

学位論文題名

Structure-Function Relationship of Cytochrome *c*
in the Respiratory Chain(呼吸鎖におけるシトクロム *c* の構造機能相関の解明)

学位論文内容の要旨

生体エネルギーとして用いられる ATP の合成には、呼吸鎖とよばれる一連の膜タンパク質間の電子伝達が必須である。この電子伝達を担うタンパク質としてシトクロム *c* (Cyt *c*) が知られており、Cyt *c* は呼吸鎖においてシトクロム *bc*₁ 複合体(Cyt *bc*₁)とシトクロム *c* 酸化酵素(CcO)間の電子伝達を担っている。Cyt *bc*₁ から電子を受け取った Cyt *c* は、CcO と結合することにより電子を伝達し、伝達された電子は CcO においてプロトンおよび酸素分子と反応することによって水分子へと変換される。この酸素還元反応には 4 電子が必要であるが、Cyt *c* は 1 度に 1 電子しか CcO に伝達することができない。そのため、Cyt *c* と CcO はその電子伝達部位の酸化還元状態を変化させ、会合・解離を繰り返しながら電子の授受を繰り返していると考えられる。このように、Cyt *c*-CcO 間の電子伝達反応には、酸化還元状態に応じた会合・解離を制御する機構が存在すると想定されるが、その知見は十分に得られてはいない。そこで申請者は本論文において、分光学的・熱力学的手法などを用い、このような酸化還元状態に応じた Cyt *c* と CcO 間の電子伝達の分子機構を、Cyt *c*-CcO 複合体の構造に着目してアミノ酸残基レベルで解明することを試みた。

本論文は四章から構成されており、第一章では、複合体形成反応を熱力学的に検討することが可能な等温滴定カロリーメトリーを用い、Cyt *c* と CcO の複合体の安定性およびその複合体の量論比を求めた。その結果、Cyt *c* と CcO の複合体形成反応は、1:1 の量論比で K_D が $17.2 \pm 1.1 \mu\text{M}$ (25°C) で結合する吸熱反応であり、エントロピー駆動型の反応であることが明らかとなった。このエントロピー変化を、回転・並進、脱水和、そして構造変化によるエントロピー変化に分割して解析を行ったところ、脱水和と構造変化に由来するエントロピー変化が全体のエントロピー変化に大きく寄与していることが示された。つまり、Cyt *c*-CcO 複合体の形成時において、熱力学的に不利なエンタルピー変化は、脱水和と構造変化によって増大するエントロピー変化によって補償していることが明らかとなった。過去の研究より、複合体形成時における脱水和は、主に疎水性残基による疎水性相互作用の結果であることが指摘されている。このことより、Cyt *c* と CcO は疎水性相互作用が駆動力となって電子伝達複合体を形成し、それに伴って、水分子の脱水和と複合体形成時の構造変化によってエントロピーを獲得し、結合時のエンタルピーの損失を補うと考えられる。

第二章では、酸化還元状態に応じた Cyt *c*-CcO 複合体の会合・解離の分子機構を明らかにするため、アミノ酸残基レベルで結合部位を検討することが可能な ¹H-¹⁵N HSQC 法を用いて、Cyt *c* の CcO 結合部位の同定を試みた。結合型である還元体 Cyt *c* の CcO 結合部位の同定を行った結果、Cyt *c* のヘムのチオエーテル基周辺のアミノ酸に由来するピークの幅広化、あるいはそのピーク位置に変化が観測された。同定されたアミノ酸残基には、第一章から予想されたように Ile などの非極性残基が含まれていることから、これらの疎水性残基

による疎水性相互作用が Cyt *c* と CcO 複合体の形成の駆動力としての役割を果たしていることが示された。さらに、この領域には Lys や Glu などの極性残基が多く含まれており、第一章で述べた疎水性相互作用だけでなく、静電相互作用も Cyt *c*-CcO 複合体形成に重要であることが示された。

