

氏 名 高 橋 聡

学位（専攻分野） 博士（理学）

学 位 記 番 号 総研大甲第13号

学位授与の日付 平成4年 3月16日

学位授与の要件 数物科学研究科 機能分子科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Resonance Raman Study on Cytochrome c Oxidase

論文審査委員 主 査 教 授 斎 藤 修 二

教 授 北 川 禎 三

教 授 木 村 克 美

助教授 那 須 奎一郎

助教授 折 井 豊（京都大学）

論文内容の要旨

第1章 序

チトクロム c 酸化酵素（以下 C C O と略す）は、ミトコンドリアの内膜上に存在する膜タンパク質で、呼吸により取込まれた酸素分子を還元すると同時に、膜の内側から外側へプロトンの能動輸送を行う。その結果膜を隔てたプロトンの濃度勾配が生じるが、これが A T P の合成に使われる。C C O は多くの手法で研究されているが、X 線構造解析がなされていないなど、その構造と機能発現のメカニズムの多くは未だにわかっていない。

本研究では、共鳴ラマン分光法を使って、C C O の構造と機能との相関を 2 つの角度から調べた。共鳴ラマン分光法は、生体分子の活性中心の構造情報を得ることができる、溶液状態で比較的低濃度の試料でも測定できる、などの点でユニークかつ有力な手法である。申請者は最初、C C D を使ったラマン分光器を製作し、それを使って酵素の C u A と呼ばれる活性中心の遠赤色光励起による共鳴ラマン散乱を測定した。さらに、可視光励起のラマン散乱の測定から、酵素とホルミル試薬との間の反応について調べた。

第2章 C C D 検出器を使ったラマン分光器の製作

C C D は 2 次元の受光素子で、受光効率が非常に高く近赤外域にまで感度を持つこと、ダークカウントをほとんどゼロに抑えることができること、ピクセル間のクロストークがないこと、など従来のマルチチャンネル光検出器を上回る性能を持つ。申請者は特に C C D が遠赤色域にも感度を持つという点に注目し、これまで感度のよい検出器がなかったためにほとんど研究がされていない、700nm-1000nm 領域でのラマン散乱の測定に応用した。

アストロメッド社製 C C D と分散型のシングル分光器とを組み合わせ試験した結果、読み出しノイズの他、宇宙線やチャージトラップと呼ばれる現象などが、スペクトルに悪影響を与えることを見出した。それらを抑えて S / N 良くスペクトルを測定できるよう、装置、ソフトウェア、測定方法の開発を行い、

特にマルチチャンネルスキャンと呼ばれる手法を導入する必要があったとのことである。

最終的に得られたスペクトルは、1084nm励起によりFT法によって得られたスペクトルと、少なくとも同程度の感度を持つことを示した。

第3章 遠赤色光励起による、チトクロムc酸化酵素の共鳴及び非共鳴ラマン散乱による研究

CCOは、830nmに幅広く弱い吸収帯を持つ。これは酵素のCuAサイトによる吸収帯だとされているが、吸光係数が小さく遠赤色域にあるため、これまでCuAの共鳴ラマン散乱の測定は不可能であった。申請者らは、CCDを使ったラマン分光器を応用することにより、CuAのラマン散乱の観測に初めて成功した。

得られたスペクトルには、高波数域にアミドやフェニルアラニンなどのタンパクの非共鳴ラマン散乱と、ヘムによる前期共鳴のラマン散乱が観測されていた。前者は、酸化型、還元型とでほとんどスペクトル形が変わらない。一方、酸化型の試料では、これらのラマン散乱のほかに 330cm^{-1} に幅広いピークが観測された。中間酸化状態での測定により、このピークの出現は、830nmの吸収帯の出現と一致することを示した。このことから、 330cm^{-1} のピークはCuAに共鳴したラマン線であると結論している。

