

氏名	Denis A. Proshlyakov
学位（専攻分野）	博士（理学）
学位記番号	総研大甲第154号
学位授与の日付	平成7年9月28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	Molecular Mechanisms of Enzymatic Catalysis by Cytochrome c Oxidase in the Reaction With Hydrogen Peroxide: Resonance Raman and Visible Absorption Studies
論文審査委員	主査 教授 渡辺 芳 人 教授 北川 禎 三 助教授 高橋 保 教授 薬師 久 彌 助教授 鰐木 基 成（姫路工業大学）

The reaction between oxidized cytochrome oxidase and hydrogen peroxide is an important model for elucidation of the catalytic functions of the enzyme. This thesis presents the results of an extensive study on the peroxide reaction of cytochrome oxidase.

To investigate the intermediates generated in the reaction between oxidized cytochrome oxidase and hydrogen peroxide: (1) a new microcirculating system was constructed, (2) a steady-state approach for slow enzymatic reactions was developed, (3) a new high-performance device for Raman/absorption simultaneous determination was constructed.

Application of these new techniques to the reaction intermediates of cytochrome oxidase allowed to perform Raman/absorption inter assignment of the spectral forms and revealed that:

- ...the "Peroxy" intermediate of cytochrome oxidase ("607nm" form) has an oxoheme structure of the binuclear center ( $\nu_{\text{Fe=O}}=0\ 804\text{cm}^{-1}$ ), on the contrary to the widely assumed Fe-O-O(H) structure. There is a weak hydrogen bond between the oxygen atom bound to heme  $a_3$  and some residue nearby, which has a  $\text{pK}_a$  above 10.
- ...the "ferryl" intermediate of cytochrome oxidase ("580nm" form) consists of multiple oxoiron species. The relative population of these intermediates is modulated by the experimental conditions, and the individual intermediates are characterized by the Fe=O stretching modes at  $800\text{cm}^{-1}$ ,  $796\text{--}794\text{cm}^{-1}$  and  $781\text{cm}^{-1}$ . This is the first observation of multiple oxoiron intermediates within one oxidation level among all heme enzymes. Intermediates at the "ferryl" oxidation state of cytochrome oxidase exhibit considerably higher sensitivity to the hydrogen isotope in the medium than the "Peroxy" intermediate. The  $\text{pK}_a$  of the distal residue(s) in the "ferryl" intermediates is above 10 similar to the case of the "Peroxy" intermediate.
- ...the intermediates in the reaction of oxidized cytochrome oxidase with hydrogen peroxide have the same vibrational properties as the intermediates in the dioxygen reaction. This proves that two reactions share the same pathway.
- ...the oxygen-isotope-sensitive Raman band at  $355\text{cm}^{-1}$ , which was previously suggested to arise from the hypothetical Fe-O-O(H) intermediate, was shown to arise from an intermediate possessing a single oxygen atom bound to the heme iron. On this basis the  $355\text{cm}^{-1}$  Raman band was assigned to the His-Fe=O bending mode. This band is developed in the "580nm" form. Its Fe=O stretching band is either overlapped with other bands in the  $\sim 800\text{cm}^{-1}$

region or is not enhanced under the present excitation conditions.

- ...the "Peroxy" and "ferryl" oxidation levels of cytochrome oxidase are characterized by different susceptibility to oxygen exchange with bulk solution under certain conditions despite the similar oxoheme structure. The oxygen exchange reaction observed for the "ferryl" intermediates and absence of the exchange for the "Peroxy" intermediate distinguish cytochrome oxidase from other heme enzymes presumably reflecting its catalytic specificity.

The transient absorption experiments revealed that:

- ...the "607nm" form is the primary intermediate upon binding of peroxide under transient conditions. On this basis it is concluded that the "607nm/804cm<sup>-1</sup>" species is an earlier intermediate than the "580nm/785cm<sup>-1</sup>" species in both peroxide and dioxygen reactions.
- ...conversion between the "Peroxy" and "ferryl" oxidation levels exhibits high sensitivity to the hydrogen isotope in the medium. The observed effect of H<sub>2</sub>O to D<sub>2</sub>O substitution (5-fold decrease of the rate constant) was highest among the steps so far characterized.
- ...at acidic pH cytochrome oxidase probably exists in form of two subpopulations, which exhibit different properties upon initial binding of hydrogen peroxide. At alkaline pH a single form of enzyme is present and the reaction follows the pathway through the "607nm" form. These subpopulations, however, are not related to transitions between "resting" and "pulsed" forms of enzyme.

