 Å と見積もった。これまでに X 結晶構造解析により Fe と Cu_B の間には O₂²⁻ が架橋しているとされ、O-O 距離は 1.7 Å と決定されていたが、これは O₂²⁻ としては長過ぎる原子間距離であるため他の解釈も否定できなかった。構造解析時の X 線照射により、すでに O-O 切断反応が起こっている可能性が考えられ、本論文は SACLA (X 線自由電子レーザー) による無損傷 X 線結晶構造解析計画の引き金となった。

X 線構造解析によって提案されているプロトンポンプ機構を実証するためには、その経路を構成するアミノ酸側鎖およびヘム側鎖官能基のプロトン化状態およびコンフォメーション変化を高い時間分解能で測定する必要がある。その目的には、共鳴ラマン分光法は適しているものの、ラマン線の帰属がされていなかった。本論文では、ヘム周辺構造が酷似した細菌 CcO を用い、ヘム *a* 側鎖と相互作用するアミノ酸残基を部位特異的に変異させ、変異効果によってヘム *a* のヒドロキシフェルネシルエチル基およびプロピオ

ン酸基に由来するラマン線を帰属した。これにより、ウシ心筋 CcO のプロトンポンプ反応の時間分解測定的基础が確立された。

さらに、酸化還元状態が異なる 2 つの配位子結合型構造を、他の酸化還元中心の電子状態を変化させて詳細に測定し、その結果、後者の状態が前者へム a_3 の電子状態を制御することを見いだすとともに、X 線構造に基づいて、その制御機構まで議論ができた。電子移動とプロトンポンプの共役機構の理解を進展させる成果である。

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 25 年 1 月 18 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

：舘野 賢

：石森浩一郎



(北海道大学大学院理学研究院、教授)