

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)	要約
Type(English)	Outline

シトクロム c_3 のヘムの酸化還元に伴う電子移動制御機構の解明

小林 永佑

【緒言】

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、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、電子を供与する際に一時的に貯蔵し、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起点となり、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とシトクロム c_3 の電子移動制御の関係を解明することを目的とした。

【結果と考察】

(1) シトクロム c_3 の電子プール機構に関与するヘムの特定

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は電子伝達に関与しなくなるので、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した。

電子プール機構を測定するために、シトクロム c_3 と生体内のパートナーではない 3 種類のビオローゲンの電子移動複合体形成を高感度 EQCM 法により解析した。3 種類のビオローゲン固定化金電極を調製し、電極上のビオローゲンと溶液中のシトクロム c_3 が静電的複合体を形成させた。静電的複合体から電子移動複合体へと転換する際のシトクロム c_3 の挙動をモニターした。

シトクロム c_3 の電子プール機構が働くと電子を供与する際の電子移動複合体形成速度が低くなる。Wild Type およびヘム I、ヘム III、ヘム IV の変異体の電子供与の際の速度定数は電子受容の場合と比較して電子移動複合体形成速度が低い。したがって、電子プール機構が働いていることがわかった。一方、ヘム II 変異シトクロム c_3 では、電子受容、電子供与いずれにおいても電子移動複合体形成速度はほとんど同じであった。このことから、電子プー

ル機構が働いていないと考えられる。ヘム II 変異シトクロム c_3 では、ヘム II の軸配位子が置換されているので、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。以上の結果から、ヘム II の酸化還元が電子プール機構をコントロールしていることが明らかとなった。

(2)ヘム II の酸化還元に伴うシトクロム c_3 の電子移動制御機構の解明

ヘム II の酸化還元と構造変化、及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 を電極に固定化したヘム II 配向シトクロム c_3 固定化電極を用いて、ヘム II の酸化還元をコントロールした。これにより、ヘム II を常に還元状態を保つことができ、シトクロム c_3 の還元型の構造と酸化型の構造が変換しない条件を作った。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 を介したヒドロゲナーゼの水素発生反応をサイクリックボルタンメトリーにより測定した。その結果、ヘム II 配向の方がヘム III 配向と比べて、シトクロム c_3 がヒドロゲナーゼへ供与した電子数が多いことがわかった。このことから、ヘム II 配向では、ヘム II が常に還元状態となり、シトクロム c_3 は還元型の構造となり、ヒドロゲナーゼとの電子移動速度が高いことがわかった。一方、ヘム III 配向では、シトクロム c_3 の酸化型と還元型の構造変化が起こるので、水素発生反応速度が低いことがわかった。以上のことから、ヘム II の酸化還元が還元型シトクロム c_3 と酸化型シトクロム c_3 の変換の引き金であることがわかった。

(3)電気化学プローブを利用したタンパク質の分子間電子移動測定法

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により電子移動複合体が形成されると予想される。したがって、電子移動複合体の形成を明らかにするためには、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。測定の問題点となるのは、2 電極の金原子同士が接触し、通電することである。分子鎖の長い自己組織化単分子膜(SAM)電極を用いて、この問題を解決した。次に、基盤電極に固定化したヒドロゲナーゼにプローブ電極に固定化したビオローゲンを接触させ、電子移動を測定した。その結果、基盤上のヒドロゲナーゼとプローブ上のビオローゲンの接触をモニターし、電子移動を測定することができた。