

氏 名	い はら まさ き 伊 原 正 喜
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学位記番号	工 博 第 2163 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 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	工学研究科分子工学専攻
学位論文題目	Design of Novel Hemoproteins Using Heune-Binding Modules (ヘム結合モジュールを用いた新規ヘム蛋白質の設計)
論文調査委員	(主 査) 教授 森 島 績 教授 今 中 忠 行 教授 田 中 渥 夫

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、ヘム蛋白質の分子設計の観点から、ヘム結合機構の解明、新規酸素分子結合ヘム蛋白質の作成、ヘム結合モジュールを利用した新規ヘム結合蛋白の設計に関する研究についてまとめたものであり、5章7節からなる。

第一章では序論として、人工的な蛋白質を設計することや、蛋白質に新しい機能を付加することは、現在においても非常に困難であることを説明した上で、蛋白質構造内には機能的、構造的にある程度の独立性を有するモジュールと呼ばれる構造単位があり、それらをビルディングブロックとして考えると、効率よく設計を行うことができることを提案している。

第二章では、シトクロム b_5 (cyt b_5) のヘム結合過程を詳細に調べ、人工ヘム結合蛋白質の設計に必要な指針を探ろうとした。cyt b_5 では、ヘムは蛋白質内に取り込まれ、2つの軸配位子ヒスチジン39 (His39)、ヒスチジン63 (His63) と配位結合を形成している。今回、Cyt b_5 からヘムを取り除いたアポという状態を作成し、そこにヘムを加えて、再びアポ Cyt b_5 がヘムを取り込み、軸配位子が形成される様子を観測した。その結果、ヘムはまず His63 と配位結合を形成し、その配位結合は His63 周辺の構造とヘムとの疎水相互作用により安定化され、その後 His39 がヘムに結合するという機構を明らかにした。この結果は、His63 の周辺構造はヘムと強い相互作用を形成することができ、ヘム結合蛋白質を設計する上で優れたビルディングブロックであることを示している。

第三章では、第二章で得られた知見をもとに、Cyt b_5 の His39 をロイシンに置換し、酸素分子が結合することのできる新しいヘム蛋白質 (H39L) を作成した。この H39L では5配位型ヘムが、His63 の周辺構造 (ヘム結合モジュール) により安定に保持されており、その2価のヘム鉄は酸素分子を安定に結合することができ、その親和性は天然の酸素結合蛋白質であるミオグロビンの約10倍であることが明らかとなった。さらに、H39L の酸素結合能を最適化するためにアミノ酸変異を試み、フェニルアラニン35をバリンに置換した H39L/F35V で、ミオグロビンの約800倍という高酸素親和性の設計に成功した。このように天然の蛋白質を遙かに越える酸素親和性を持つ人工的な蛋白質を作り出したのは、本研究が初めての例である。

第四章では、第二章で、ビルディングブロックとしての可能性を示されたヘム結合モジュールを、実際に別の蛋白質に組み込んで、新規ヘム蛋白質を作成することを試みている。モジュール組み換えによって蛋白質を設計するという考えは以前より当研究室にあり、これまでにいくつかの機能変換に成功している。しかし、これまでモジュール置換によって創製された安定な構造を持つキメラ蛋白質のほとんどすべてが、相同蛋白質間のモジュール置換によるものであり、立体構造の大きく異なる蛋白質間のモジュール置換では安定な新規蛋白質は得られていない。そこで今回我々は、モジュール置換後、導入されたモジュールと蛋白質との間に新しい相互作用を再生させることで、導入されたモジュールの機能が組み込まれた安定な新規蛋白質を創製できるという新しい設計法を考えた。この設計法を実証するために、Cyt b_5 のヘム結合モジュールを、ミオグロビンのヘム結合モジュール部分と入れ替えた Mb b_5 Mb、ヘモグロビン α 鎖のヘム結合モジュールを、Cyt b_5 のヘム結合モジュール部分に導入した $b_5\alpha b_5$ 番作製した。これらのキメラ蛋白質は、特異的なヘム結合能を示し、蛋白質構造