These observations indicate that the properties of the binuclear center of cytochrome oxidase, as a member of superfamily of heme-copper terminal oxidases, are different from that of heme pockets of other heme enzymes. It provides evidence that the redox coupling between dioxygen reduction and proton translocation, as well as gating of H<sup>+</sup> translocation, takes place at the binuclear center. The fundamental observation of the multiple oxoiron intermediates of cytochrome oxidase might advance the understanding of the molecular mechanisms of catalysis by heme-copper terminal oxidase to the new stage. It is proposed that proton-translocation steps are associated with the conversion between several successive oxo-intermediates, which reflect structural rearrangements taking place at the active site. The possible roles of Cu<sub>B</sub> in the cleavage of the O-O bond at the "Peroxy" oxidation level and in proton translocation as a binding site of the released hydroxyl anion are proposed.

The mechanisms of proton pumping were reconsidered in a view of new observations reported in this study and the recent data from other techniques. A mechanism of a gradient-driven ion pump was proposed. As an example, mechanism of proton translocation by cytochrome oxidase *via* oxygen-relay

switching was constructed on the basis of present experimental data. The new mechanism is consistent with the basic observations on cytochrome oxidase and allows to overcome the restrictions contained in the earlier hypothesis.

## 審査結果の要旨

チトクロームcオキシダーゼが酸素分子を4電子還元する過程で生成する種々の反応中間体に関し、これまで多くの研究が行われてきた。特に、ペルオキシ中間体(Fe-OOH)とオキシ種Fe=Oが吸収スペクトルの607nm, 580nmに吸収ピークを持つ化学種であると考えられてきた。これに対し、申請者は酵素と過酸化水素との反応で上記不安定中間体を作り、共鳴ラマン分光法を用いてキャラクタリゼーションを行った。

研究を開始するに当たり、測定のための装置開発を新規に行っている。測定を行う溶液に対し、レーザー光と白色光が同時に、しかも同一の領域を照射できるシステムの確立は、ラマンシグナルがレーザー光による分解生成物に起因するものではなく、607nm, 560nmにそれぞれ吸収ピークを持つ中間体に由来しているものであることを明確にしている点で、非常に重要な役割を果たしている。更に、サンプル溶液に一定の割合で過酸化水素を添加することを可能とするフローシステムを作り、フローさせながら測定を行うことで、本来短寿命の化学種を比較的長い時間定常状態として観測できる系を確立するなど、随所に学位申請者による独自の工夫がなされている。

本学位論文における主要な課題の第一点は、これまでペルオキシ中間体と考えられていた607nmに吸収を示す中間体が、Fe-O-O(H)構造ではなく、Fe=O構造を取っている事を強く示唆する結果を得たことである。 $\nu$ (Fe=O)は、 $804\text{cm}^{-1}$ にその伸縮振動に由来するシグナルを示し、 $^{18}\text{O}$ による同位体シフトにより $\nu$ (Fe= $^{18}\text{O}$ )は、 $769\text{cm}^{-1}$ に観測される。さらに、 $\text{H}^{18}\text{O}$ - $^{18}\text{OH}$ を用いた観測から、 $804\text{cm}^{-1}$ のシグナルがO-O伸縮ではなく $\nu$ (Fe=O)に基づく事を決定的なものとした。これに加え、軽水・重水中での観測を行い、数 $\text{cm}^{-1}$ のシフトを見だし、Fe=O酸素が水素結合を形成していることを明らかとした。論文では、pH=10まではシグナルのシフトが見られないことより、 $\text{pKa} > 10$ のアミノ酸残基との間で水素結合を形成している可能性が示唆された。一方、580nmに観測される化学種の場合、 $\nu$ (Fe= $^{16}\text{O}$ )に帰属される伸縮振動は $785\text{cm}^{-1}$ にシグナルを示し、 $^{18}\text{O}$ 置換により $750\text{cm}^{-1}$ にシフトする。軽水/重水中での測定、pH変化などにより、Fe=O錯体の生成が確認された。

これら二つの中間体は、過酸化水素を酸素源として得られたものであるが、先に $\text{O}_2$ との反応中間体に対して得られたラマンスペクトルとの比較から、チトクロームcオキシダーゼが本来酸素分子と反応して2電子及び3電子還元された時に生成する化学種と同一のものであることも示されている。

以上、本研究成果は、チトクロームcオキシダーゼによる酸素分子の還元過程に関し重要な知見を提供し、この分野へ与えるインパクトは非常に大きいものと考えられる。更に、申請者はチトクロームcオキシダーゼが担っている末端酸化酵素としての生化学的役割に関しても深い理解を持っており、理学博士に相応する知識を有していると判断される。従って、理学博士の学位に値すると結論された。

申請者は、研究主題であるCytochrome c oxidaseに関するこれまでの研究成果を深く理解し、本質を突く問題点を明らかにしている。更に、実験手法として共鳴ラマン分光法を用いているが、口述試験を行った結果、その他の分子分光学に関しても十分な理解と知識を有していることが明らかとなった。一方、公開発表会では、専門を異にする聴衆を考慮して、複雑な生化学的問題点、分光学的な方法論、解釈等に関し非常にわかりやすい説明

を心がけるなど、非常に印象的な講演であった。なお、講演及び質疑は英語で行われ、論文が英語で作成されており、語学に関しても合格とした。