

氏名	野村 高志 (ノムラ タカシ)	
学位の種類	博士 (理学)	
学位記授与報告番号	乙第 4 8 号	
学位記授与年月日	平成 2 6 年 1 2 月 2 6 日	
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当 (論文博士)	
論文題目	リン脂質二重膜小胞に再構成したチトクロムc酸化酵素の共鳴ラマン分光法による研究	
論文審査委員	(主査) 教授	小倉 尚志
	(副査) 教授	吉田 秀郎
	(副査) 教授	宮澤 淳夫
	(副査) 特任教授	吉川 信也
		(兵庫県立大学大学院生命理学研究科)
	(副査) 客員教授	島田 秀夫
		(兵庫県立大学大学院生命理学研究科)
	(副査) 教授	廣田 俊
		(奈良先端科学技術大学院大学)

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、プロトン膜の内側から外側へポンプすることにより酸化リン酸化に寄与する。酸化還元部位として2つのヘム (ヘム a_3 と a) を含むが、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 構造が分解能 1.8 Å で決定されている。膜中の CcO には呼吸調節と呼ばれる現象が見られる。これはプロトン濃度勾配と膜電位に基づくプロトン駆動力 ($\Delta \mu_{\text{H}^+}$) 存在下において電子伝達速度が低下する現象であり、生理的に合目的な調節であると考えられている。しかし、そのしくみを解明するには膜中 CcO について $\Delta \mu_{\text{H}^+}$ 存在下において構造解析を行う必要があるが、そのような測定系が存在しなかったので手掛かりはなかった。本研究では、共鳴ラマン分光法により膜中の CcO の活性部位の振動スペクトルを $\Delta \mu_{\text{H}^+}$ の存在する条件で選択的に測定する系を開発し、新しい知見を得た。

2. 論文審査結果

CcO をリン脂質二重膜小胞に再構成した COV の界面活性剤透析法による調製法は確立されていた。しかし、共鳴ラマンスペクトル測定のためのレーザー光照射によって膜のイオン透過性が増大し高いプロトン駆動力を保てないことが判明した。本論文では、この課題を解決する方法を見いだした。膜の透過性の

増大が、調製時に添加する界面活性剤の不十分な除去に起因することに気づき、界面活性剤吸着剤の使用と透析時間の延長によって解決した。

次に膜電位をもつミトコンドリアの検出に用いられる色素ローダミン 123 が中性付近において COV 膜外の酸性化の指示薬として使用できることを可視吸収分光法によって確かめた。そして、ローダミン 123 と COV を含む試料溶液の吸収スペクトルと共鳴ラマンスペクトルを同時に測定しながら、必要に応じて還元剤等を添加したり、気相の気体を交換したりすることが可能な新規光学セルを開発した。以上の試料とセルを用いて COV 中の CcO の構造解析を行った。その結果、COV では CcO と比べてヘム *a* においては側鎖ビニル基の、また、ヘム *a*₃ においては Fe-ヒスチジン結合のコンフォメーション変化が検出された。これらの構造変化の解釈については今後の研究が必要とされるが、膜中の CcO の振動スペクトルを可溶性 CcO と同じレベルで測定できる系の作成に成功したことは高く評価できる。次に $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ の生成をローダミン 123 によりモニターしながら共鳴ラマンスペクトルを測定した。その結果、嫌気条件下において $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ 存在下ではヘム *a* が還元型、ヘム *a*₃ が酸化型の混合原子価状態になることを見いだした。この知見は呼吸調節現象のしくみを分子構造に基づいて解明するための第一歩である。

以上のように、本論文は膜タンパク質超分子系の構造化学的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 26 年 10 月 23 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。