



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Mechanism of Electron Transfer from Cytochrome c to Cytochrome c Oxidase Regulated by Hydrophobic Interaction [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	佐藤, 航
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第13234号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/69940
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Wataru_Sato_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（理学） 氏名 佐藤 航

学 位 論 文 題 名

Mechanism of Electron Transfer from Cytochrome *c* to Cytochrome *c* Oxidase Regulated by Hydrophobic Interaction
(疎水性相互作用で制御されるシトクロム *c*–シトクロム *c* 酸化酵素間の電子伝達機構)

第一章では本学位論文の背景として、ミトコンドリア内におけるタンパク質 Cytochrome *c* (Cyt *c*)に着目した理由について述べる。ミトコンドリアは生命維持に必須の ATP 合成の場として機能し、その ATP は糖の分解などによって生じた電子がミトコンドリア内膜に存在する一連のタンパク質群の間を伝達することで膜間部へ汲み出されるプロトンの濃度勾配をエネルギーに合成される。この呼吸鎖において、Cytochrome *c* oxidase (CcO)は酸素分子を水分子に還元することで一連の電子伝達を終結させる重要な役割を担い、そのための電子は Cyt *c* から供給される。酸素分子の水分子への還元は 4 電子必要である一方で Cyt *c* が供給できる電子は 1 個であるため、Cyt *c* は電子供給のために CcO に対し絶えず結合と解離を繰り返していると考えられる。このことから Cyt *c*-CcO 間の電子伝達反応は相互作用によって厳密に制御されていると想定されているが、その詳細な分子機構は未だ解明されていない。特に近年のタンパク質間相互作用の研究において、静電相互作用のタンパク質複合体の安定性に対する熱力学的寄与は極めて乏しく、むしろ疎水性相互作用の方が寄与していることが示唆されている。そこで本学位論文ではこれまで重要性が示唆されながらも十分に検討されていなかった疎水性相互作用に着目し、Cyt *c*-CcO 間電子伝達制御機構の一端を明らかにすることを試みた。

第二章では、これまで実験的に検討されていなかった Cyt *c*-CcO 複合体形成への疎水性相互作用の熱力学的寄与について検討した。Cyt *c* と CcO との会合に伴う疎水性相互作用の形成を相互作用部位から誘起される「脱水和」から捉え、その脱水和の定量を通して Cyt *c*-CcO 間に働く疎水性相互作用を形成する残基を同定し、さらにはその脱水和に起因するエントロピー増大を見積もることで、疎水性相互作用の複合体形成への熱力学的寄与を検討した。このような脱水和を複合体形成に伴うタンパク質体積変化を複合体解離定数 K_d の浸透圧依存性から求めることで脱水和した水の分子数を見積もった。この浸透圧を用いた解析により、Cyt *c*-CcO で複合体が形成される際に 20 分子程度の水和水がタンパク質表面からバルクへ放出されることが示され、さらに先行研究で示された Cyt *c* の CcO との相互作用部位のうち特にヘムの近傍に位置する疎水性残基 Ile81 をより体積の小さい、つまり周辺の水和水の分子数が少ない Ala に置換したところ、会合に伴い脱水和する水の分子数が半数程度まで減少したことから、この残基が脱水和を伴い CcO と疎水性相互作用を形成することが示された。さらに、この脱水和に起因するエントロピー増大は複合体形成における全エントロピー変化の約 60% を占めていると見積もられ、疎水性相互作用が会合における主な熱力学的駆動力であることが示された。以上より、Cyt *c* はヘム近傍の残基間で特異的に形成される疎水性相互作用を駆動力に CcO と複合体を形成していることが明らかとなった。

第三章では、第二章で示された Cyt *c* のヘム近傍疎水性領域で誘起される脱水和の機能的意義について検討した。近年の研究でタンパク質表面の水和環境の変化がタンパク質の構造変化を引き起こし、その結果酸化還元電位が低下することで電子伝達が促進されることが提唱されているが、Cyt *c*-CcO の系においてこのような疎水表

