

氏名	稲葉謙次
学位(専攻分野)	博士(工学)
学位記番号	工博第1701号
学位授与の日付	平成10年3月23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	Structural and Functional Regulations by Modules in Globin Proteins (モジュール構造によるグロビン蛋白質の構造・機能制御に関する研究)

論文調査委員 (主査) 教授 森島 績 教授 田中渥夫 教授 今中忠行

### 論文内容の要旨

本論文は、真核生物においてDNAのエキソンに対応し進化的意味があると考えられている蛋白質のモジュール構造に着目しており、多種のモジュール置換グロビン蛋白質を作製することにより、グロビン蛋白質におけるモジュール構造の構造及び機能的役割に関する研究を行ったもので、5章8節からなる。

第1章では序論として、グロビン蛋白質におけるモジュール構造の定義とその生物学的意義を述べた上で、現在のモジュールに関する研究の問題点を明示している。

第2章第1節では、ヘモグロビンの $\alpha$ 鎖・ $\beta$ 鎖間の会合に深く関与していると予想されるモジュールM4の構造及び機能的役割を検討する目的で、 $\alpha$ 鎖・ $\beta$ 鎖間でモジュールM4を互いに置換した $\alpha\beta$ (M4)鎖と $\beta\alpha$ (M4)鎖を遺伝子工学的手法を用いて作製し、その構造及び機能を詳細に調べている。その結果、 $\alpha\beta$ (M4)鎖の二次構造及び三次構造は天然鎖に比べ大きく崩れており、顕著な構造的不安定化が観測された。これに対し、 $\beta\alpha$ (M4)鎖の構造は天然型と極めて類似しており、その不安定化も観測されなかった。さらに $\beta\alpha$ (M4)鎖では、会合特性が $\beta$ 鎖型から $\alpha$ 鎖型に変換されたのに対し、 $\alpha\beta$ (M4)鎖においては、このような会合特性の変換は起こらなかった。以上のことは、モジュールM4がヘモグロビンの $\alpha$ 鎖・ $\beta$ 鎖の会合特性を制御する機能を有するものの、モジュール間の相互作用が安定なグロビン構造形成、さらにはモジュール自身が有する機能を発揮する上で不可欠であることを強く示唆している。第2節では、 $\beta\alpha$ (M4)鎖のX線結晶構造解析に取り組んでおり、三次構造上モジュールM1-M3までの領域は $\beta$ 鎖と一致しているのに対し、置換したM4は $\alpha$ 鎖に類似した構造をとっていることが明らかにされた。このことはモジュールがグロビン構造において準独立的な構造単位であることを強く支持している。

第3章では、モジュールがもつ構造及び機能的意義についてさらに検証するため、構造的にモジュールの中央から隣のモジュールの中央に対応し、機能及び進化的意味をもたないとされる偽モジュールと呼ばれる単位での置換を試みている。第3節では、 $\beta\alpha$ (M4)鎖と比較する目的で、 $\beta$ 鎖の偽モジュールPM3(モジュールM3の中央からM4の中央までの領域)を $\alpha$ 鎖のPM3に置換した $\beta\alpha$ (PM3)鎖を作製した。その結果、 $\beta\alpha$ (PM3)鎖は $\beta\alpha$ (M4)鎖同様、安定な三次構造を形成し、またその会合特性は $\beta$ 鎖型から $\alpha$ 鎖型に変換されることがわかった。さらに、 $\beta\alpha$ (PM3)鎖のヘム近位側の構造は、偽モジュールPM3の置換により $\alpha$ 鎖型に変換されていることがNMRにより示唆された。以上の結果は、偽モジュールPM3が、モジュール同様グロビン鎖の会合特性及びヘム近傍構造を制御する機能を有することを示している。最近、グロビン構造において従来のモジュールM1-M4はさらに分割され、m1-m8の8つのサブモジュールから成ることが提唱されている。この新たなモジュール同定に基づけば、今回着目した偽モジュールPM3はサブモジュールm6+m7に対応し、m6がヘム配位構造を、m7が会合特性を制御する機能単位ではないかと考察できる。つまりこの節では、グロビン蛋白質における新たな構造・機能単位の存在を理論的考察に先駆けて実験的示唆し、それが新たに同定されたモジュールに対応することを初めて報告している。第4節ではさらに、ヘモグロビンと同じくグロビン蛋白質の一つであるミオグロビンと $\alpha$

鎖間でも、偽モジュール PM3 を置換した変異体を作製しており、やはり偽モジュール PM3 がヘム近傍構造の制御に関わる因子を含むことを確認している。

第4章では、前節で提唱したサブモジュールの機能的役割を検証する目的で、ヘムの軸配位子である近位ヒスチジンを含むヘム結合部分に対応しているサブモジュール m6 に着目している。第5節では、ミオグロビンの m6 を  $\alpha$  鎖の m6 と置換した Mba (m6) 鎖を作製し、種々の分光学的手法によりその構造解析を行っている。その結果、近位ヒスチジンのヘム鉄への配位構造ならびにヘムの電子状態、さらにはヘム側鎖の構造までもが、サブモジュール m6 の置換により  $\alpha$  鎖型に変換されていることが観測された。このことは、サブモジュール m6 がグロビン蛋白質のヘムの近位側構造及び電子状態を制御する機能単位であることを強く支持するものである。一方、第6節では、 $\alpha$  鎖・ $\beta$  鎖でサブモジュール m6 を置換しており、ヘモグロビンにおいては、m6 だけでなく  $\alpha$ ,  $\beta$  鎖間の会合がヘムの近位側構造及び電子状態の制御に大きく関わっていることを示している。このようにヘモグロビンとミオグロビンにおいてサブモジュール置換の影響が異なることは、両グロビン蛋白質の立体構造形成メカニズムの相違を示唆していると考えられる。つまりモジュール置換の実験を通し、グロビン蛋白質における構造・機能制御の仕組み、さらにはモジュール構造に基づく新規人工グロビン蛋白質の設計指針に関する多大な知見が得られたと結論づけられる。

第5章では、全編を通じての総括と、研究結果の要旨がまとめられている。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は、真核生物において DNA のエクソンに対応し進化的意があると考えられている蛋白質のモジュール構造に着目し、ヘモグロビン  $\alpha$  鎖・ $\beta$  鎖及びミオグロビン間でモジュール置換した多種のキメラ型グロビン蛋白質を遺伝子工学的手法を用いて作製することにより、モジュール構造の構造及び機能的役割に関する研究を行ったものである。得られた主な結果は以下の通りである。

1. グロビン蛋白質において、モジュール構造はサブユニット間の会合などを制御する機能を有するものの、モジュール間の相互作用が安定なグロビン構造の形成、さらにはモジュール自身もつそれら機能の発現に重要であることを明らかとした。

2. グロビン蛋白質においてこれまで同定された四つのモジュール M1-M4 はさらに二つに分断され、モジュール M3 の後半の領域(サブモジュール m6)がヘム近位側の構造及びヘムの電子状態を制御し、またモジュール M4 の前半の領域(サブモジュール m7)がサブユニット間の会合特性の制御に大きく関わっていることを実験的に初めて明らかにした。

3. 多種のモジュール置換グロビン鎖の構造的性質を総括することにより、モジュール構造に基づく新規人工蛋白質の設計において、モジュール間の相互作用、さらには置換するモジュールの境界・大きさの配慮が不可欠であることを指摘した。

以上本論文はグロビン蛋白質におけるモジュール構造の構造及び機能的性質、さらにはモジュール構造に基づく有効的な新規人工蛋白質の設計指針を明らかにしたものであり、学術上はもとより、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10年1月23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。