

博士論文審査報告書

論文題目：高分解能 X 線結晶構造解析によるウシ心筋チトクロム酸化酵素のプロトンポンプ機構に関する研究

申請者：矢野直峰

1. 論文内容の要旨

チトクロム酸化酵素はミトコンドリア呼吸の末端酸化酵素で、プロトンポンプに共役して分子状酸素(O_2)を水にまで還元する。 O_2 は鉄イオン (ヘム a_3 , Fe_{a3}) と銅イオン(Cu_B)を含む O_2 還元中心で還元され、そのための電子はチトクロム c から第 2 の銅イオン(Cu_A)と鉄イオン (ヘム a , Fe_a) から伝達される。この電子伝達に共役してプロトンが、プロトン輸送経路(H-pathway)によりポンプされる。この O_2 還元に関与したプロトンポンプ機構の解明のためには高分解能 X 線結晶構造が不可欠である。これまで酸化型/還元型で 1.8Å/1.9Å 分解能の X 線結晶構造が決定され、本酵素の反応機構の理解を深めることに大きく貢献してきたが、原子レベルでのプロトンポンプ機構解明にはより高分解能の構造が必要であった。本論文では、X 線回折実験のために必要な結晶凍結の際の氷晶防止処理法と高分解能解析のための膨大なデータ処理法を改良し、酸化型/還元型 X 線結晶構造の分解能を 1.5Å/1.6Å まで向上させることに成功した経緯について詳細に記述されている。さらに、この分解能の向上によって得られた新たな構造情報とそれに基づくプロトンポンプ機構に関しても詳細に考察されている。

分解能向上の結果、電子密度の精度が大幅に向上し、ヘムのピロール環や芳香族アミノ酸側鎖に環状の電子密度が認められ、多数のマルチコンフォーメーションとタンパク質中に固定された水分子が発見された。また、酸化型酵素の O_2 還元中心に架橋している配位子の電子密度も著しく明瞭になった。従来から、この配位子として、 Fe_{a3} と Cu_B とに、それぞれ 0.5 当量ずつの塩素イオンが配位している可能性が指摘されていたが、本研究において異常分散効果の精密測定を行った結果、塩素イオンの可能性を否定し、過酸化物 (O_2^{2-}) 架橋構造と決定することができた。さらに、この分解能向上に伴い、これまで機能が全く未知であった Mg^{2+} 部位周辺に、酸化還元に伴う新たな構造変化が検出された。 Mg^{2+} には Glu198 のカルボキシル基が配位しており、その主鎖の $C=O$ はチトクロム c からの直接の電子受容体である Cu_A に配位している。この Mg^{2+} と Glu198 のカルボキシル基との結合角[C-O... Mg^{2+}]が酸化型では 135° 、還元型では 168° と明瞭に変化した。この結合角の変化は、還元によって Glu198 カルボキシル基が COO^- から $COOH$ へプロトン化されることを強く示唆している。この Mg^{2+} 部位は 20 個の水分子で構成されている水クラスターの中心に位置している。本研究では、この水クラスター中の水の位置は酸化還元によって変化するが総数は変化せず、この水クラスターは分子表面からも酸素還元中心

からも完全に隔離されている（プロトン交換も不可能である）ことも見出した。しかし、 Mg^{2+} 部位は、H-pathway に水素結合しているヘム a のプロピオン酸基に水素結合のネットワークで連結されていた。また、 Cu_A から Fe_a への電子伝達経路の構造も酸化還元に伴って変化した。これらの結果は、 Mg^{2+} 部位周辺の水クラスターはプロトンポンプの際プロトンを一時保管する部位として機能し、 Cu_A と Fe_a 間の電子伝達経路の酸化還元に伴う Mg^{2+} 部位の構造変化により、逆流を防ぎながらプロトンを H-pathway へ供与し、プロトンポンプ駆動に寄与していることを強く示唆している。

また本論文には名古屋大学大学院生命科学研究科本間研究グループへの短期留学での「海洋性ビブリオ由来チトクロム酸化酵素のサブファミリー同定」に関する研究成果も記載されている。

2. 論文審査結果

哺乳動物チトクロム酸化酵素のプロトンポンプ機構の解明は生体エネルギー論分野で最も重要な研究領域の一つである。従来の研究から、水チャネルと水素結合ネットワークで構成されている H-pathway を経由するプロトンポンプ機構が提唱されている。この機構において、プロトンポンプの駆動力は、水チャネルを経由してミトコンドリア内膜内側から水素結合ネットワークに運ばれてきたプロトンと Fe_a の正電荷との間の静電的反撥であるとされている。また、1 代謝回転に必要な 4 当量のポンプ用プロトンが水素結合ネットワークに取り込まれてから H-pathway 下方の水チャネルが閉鎖されることにより、プロトンの逆流が防がれていると主張されている。しかし、H-pathway 機構の最大の問題点は、この水素結合ネットワークに 4 当量のプロトンの受容（保管）能力があるかどうかであった。本論文に記載されている成果は、哺乳動物チトクロム酸化酵素の Mg^{2+} 部位周辺の水クラスターが H-pathway にプロトン保管能力を付与することと、そこから H-pathway へのプロトン供与の機構を明らかにするもので、本酵素のプロトンポンプ機構解明の一里塚と見なすことができる。なお、短期留学により遺伝子の単離と発現技術を体験したことは本申請者の視野を広げるのに大きく貢献したと考えられる。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。

また、平成 25 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：城 宜嗣

副査：島田秀夫

：水島恒裕

：栗栖源嗣

（大阪大学蛋白質研究所 教授）

：吉川信也

（兵庫県立大学生命科学研究科 特任教授）