

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	シトクロムc3のヘムの酸化還元に伴う 電子移動制御機構の解明
Title(English)	
著者(和文)	小林永佑
Author(English)	Eisuke Kobayashi
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9481号, 授与年月日:2014年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:朝倉 則行,丹治 保典,中村 聡,三原 久和,蒲池 利章
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9481号, Conferred date:2014/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻：	生物プロセス	専攻	申請学位 (専攻分野)：	博士	(工学)
Department of			Academic Degree Requested	Doctor of	
学生氏名：	小林 永佑		指導教員 (主)：	朝倉 則行	
Student's Name			Academic Advisor(main)		
			指導教員 (副)：		
			Academic Advisor(sub)		

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

酸化還元タンパク質 (電子伝達タンパク質) の最も重要な機能は然るべき電子伝達の流れを維持することである。生体内では解糖系、クエン酸回路、電子伝達系において電子が一定方向に伝達されることにより、高効率なエネルギー生産が行われている。一定方向に電子が伝達されるためには、酸化還元タンパク質が特定の相手を認識して電子の授受を行なう必要がある。

シトクロム c_3 は分子内に 4 つのヘムを有する酸化還元タンパク質であり、生体内では酵素ヒドロゲナーゼの電子伝達パートナーとして働く。シトクロム c_3 は電子を供与する際、電子を一時的に貯蔵し、その間に相手を認識している。この電子貯蔵機能は電子プール機構と呼ばれている。しかし、電子プール機構とヘムの酸化還元との関係はこれまでに明らかとなっていない。ヘムの酸化還元はシトクロム c_3 構造の変化を引き起こすので、特定のヘムの酸化還元が引き金となり、電子プール機構が働くと予想される。そこで、本研究では、電子プール機構に関与するヘムを特定し、そのヘムの酸化還元が引き金となるシトクロム c_3 の電子移動制御を解明することを目的とした。

第 2 章では、シトクロム c_3 の電子プール機構に関与するヘムを特定した。電子プール機構を測定するために、シトクロム c_3 の生体内のパートナーではない酸化還元分子であるビオローゲンとの電子移動複合体形成を高感度 EQCM 法により解析した。電子プール機構に関与するヘムを特定するために、ヘムの軸配位子を 1 ヶ所置換したシトクロム c_3 変異体を調製した。軸配位子を置換したヘムのみがシトクロム c_3 の分子間電子移動の経路から外れるので、電子プールが機能しないシトクロム c_3 変異体を見い出すことにより電子プールに関与するヘムを特定できる。高感度 EQCM 法により、シトクロム c_3 と 3 種類のビオローゲンとの電子移動複合体解析を行なった結果、いずれのビオローゲンにおいても、ヘム II がシトクロム c_3 の分子間電子移動に関与しない場合、電子プール機構が失われた。このことから、ヘム II の酸化還元が電子プール機構を引き起こしていることがわかった。ヘム II が電子伝達に関与せず、電子プール機構が働かない場合、シトクロム c_3 は電子受容も電子供与も起こりやすい状態であることがわかった。

第 3 章では、ヘム II の酸化還元、シトクロム c_3 の構造変化、および電子プール機構の関係を明らかにするために、ヘム II の酸化還元を直接コントロールした条件下において、生体内のパートナーである酵素ヒドロゲナーゼとの電子移動を調べた。ヘム II の酸化還元をコントロールするために、ヘム II を電極に固定化したヘム II 配向シトクロム c_3 固定化電極を用いた。この電極では、ヘム II が電極に固定化されているので、ヘム II の酸化還元をコントロールできる。ヘム II を還元状態または酸化状態を保つことにより、電子移動の際に構造変化を起こさない条件を作った。比較としてヘム III 配向シトクロム c_3 固定化電極を用いた。固定化均一配向シトクロム c_3 とヒドロゲナーゼとの電子移動の結果から、ヘム II が還元型シトクロム c_3 と酸化型シトクロム c_3 の変化の引き金となり、そのアウトプットとして電子プール機構が見られることがわかった。