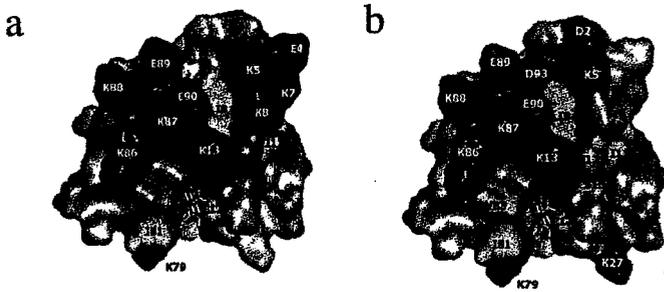


Figure 1. Amino acid residues affected by the binding to CcO in (a) ferrous and (b) ferric Cyt *c*. Positively charged, negatively charged, and non-polar residues are shown in blue, red, and yellow, respectively.

次に、Cyt *c* が CcO から解離する状況を想定した酸化型 Cyt *c* の CcO 結合部位の同定を行った結果、結合部位は還元型と酸化型で大きく変化はしないものの、酸化型の CcO 結合部位では、N 末端の極性残基の相互作用が減少した一方で、ヘム近傍の非極性残基の相互作用が増加したことが明らかとなった (Figure 1)。この酸化還元依存的な Cyt *c* の CcO 結合部位の変化は、構造変化によってタンパク質間の電子伝達反応が制御されていること、そして静電相互作用が減少することによるタンパク質複合体間の親和力の変化が起こり、解離することを示唆している。

第一章と第二章において、Cyt *c*-CcO 複合体の会合・解離機構を熱力学的手法や分光学的手法を用いて明らかにしてきた。しかしながら、タンパク質複合体の会合・解離にはタンパク質構造の「静的」な構造だけでなく、「揺らぎ」も重要な役割を果たしていることが指摘されている。そこで第三章では、二次元 NMR データの緩和解析およびモデルフリー解析を用い、電子伝達複合体の構造上の揺らぎを検討することにより、タンパク質構造の揺らぎが Cyt *c* から CcO への電子伝達反応に寄与しているかを明らかにすることを試みた。その結果、Cyt *c* と CcO が電子伝達複合体を形成することにより、Cyt *c* は CcO 結合部位だけでなく分子全体に揺らぎが制限されることが明らかとなった。この結果は、Cyt *c* の揺らぎが制限された状態で CcO への電子移動が起こることを示唆している。このような電子伝達反応時に揺らぎが制限されるという生物学的意義はまだ明らかとなっていないが、この運動性の制限が部位特異的かつ効率的な電子伝達を行う上で、重要な役割の一端を担っているものと想定される。

第四章では、第二章で同定された結合部位に存在する個々の極性残基 (Lys) と非極性残基 (Ile) の役割について検討するため、Lys と Ile 変異体を用いて Cyt *c* から CcO への電子伝達反応の活性測定を行った後、ミカエリス・メンテン型の解析をし、電子伝達複合体の解離定数に相当するミカエリス定数 K_M および代謝回転数 k_{cat} を求めた。Lys を Leu に変えた変異体の K13L と K86/87L では K_M が、K7/8L と K79L では k_{cat} が大きく変化していた。この結果は、Lys13, 86, 87 が電子伝達複合体の親和性に寄与していること、そして Lys7, 8, 79 は電子伝達速度の制御あるいは電子伝達複合体の解離に寄与していることを示唆している。一方、Ile を Ala に変えた変異体では、 K_M および k_{cat} ともに変化はほとんどなかった。この結果より、Cyt *c*-CcO 複合体の形成の駆動力となる疎水性相互作用は特異性が低く、アミノ酸側鎖の大きさの違いは電子伝達反応に大きく影響しないことが示された。

以上、本研究により、呼吸鎖における Cyt *c*-CcO 複合体の形成は、疎水性相互作用が主な駆動力であり、さらに、静電相互作用も複合体の親和力や解離に重要な役割を果たすことが明らかとなった。また、この複合体形成によって Cyt *c* の構造上の揺らぎが制限され、その結果、部位特異的な電子伝達が起こると考えられる。酸化還元中心とその周りのアミノ

酸配置が Cyt *c* や CcO と他の電子伝達タンパク質において類似していることから, 本研究で得られた知見が電子伝達機構の一般則の解明に繋がるものと期待される.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 石 森 浩 一 郎
副 査 教 授 坂 口 和 靖
副 査 教 授 武 田 定
副 査 教 授 河 野 敬 一