のコアとなる部分には大きな変化は観察されなかった。しかし、天然型の蛋白質と比べてヘム結合能は著しく低下し、構造の不安定化が観測された。これらの結果は、ヘム結合モジュールが他の蛋白質構造においてもヘム結合能を失わず、また蛋白質構造のコア部分を不安定化することはないが、モジュール間に相互作用が存在しないために蛋白質分子全体の不安定化を起こしたことを示している。そこで、次にモジュール間相互作用を再生するために、ランダムなアミノ酸変異を持つ変異体集団を作成し、ファージディスプレイという手法で、モジュール間相互作用が改善されヘム結合能が向上した変異体を選択するという戦略を採用した。10⁷の多様性を持つ *b₅α b₅* 変異体集団でスクリーニングを試みた結果、*b₅α b₅* のロイシン25、バリン29などにアミノ酸置換を持つ変異体が多数選択された。そのうちいくつかを大腸菌で大量発現させヘム結合能や構造について調べた。それらのなかで clone6-1 と名付けられた *b₅α b₅* 変異体では、*b₅α b₅* に比べて明らかにヘム結合状態の安定化が示された。この clone6-1 で見つかったアミノ酸置換は、ヘム結合モジュールのC末付近に集中して導入されていたことから、*b₅α b₅* ではその領域の歪みが最も大きく、clone6-1 ではその歪みがある程度解消され、ヘム結合モジュールがヘムと相互作用しやすくなったと思われる。この実験は、モジュール間相互作用の再生に挑戦した初めての研究であり、得られた変異体のアミノ酸置換やその位置から再生に関する多くの知見を得ることができた。

第5章では、全編を通じての総括がまとめられている。

論文審査の結果の要旨

本論文は、ヘム蛋白質の分子設計の観点から、ヘム結合機構の解明、新規酸素分子結合ヘム蛋白質の作成、ヘム結合モジュールを利用した新規ヘム結合蛋白質の設計に関する研究についてまとめたものであり、得られた主な成果は以下の通りである。

1. ヘム蛋白質の一つであるシトクロム *b₅* において、ヘムの結合過程を各種分光法により検討した。その結果、軸配位子の一つであるヒスチジン63付近の構造が、ヘム結合の初期過程にヘムと強い疎水相互作用を形成することで、効率的なヘム結合を可能にしていることを明らかにした。それにより、ヒスチジン63付近の構造をヘム結合モジュールであると提案し、ヘム結合蛋白質の設計において有用なビルディングブロックであることを示唆した。
2. 1. の結果を受けて、シトクロム *b₅* のヘム結合モジュールを全く異なる構造を持つグロビン族蛋白質との間で置換し、新しいヘム蛋白質の作成を目指した。この新しいキメラヘム蛋白質は、構造の不安定化を起こしたが、特異的なヘム結合能をもっており、ヘム結合モジュールは、ヘム結合蛋白質の設計において有用なビルディングブロックであることを実証することができた。
3. 2. で作成したキメラヘム蛋白質の機能や構造をさらに最適化するために、ファージディスプレイ法を利用した分子進化工学的手法を確立し、実際にキメラヘム蛋白質のヘム結合能を向上させることに成功した。分光学的測定から、ヘム結合モジュールと周辺の蛋白質構造との間の立体障害を解消することが、キメラヘム蛋白質の構造最適化に必要なことが示された。

以上、本論文は、ヘム結合モジュールを用いた新しいヘム結合蛋白質設計法に関する重要な知見を与えるだけでなく、今後、蛋白質に新しい補酵素結合能や基質特異性、電子伝達部位を付与する分子設計の際に重要な指針を与えるものである。したがって、本論文は、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成14年2月27日論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。