第 4 章では、シトクロム c_3 とヒドロゲナーゼの分子間電子移動を調べる手法の開発を行なった。シトクロム c_3 の電子供与ヘムとヒドロゲナーゼの電子受容部位である鉄硫黄クラスターが接近して電子移動複合体を形成すると予想されるので、電子移動速度が高いと考えられる。したがって、これを確かめるためには、分子間電子移動におけるシトクロム c_3 とヒドロゲナーゼの接触する分子面を調べる必要がある。そこで、本研究では、分子面を規定した 2 分子の接触した状態の電子移動を測定できる手法の開発を行なった。この測定では、プローブ電極に固定化した分子と基盤電極に固定化した分子を接触させる。測定上の問題は、2 電極の金原子同士が接触し、通電することである。この問題を解決するため、分子鎖の長い自己組織化単分子膜(SAM)電極を用いた。基盤上に固定化された約 2 nm のヘキサデカンチオールにプローブ金原子を接触させた結果、金原子同士の接触を回避することができた。さらに、2 電極間の距離が 2 nm 以上離れた場合、トンネル電流が観測されなかった。このことから、電極から 2 nm 以上離れた位置に分子を固定化する必要があることがわかった。分子を 2 nm 以上離して固定化した電極を調製し、基盤上のヒドロゲナーゼにプローブ上のビオローゲンを接近させ、電子移動を測定した。その結果、ヒドロゲナーゼとビオローゲンの接触による通電状態を確認でき、2 分子間の距離をコントロールして電子移動を測定できた。このことから、開発した測定法を用いることにより、シトクロム c_3 とヒドロゲナーゼの分子間電子移動における分子の接触面を調べることができると示唆された。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻：	生物プロセス	専攻
Department of		
学生氏名：	小林 永佑	
Student's Name		

申請学位(専攻分野)：	博士	(工学)
Academic Degree Requested	Doctor of	
指導教員(主)：	朝倉 則行	
Academic Advisor(main)		
指導教員(副)：		
Academic Advisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Intermolecular electron transfer between redox proteins is a key step in biological processes such as photosynthesis and electron transport systems in mitochondria. It has been suggested that redox proteins store electrons temporarily until donating electrons and select specific redox partners. The electron transfer chain is maintained by this mechanism, which is called “electron pool effect”.

Cytochrome c_3 is a redox protein containing four c-type hemes, and is a redox partner of hydrogenase *in vivo*. Cytochrome c_3 has multiple redox states caused by four hemes redox, and the electron pool effect works during the four hemes redox. Therefore, cytochrome c_3 donates electrons to hydrogenase instantly. On the other hand, cytochrome c_3 store electrons temporarily until donating electrons to the other redox partners.

It is suggested that Each heme in cytochrome c_3 has a specific role. Our previous study shows that heme I is electron entrance of cytochrome c_3 and heme IV is electron exit of cytochrome c_3 . However, roles of Heme II and heme III is not clarified. So it is expected that redox of either heme II or heme III causes dynamic conformational change of cytochrome c_3 , so that cytochrome c_3 is able to select a specific partner during period the conformational change. In this study, the key heme in cytochrome c_3 to the electron pool effect was investigated. Moreover, the relationship between electron pool effect of cytochrome c_3 and the key heme redox in cytochrome c_3 , causing dynamic conformational change of cytochrome c_3 , was investigated.

A new method, monitoring electron transfer complex formation between cytochrome c_3 and hydrogenase, was developed. Electron transfer complex formation is rate-determining step. This step, however, have not been monitored directly and have not been revealed in experiment. In this study, hydrogenase immobilized on substrate electrode and viologen immobilized on probe electrode are contacted directly and and electron transfer between hydrogenase and viologen is measured.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note: Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).