

氏名	ぬもと のぶ たか 沼本 修 孝
学位(専攻分野)	博士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2949 号
学位授与の日付	平成 17 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	理学研究科化学専攻
学位論文題目	Structural studies of extracellular giant hemoglobin of pogonophoran <i>Oligobrachia mashikoi</i> (有鬚動物マシコヒゲムシ由来細胞外巨大ヘモグロビンの構造解析)
論文調査委員	(主 査) 教授 三木邦夫 教授 杉山 弘 教授 藤井紀子

論 文 内 容 の 要 旨

酸素運搬を担うヘモグロビンは哺乳類以外の生物にも広く存在し、それらは単量体で機能するものから、100以上のサブユニットからなる複合体を形成するものまで、分子の会合状態や、酸素との親和性の点において極めて多様な広がりを持っている。これらは哺乳類ヘモグロビンとは異なった複合体を形成しており、その機能との相関が詳細に解明された例は極めて限られている。マシコヒゲムシ (*Oligobrachia mashikoi*) は有鬚(ゆうしゅ)動物門に属する海産底生性の動物であり、口や消化管を持たず、かわりに体内に共生させた独立化学栄養細菌が作り出す有機物を栄養源にしていると考えられている。マシコヒゲムシはその血液中に、分子量約40万の巨大な細胞外ヘモグロビン複合体を有しており、これにより宿主が利用する酸素と、共生細菌が利用する硫化水素を同時に運搬するという特徴的な機能を有している。ヒゲムシと近縁の生物であるハオリムシも同様に硫化水素を同時に運搬することができる巨大ヘモグロビンを複数種もっており、これらのアミノ酸配列の解析などから、保存された Cys 残基が硫化水素結合に関わることが提唱されていた。本研究ではこのマシコヒゲムシの血液に存在する巨大ヘモグロビンの X 線結晶構造解析を行い、その構造と機能の相関、特に硫化水素結合の機構を考察した。

結晶化には、石川県九十九湾海底より採集した *O. mashikoi* より精製したものをを用い、沈殿剤として酢酸ナトリウムあるいは PEG10000 を用いることで X 線回折実験に用いることのできる結晶を得た。構造解析により適した PEG10000 から得られた結晶を用いて、水銀および白金化合物置換体による重原子同型置換法を適用することで位相を決定することができた。2.85Å 分解能における結晶構造精密化の結果、 $R=23.6\%$ 、 $R_{free}=27.7\%$ の分子モデルが構築できた。

O. mashikoi 巨大ヘモグロビンは、4種のサブユニット (A1, A2, B1, B2) からなる24量体を形成しており、外径約120Å、内部に直径約50Åの空洞が存在する球状構造であった。また、12量体を形成するように、サブユニット間でジスルフィド結合が形成されていることが確認された。これまでの研究から提唱されている、硫化水素を結合するとされる保存システイン残基は、遠位ヒスチジン (E7) からそれぞれ1残基 (E7+1) あるいは11残基 (E7+11) 離れた2カ所の位置が知られている。*O. mashikoi* の巨大ヘモグロビンでは、4種のサブユニットのうち、A1とB2にE7+1のシステインが存在し、A2にE7+11のシステインが存在する。一方B1では、保存されていないシステイン残基 (E7+21) が存在した。A1とB2においては、E7+1のシステイン残基の周辺環境がよく類似しており、どちらもフェニルアラニン残基がシステインを取り囲むように存在して疎水的な環境を作っていることがわかった。これらのフェニルアラニンは、E7+1のシステインとともによく保存されている。水銀化合物で置換した誘導体結晶構造では、実際に水銀原子がシステインに結合しており、さらにはこれらフェニルアラニン側鎖が水銀原子に接触していた。これは、この部位において、フェニルアラニンの芳香環による静電相互作用によって、結合した硫化水素が安定化されることを示唆するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

本論文は、マシコヒゲムシ (*Oligobrachia mashikoi*) に存在する巨大ヘモグロビンの完全な会合形態での立体構造を、X線結晶構造解析によって決定し、その構造と機能の相関、特にこのヘモグロビンが硫化水素を結合する機構について考察したものである。マシコヒゲムシは有鬚(ゆうしゅ)動物門に属する海産底生性の動物であり、口や消化管を持たず、体内に共生させた独立化学栄養細菌がつくりだす有機物を栄養源にしていると考えられており、その血液中に存在する分子量約40万の巨大な細胞外ヘモグロビンが、宿主が利用する酸素と、共生細菌が利用する硫化水素を同時に運搬している。

本研究では、まず石川県九十九湾海底より採集した *O. mashikoi* より精製した巨大ヘモグロビンの結晶化に成功し、X線回折実験に用いることのできる結晶を得ている。X線結晶解析においては、水銀および白金化合物で置換した誘導体結晶を用いた重原子同型置換法を適用することによって、この結晶構造の位相を決定することに成功し、2.85Å分解能における結晶構造の精密化を行い、十分な精度を有する ($R=23.6\%$, $R_{\text{free}}=27.7\%$) 分子構造モデルが得られている。

結晶構造解析の結果、この巨大ヘモグロビンの全体構造は、外径約120Å、内部に直径約50Åの空洞が存在する球状構造で、4種の異なるサブユニットからなるヘテロ4量体が3つ会合して12量体をつくり、さらにこれが2つ会合した24量体を形成していることを明らかにしている。また、12量体を形成するためのサブユニット間ジスルフィド結合の形成も確認している。

この結晶構造をもとに、この巨大ヘモグロビンが運搬する硫化水素の結合機構が考察されている。これまでの研究から、保存システイン残基が硫化水素を結合することが提唱されているが、本研究の結果、4つのサブユニットに存在するシステイン残基の周辺では、硫化水素の結合に適すると考えられる疎水的環境が作られていることを明らかにしている。また、各サブユニットのシステイン周辺構造を検討することで、硫化水素結合の妥当性を論じている。さらには、結晶構造解析の過程で用いられた誘導体である水銀化合物置換結晶において、その構造中に実際に水銀原子に結合するシステインを見出し、これを硫化水素が結合する場合のモデルとして考察を深めている。これらのことから、これらのシステイン残基ならびにその周辺の構造環境が結合した硫化水素を安定化する機構を提唱している。

以上のように、本研究は複雑な超分子タンパク質複合体の結晶構造解析を行い、得られた構造情報からその生物学的機能を考察することに成功した例であると評価することができる。これらの研究成果は、当該分野の進展に確かな寄与があるものであり、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認められた。論文内容とそれに関連する分野について試問した結果、合格と認めた。