学 位 論 文 題 名

Structure-Function Relationship of Cytochrome *c* in the Respiratory Chain

(呼吸鎖におけるシトクロム *c* の構造機能相関の解明)

本論文は生体内でのエネルギー生産機構として重要な呼吸鎖における電子伝達機構、特にその電子伝達系の末端に位置し、これまで多くの研究者がその機構解明を試みてきたシトクロム *c* (Cyt *c*) からシトクロム *c* 酸化酵素 (CcO) への電子伝達反応の構造機能相関を明らかにしようとしたものである。第一章では、Cyt *c* と CcO 間の電子伝達複合体形成を熱力学的に検討し、この反応が吸熱反応で、エントロピー駆動型であることを明らかにしている。さらに、著者は熱力学的パラメータの解析から、この電子伝達複合体形成では、疎水性相互作用が駆動力となることを決定し、それに伴う脱水和と構造変化によるエントロピー増加により、相互作用形成に伴うエンタルピーの損失を補うという新たな機構を示唆した。

第二章では、さらに詳細に電子伝達複合体形成の機構を明らかにするため、¹H-¹⁵N HSQC 法を用いて、Cyt *c* の CcO 結合部位の同定を試みた。第一章から予想されたように相互作用部位には Ile などの非極性残基が含まれ、疎水性相互作用が Cyt *c* と CcO 複合体の形成の駆動力としての役割を果たしていることが確認された。また、相互作用部位には極性残基も多く存在し、静電相互作用もこの複合体形成に重要であることが示された。このように電子伝達複合体形成における相互作用を詳細に明らかにした点は学術的に非常に興味深く、電子伝達反応の分子論的解明に対して大きく資すると考えられる。さらに、酸化型と還元型の Cyt *c* の CcO 相互作用部位の比較から、Cyt *c* の酸化状態に依存した相互作用部位の変化が明

らかとなり、この結果は、構造変化による蛋白質間の電子伝達反応の制御という新たな電子伝達制御機構を意味し、学術的に非常に興味深い。

著者はさらに以上のような「静的」な構造だけでなく、蛋白質複合体の会合・解離において、重要な役割を果たしていることが指摘されている蛋白質構造の「動的構造」すなわち「構造的揺らぎ」にも注目し、第三章では、二次元 NMR の緩和解析を通して、Cyt *c* は CcO と電子伝達複合体を形成する際にはその相互作用部位だけでなく、分子全体に揺らぎが制限されることを明らかにしている。この結果は、電子伝達反応における蛋白質の構造的揺らぎの寄与を示す興味深い知見である。

次いで第四章では、第二章で同定された結合部位に存在する個々の極性残基(Lys)と非極性残基(Ile)の役割について検討するため、その変異体を用いて Cyt *c* から CcO への電子伝達反応の活性測定を行なうことで、相互作用部位に位置する個々のアミノ酸残基の機能的役割を明確にすることを試み、電子伝達速度と電子伝達複合体形成のそれぞれに寄与するアミノ酸残基の同定に成功している。ここで得られた知見は、電子伝達機構における構造機能相関を考える上で重要な情報となる。

以上、本論文により、呼吸鎖における Cyt *c*-CcO 複合体の形成は、疎水性相互作用が主な駆動力であり、さらに、静電相互作用も複合体の親和力や解離に重要な役割を果たすことが明らかとなった。また、これらの相互作用は Cyt *c* の酸化状態に依存し、さらに CcO との相互作用によりその構造上の揺らぎも変化することで、部位特異的な電子伝達が起こると考えられる。これらの成果は Cyt *c* と CcO との電子伝達反応のみならず、生体内の多くの電子伝達反応の解析においても有用な情報となり、本論文で得られた知見は生体内電子伝達機構の一般則の解明に繋がるものと期待される。これを要するに、著者は、呼吸鎖における電子伝達反応の分子機構について新知見を得たものであり、酸素呼吸生物の生命維持にとって必須な呼吸鎖における電子伝達反応に対して、その分子論的解明を進めるにあたり貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格あるものと認める。