

博士論文審査報告書

論文題目：ウシ心筋 NADH—ユビキノン還元酵素のラマン分光解析

申請者：引田理英

1. 論文内容の要旨

NADH—ユビキノン還元酵素はミトコンドリア呼吸鎖の最上流部にあり、FMN、鉄—イオウ中心、ユビキノンを活性中心に含む分子量が 100 万もある巨大で、単離精製が最も困難な膜タンパク質の一つである。このように巨大なフラビタンパク質は強い蛍光を持つため高精度の共鳴ラマン分光解析は容易ではない。しかし、本酵素の反応機構の解明のためには結晶構造解析に加えて活性中心の共鳴ラマン分光解析が不可欠である。そこで、本申請者は酵素調製法や共鳴ラマン分光測定法等を詳細に検討し、酸化型酵素の共鳴ラマンスペクトルの測定に成功した。その精度($\pm 0.4 \text{ cm}^{-1}$)はこれまでに報告されているフラビタンパク質の高精度の結果と比較して全く遜色がない。さらに本酵素を完全還元状態に長時間保持することができる条件を確立し、酸化型と同程度の精度で還元型酵素の共鳴ラマンスペクトルを測定し、FMN と鉄—イオウ中心とのシグナルを区別した。さらに、FMN とタンパク質部分との相互作用を解析するため、水溶液中に遊離している FMN の共鳴ラマンスペクトルを高精度($\pm 0.2 \text{ cm}^{-1}$)で測定することに成功した。(蛍光が強いため、水溶液中のフラビンの共鳴ラマンスペクトル測定はタンパク質に結合したフラビンの測定よりはるかに測定が困難であるが、装置改良の結果、これまでに報告されているフラビン共鳴ラマンスペクトルのどれよりもはるかに高精度のスペクトルが得られた。)

水溶液中の FMN が本酵素の FMN 結合部位に結合することによるラマンバンドの主要な変化は、1) 1631 cm^{-1} バンドの高波数シフトと 1252 cm^{-1} バンドの強度増大、2) 1258 cm^{-1} と 1161 cm^{-1} バンドの低波数シフトであった。これらの結果は以下のような、本酵素の FMN による活性酸素種生成防御機構を強く示唆している。変化 1) はイソアロキサジン環の 2 位の C=O 基(C(2)=O)への水素結合形成を示していること、変化 2) はイソアロキサジン環の 3 位の NH 基(N(3)-H)が分極していることを示唆している。これにより C(2)=O の分極が強まり、その結果 C(2)=O への水素結合がさらに強化される。この水素結合形成により FMN の酸化型が安定化される。その結果空気中の O_2 と反応して活性酸素種を生成する還元型 FMN の代謝回転中の存在時間を短縮することにより活性酸素種生成を抑制していることが示唆される。一方本酵素の X 線構造は C(2)=O への水素結合構造は還元によって変化しないことを示している。したがってその水素結合は共鳴ラマン分光的に酸化型で見られたと同様の強度であることを示唆している。このような還元型 FMN への強い水素結合は O_2 との反応性を低下させることが知られており、この水素結合形成は活性酸素種生成の抑制に寄与していることを示唆している。このような FMN とタンパク質

部分との相互作用により活性酸素生成が抑制されていると考えられる。これらの成果は共鳴ラマン分光解析法が X 線構造解析法に加えて、フラビントタンパク質機能研究に不可欠であることを再認識させる。

また本論文には申請者の米国アルバート・アインシュタイン医科大学の Rousseau 教授グループへの短期留学での研究成果として、ウシ心筋チトクロム酸化酵素の活性中心にあるヘム a のプロピオン酸基に帰属できる共鳴ラマンシグナルの H/D 交換の影響の pH 依存性についても記述されている。この結果は X 線構造解析や変異体解析により、これまでに提唱されているチトクロム酸化酵素のプロトンポンプ経路をプロトンが通過することができることを実証する最初の例として重要である。

2. 論文審査結果

フラビンの共鳴ラマンスペクトル解析はそのタンパク質との相互作用解析に不可欠な方法ではあるが、一般にスペクトル変化は微小であるため、高精度の測定が必要である。また上述のように本酵素の巨大なタンパク質部分からの強い蛍光が測定精度を低下させる強い要因となる。したがって本酵素の FMN の高精度の共鳴ラマン測定は不可能であるとされていた。にもかかわらず、本申請者は高精度共鳴ラマン分光解析の重要性を深く認識し、酵素精製法からラマン分光測定法に至る各段階の問題点を逐一着実に解決し、このように高精度の測定に成功した。本論文にはその経緯が詳細にかつ明確に記述されている。なお、並行して推進された生体物質構造学 II 分野による息の長い装置改良の成果もこの成果達成に大きく寄与している。このようにして得られた実験結果は本酵素の活性酸素種生成の抑制機構の理解を大きく深めるものである。また、学術雑誌(Biochemistry)に発表されている本論文の成果は、今後の本酵素の機能解析研究報告に、最も重要な基礎知見として常に引用されると推定される。また、短期留学の成果は 3 ヶ月で得られた成果としては極めて充実しており、この成果とともに申請者のラマン分光実験能力はこの分野の第一人者である Rousseau 教授からも高く評価されている。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。

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：城 宜嗣

副査：島田秀夫

：小倉尚志

：石森浩一郎

(北海道大学大学院理学研究院 教授)

：吉川信也

(兵庫県立大学生命理学研究科 特任教授)