

この論文は、ウシ心筋チトクロム *c* 酸化酵素による酸素還元反応における P 反応中間体の安定性および活性部位の配位構造について詳しく調べた結果をまとめたものである。

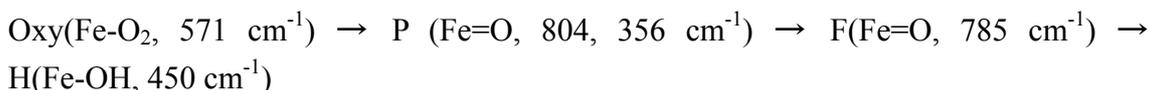
ミトコンドリア内膜の呼吸鎖電子伝達系の末端にあるチトクロム *c* 酸化酵素(以下、CcO と略す)は、機能単位当り分子量 210 kD で、ウシ心筋由来のものでは 13 本の異なるサブユニットからなる。X線結晶構造解析により、原子レベルの立体構造が報告されている。酸化還元部位として 2 つの銅部位(Cu<sub>A</sub> と Cu<sub>B</sub>)および 2 つのヘム(ヘム *a* とヘム *a*<sub>3</sub>)を持つ。これら 4 つの金属部位がすべて還元された完全還元型 CcO は 4 個の電子を持つが、これは酸素分子を還元して 2 分子の水を生成するのに必要な個数である。Cu<sub>A</sub> は、チトクロム *c* から電子を受け取り、これをヘム *a* に渡す。ヘム *a* は 2 つのヒスチジン残基に配位された 6 配位のヘムであり、受け取った電子をヘム *a*<sub>3</sub> と Cu<sub>B</sub> からなる酸素還元部位に渡す。ヘム *a*<sub>3</sub> は 1 つのヒスチジンに配位された 5 配位のヘムであり、第 6 配位座に分子状酸素が結合し水にまで還元される。Cu<sub>B</sub> はヘム *a*<sub>3</sub> の働きを助けると考えられる。なお、ヘム *a* と *a*<sub>3</sub> はタンパクから取り出すと同じヘム A であり、2 位にヒドロキシフェルネシルエチル基、8 位にフォルミル基を持つ点がヘム B (プロトヘム)と異なる。フォルミル基の存在によりヘム A は緑色を呈する特徴がある。ヘム *a* とヘム *a*<sub>3</sub> は、配位環境が異なるため別の機能を果たす。本研究はヘム *a*<sub>3</sub> に注目した。CcO は、前述のように分子状酸素を水にまで還元する反応(O<sub>2</sub> + 4H<sup>+</sup> + 4e<sup>-</sup> → 2H<sub>2</sub>O)を触媒するのと同時に水素イオンをマトリクスから膜間空間へ能動輸送するプロトンポンプとして働く。これまでに、4 個の電子を持った完全還元型酵素と O<sub>2</sub> との反応が共鳴ラマン分光法によって詳しく調べられ、571、804、356、785、450 cm<sup>-1</sup> に酸素同位体敏感ラマン線が検出されている。このうち 571 cm<sup>-1</sup> は酸素化型反応中間体(Oxy)の Fe-O<sub>2</sub> 伸縮振動、785 cm<sup>-1</sup> はフェリル型反応中間体(F)の Fe=O 伸縮振動、450 cm<sup>-1</sup> は水酸化型反応中間体(H)の Fe-OH 伸縮振動に帰属されていたが、804 cm<sup>-1</sup> と 356 cm<sup>-1</sup> の帰属に関して国際的論争があり、これを解決することが、CcO による酸素還元の反応機構を明らかにするために重要であった。この論文の主題である P 反応中間体は、最初の Oxy 中間体と F 中間体の間に位置するとされる高酸化状態である。なお、F は Fe=O ヘムを持つことが知られており、以下に述べるように P も Fe=O ヘムを持つことが明らかになったが、P の方が一当量だけ高酸化状態にある。その酸化当量の所在はなお不明であるが、P が F に還元される過程がプロトン移動と連動することが知られている。本研究は、P 反応中間体の安定性と配位構造について

詳しく調べ、以下に記す新しい知見を得た。

1) 2 電子分だけ還元された Mixed-Valence 型 CcO を  $O_2$  と反応させてできる P 中間体が、22 °C で pH 8.0 において、440 分後にも安定であることを示した。このことから、CcO が  $O_2$  と反応してできる高酸化状態である P 反応中間体は電子の漏れに対して嚴重に遮蔽されており、それはプロトンポンプのためのエネルギーを散逸させないために重要であることを指摘した。

2) この安定な P 中間体の配位構造を共鳴ラマン分光法で詳しく調べた。P 中間体由来の  $804\text{ cm}^{-1}$  のラマン線を Fe=O 伸縮振動に、 $356\text{ cm}^{-1}$  のラマン線を His-Fe=O 変角振動に帰属した。それをもとに P 中間体の配位構造が、His-Fe=O $\cdots$ HO-Cu<sub>B</sub> であることを示した。これにより、これまで吸収スペクトルの特徴から“607 nm 型”とも呼ばれていた P 中間体の実体ははっきりした。次に CcO と  $O_2$  との反応開始後 100  $\mu\text{s}$  ~ 2 ms における共鳴ラマンスペクトルを測定し、 $804\text{ cm}^{-1}$  と  $356\text{ cm}^{-1}$  のラマン線強度が同じ時間依存性を示し、これが Oxy 中間体の減衰に同期して成長することを見出した。すなわち、反応が Oxy( $571\text{ cm}^{-1}$ ) $\rightarrow$ P( $804, 356\text{ cm}^{-1}$ )と進むことを実証した。さらに、この過程が pH 8.0 では pH 6.8 に比べ約 1/5 に遅くなることを見出し、その理由はこの過程が  $H^+$  を必要とする O-O 結合切断過程であるためと指摘した。なお、これまで時間分解吸収スペクトルではこの pH 依存性は見出されておらず、それは Oxy と P の吸収帯が重なっているためと考えられるが、共鳴ラマン法では別々のラマン線を追跡したため観測されたと考えられ、この分光法の有用性を指摘した。

3) 1)、2)の結果と完全還元型 CcO +  $O_2$  の反応のこれまでの結果から、生理的条件下で CcO と  $O_2$  との反応は、



のように進行することがはっきりした。

以上のように本論文は生体エネルギー変換の分子機構の理解を一步前進させるものである。したがって本審査委員会は博士(学術)の学位を授与するにふさわしいものと認定する。