D₂Oシフトの観測により、このピークは少なくとも3つのラマン線が重なったものであることを示した。ブルー銅タンパクと呼ばれる一連の銅タンパクのラマンスペクトルとの対比から、これらのうち 330cm^{-1} に現れるD₂Oシフトを見せない強いピークを、CuAと配位しているSとの間の伸縮振動に、また 356cm^{-1} のD₂Oシフトを見せる弱いピークを、CuAと配位しているヒスチジンとの間の伸縮振動にそれぞれ帰属した。 330cm^{-1} という値は、ブルー銅タンパクよりも低波数であるが、これは、CuAの銅-硫黄間の距離がブルー銅タンパクに比べて長くなっている、というEXAFSの結果と一致する。

チトクロムa₃にシアンを配位させたもの、a₃に一酸化炭素を配位させて、還元型にしたもの、また、CCOとチトクロムcとの間でコンプレックスを作らせたもの、などの試料のCuAのラマン散乱では、 330cm^{-1} のピークは全く形を変えない。振動スペクトルが分子構造の変化に敏感であることから、CuAサイ

トは他の活性中心から比較的独立した環境にあると記している。これは、チトクロム c が CuA のそばに配位し電子を CuA に伝達している、という説には否定的な結果である。

高波数部分に現れるヘムのラマン線の挙動から、チトクロム a 部分は、チトクロム a₃ の酸化数や配位状態の変化の影響をあまり受けないこと、酸化型ではシアンがチトクロム a₃ 部分に配位していることなどを確認した。

第4章 チトクロム c 酸化酵素－ホルミル試薬反応の、可視共鳴ラマン分光法による研究

ヒドラジン、ヒドロキシルアミンなどのホルミル試薬は、ホルミル基と反応して Schiff 塩基を作ることが知られている。ヘム a は、ポルフィリン側鎖にホルミル基をもつため、C=O とこれらホルミル試薬との反応は古くから調べられている。しかし、それらは主として吸収分光法による研究であるため、実際にホルミル試薬がホルミル基と反応しているかどうかについて、未だに確定的な証拠がなかった。

そこで申請者は還元型の C=O にホルミル試薬を反応させた試料について、可視光励起のラマン散乱の測定を行った。得られたスペクトルは、1) チトクロム a₃ が 6 配位になっていること、2) チトクロム a、チトクロム a₃、共にホルミル基は反応していないこと、を示す。この結果は、ホルミル試薬はチトクロム a₃ に配位はするが、2つのヘムのホルミル基とは反応していないことを示す。

論文の審査結果の要旨

出願者は、近赤外領域で感度を持つCCD 2次元受光素子を用いて、700nm-1000nmで十分な感度を持つラマン散乱分光器を開発した。受光素子の特性を考慮した上で、宇宙線によるノイズの除去、信号の読み出しのソフトウェア、波長スキャンなどに独創的な工夫を行い、S/N比を向上させた。

チトクロムc酸化酵素は、Feを含むサイトについては可視領域に吸収帯を持つため、各種分光法が適用され、Feが関連する部分の構造ならびに構造と関連する電子伝達過程についての理解が進んでいる。これに対して、Feサイトと同様な役割を担っていると考えられているCuサイトについては、その吸収帯が近赤外(830nm付近)にあるため、分光手段が乏しく、理解が進んでいなかった。出願者は、開発したラマン分光器を用いて、チトクロムc酸化酵素の830nm帯の共鳴ラマン散乱スペクトルを初めて測定することに成功した。その結果CuAサイトに関連するラマン線を 330cm^{-1} に見出し、 D_2O 添加試料での振動数のシフトから、この振動の性格を明らかにした。また、このラマン線のCuAの酸化状態、FeサイトにシアンやCO結合させたり、酵素にチトクロムcを結合させた状態に対する振舞いから、チトクロムc酸化酵素とチトクロムcとの結合状態について新たな知見を得た。

また出願者は、可視共鳴ラマン分光法を用いてチトクロムc酸化酵素とホルミル試薬の反応も追跡し、ホルミル試薬が反応する部位も明らかにした。

以上、出願者の研究成果は、近赤外ラマン散乱分光法の開拓とその酵素化学への反応として学問的に高い水準にあり、また十分に価値のあるものである。よって、審査委員会が出願論文が学位授与に値すると全員一致で判断した。