

博士論文審査報告書

氏名	Luo Fangjia (ルオ ファンジア)
学位の種類	博士 (理学)
学位記番号	博理第102号
学位授与報告番号	甲第315号
学位授与年月日	平成29年9月25日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当
論文題目	Structure-and-function of bovine cytochrome <i>c</i> oxidase -Structures at neutral pH and development of processing method of XFEL diffraction images- 「ウシのチトクロム <i>c</i> 酸化酵素の構造と機能 -中性pHでの 構造とX線自由電子レーザーによる回折イメージの処理プロ グラム開発-
論文審査委員	(主査) 教授 水島 恒裕 (副査) 教授 八田 公平 (副査) 特任教授 吉川 信也 (副査) 特任教授 月原 富武 (副査) 特任教授 田之倉 優 (東京大学大学院農学生命科学研究科) (副査) 教授 Min Yao (姚 閔) (北海道大学大学院先端生命科学院)

1. 論文内容の要旨

チトクロム *c* 酸化酵素 (CcO) は酸素を還元することによって生じるエネルギーを利用してプロトンを能動輸送する。高等生物では CcO はミトコンドリア内膜を貫通して存在しており、その N 側 (内側) の pH は P 側 (外側) より高い。また CcO は酸素 1 分子を水に還元する際に 4 プロトン を N 側から CcO 内部の膜貫通領域にある活性中心に取り込む。さらにそれに同期して 4 プロトン を特定の経路で N 側から P 側に輸送する。このことは CcO が常時の均一な pH 環境のもとに存在していないことを示している。

これまでウシ CcO の結晶構造解析が数多く行われて、その反応機構の解明が進展した。しかし、それらはいずれも pH5.7 の状態での結晶で得られたものであり、中性領域や塩基性領域での構造が酸性領域での構造とどのような関係にあるかは極めて興味深い。フッ素化された界面活性剤を共存させることによって pH7.3 で結晶化を行うことができ、その結晶構造解析を酸化型 1.77 Å 分解能、還元型 1.99 Å 分解能で行った。

その結果、酸化型、還元型共に pH5.7 での構造と実験誤差の範囲内で一致していた。また pH7.3 の酸化型と還元型は pH5.7 での両者と同様に極めて高い同型性を示したので、Fo (酸化型) - Fo (還元型) 電子密度図で酸化還元による詳細な構造変化を調べた。その結果、酸化還元によるプロトンポンプ機構に関わる構造変化は中性 pH においても、正確に再現されていることが明らかになった。CcO は反応サイクル中でドメインの動きのような大き

な構造変化は起こさないが、微細な構造変化によって酸素還元・プロトン能動輸送を行う。その際の精巧な構造変化は広い pH 領域で保存されていることが明らかになった。

そのほか、この度の結晶構造解析によって初めて、凍結防止剤に使用したエチレングリコールをプロトン輸送経路と主張している D, K, H パス中に同定することができた。これはこれらのパスにヒドロニウムイオンが容易に出入りすることができることを示している。また、酸素還元中心に過酸化物だけでなく、放射線損傷の影響と思われる H_2O あるいは OH が約 15% の占有率で存在することを明らかにした。

Cc0 の構造・機能の研究では精密な構造解析が極めて有効であった。一方、機能する構造をそのまま観測できれば、そのメカニズムの理解が大きく進展することは疑う余地がない。XFEL は 10 フェムト秒の強力なパルス X 線であり分子が壊れる前に回折像を得ることができる。Cc0 の反応過程を逐次観測するために XFEL 回折像を処理するプログラムの開発を目指した。反応過程では微細な構造変化が起こるだけなので、SPRING-8 での静的な構造と同型性は高い。そこで、SPRING-8 の回折データを参照データにするデータ処理法を開発し、良質のデータを得ることができた。

2. 論文審査結果

本論文では、Cc0 が機能するときの構造変化が酸性 pH から中性 pH 領域まで高い精度で保存されていることを明らかにした。このことは多様な pH 環境で働く本酵素の精巧な働き仕組みを理解する上で重要な成果である。また、申請者は回折原理をよく理解して、SPRING-8 での静的回折データを参照する XFEL 回折データ処理プログラムを開発した。このプログラムは、Cc0 結晶による高精度の XFEL 回折データを効率良く収集するために最適化されたものであり、今後 Cc0 研究に大きく貢献すると期待できる。

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、2017年7月14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。