面からの脱水和による機能発現への影響については殆ど検討されていない。そこで、Cyt *c* のヘム周辺からの脱水和による電子伝達反応への影響を検討するため、タンパク質表面の脱水和を促進するポリエチレングリコール (PEG) を Cyt *c* 溶液中に添加することで、CcO との会合時に脱水和が誘起される Cyt *c* ヘム近傍の水和環境を模倣した系を構築し、PEG 存在下における CcO への電子伝達活性を評価することを試みた。その結果、Cyt *c* は PEG 存在下において CcO なしに酸化が進行するという予想外の現象が観測された。この Cyt *c* の電子伝達機能に影響を及ぼした原因を追跡するため、各種分光法を用いて PEG 存在下における Cyt *c* の構造を検討した結果、Cyt *c* 表面からの脱水和によって、ヘムの側鎖が溶媒側に露出するような変化が示された。さらに、ヘム近傍の疎水性残基を Ser に置換することでその周辺を親水的な環境に変化させた変異体を用いた実験を行った結果、このようなヘム近傍の構造変化が見られず、この構造変化が CcO との会合時に誘起されるヘム近傍の疎水性残基からの脱水和に起因していることが示された。以上より、Cyt *c* のヘム側鎖近傍領域からの脱水和がヘム側鎖の溶媒側への露出を引き起こし、そのヘム周辺の水和環境の変化による還元電位の低下を通して CcO への電子伝達に寄与していると考えられた。

第四章では第二、三章で明らかになったヘム近傍で特異的に形成される疎水性相互作用の Cyt *c* から CcO への電子伝達経路の形成への寄与について検討した。Cyt *c*-CcO 複合体の構造をドッキングシミュレーションにより予測し、その構造を基に最適な電子伝達経路、つまりドナー-アクセプター間の電子カップリング定数 T_{DA} が最大の値となる経路を理論解析により求めた結果、電子は第二、三章で着目した疎水性残基 Ile81, Val83 を含む疎水性残基を介して伝達されることが示された。さらに、疎水性の Ile81 を親水性の Ser に置換した変異体について、過渡吸収分光法を用いて実験的に求めた T_{DA} は、野生型に対し約 1/10 の値を示したことから、CcO との疎水性相互作用の形成によってヘム近傍の Ile81 周辺の水分子が排除されることで両酸化還元中心間に疎水的な領域が形成され、電子はその領域を経路として CcO へ伝達されることが考えられた。このような疎水性領域の形成は、非特異的な水素結合の形成によって電子伝達経路に影響を与える水和水の流入を防ぎ、安定な電子伝達経路を構築することで電子移動に寄与していると示唆された。

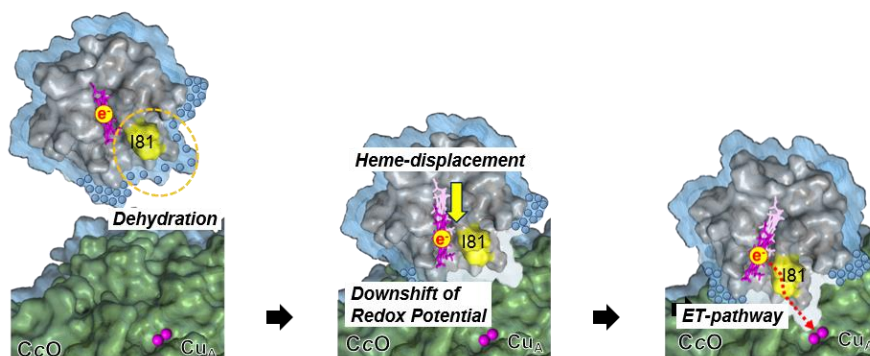


Fig. 1 本学位論文で提唱された Cyt *c*-CcO 間電子伝達機構

第五章では本学位論文において得られた結果や今後の展望をまとめた。ATP 合成において重要な Cyt *c* から CcO への電子伝達反応を制御するタンパク質間相互作用について、これまでは静電相互作用に着目した研究が進められてきた一方、疎水性相互作用の役割や寄与についてはほとんど検討されていなかった。本学位論文では、Cyt *c* ヘム近傍の疎水性残基に起因する疎水性相互作用が、CcO との複合体形成の熱力学的駆動力となる (Fig. 1 左) だけではなく、その際に誘起される脱水和によって酸化還元電位を低下させ (Fig. 1 中央)、CcO への電子伝達経路の形成に大きく寄与している (Fig. 1 右) など、電子移動の制御にも貢献していることを明らかにした。酸化還元中心の近傍に疎水性残基が集中した構造を有する電子伝達タンパク質は Cyt *c* 以外にも多く存在し、本研究で得られた疎水性相互作用による電子伝達制御機構が生体内で重要な役割を担うこれらのタンパク質においても同様に成立することが予想され、タンパク質間電子伝達機構の一般則に繋がると期待される。