

氏名	みず くに きみ ひこ 水 谷 公 彦
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	論 農 博 第 2371 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Studies on the Structural Mechanism of Iron Uptake and Release in Ovotransferrin N-Lobe (オボトランスフェリン N ロープにおける鉄取込および放出の構造機構に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 廣 瀬 正 明 教 授 池 田 篤 治 教 授 井 上 國 世

論 文 内 容 の 要 旨

トランスフェリンは、血中の鉄イオン (Fe^{3+}) を結合し、標的細胞への運搬機能をもつタンパク質である。分子量約 80,000 のポリペプチド鎖からなる本タンパク質は、立体構造上 2 つの相同なローブ (N ローブと C ローブ) を形成し、さらに各ローブは 2 つのドメイン (ドメイン 1 とドメイン 2) から構成される。 Fe^{3+} はドメイン間のクレフトの奥に取り込まれ、安定な Fe^{3+} -トランスフェリン複合体を形成する。標的細胞では、この複合体は特異的レセプターを介して細胞内に移行し、エンドソームにて酸性条件下に Fe^{3+} を放出する。本論文は、ニワトリのトランスフェリンであるオボトランスフェリンの N ローブ (N 末端半分子) を用い、プロテアーゼによる断片化実験および X 線結晶構造解析を通じて、 Fe^{3+} の取込と放出の構造機構を詳細に解析した結果について報告したものであり、その成果は以下のように要約される。

1. オボトランスフェリン N ローブのドメイン 2 は、一次構造上連続した領域 (Tyr92-Arg246) からなるのに対し、ドメイン 1 は一次構造上離れた 2 つの領域 (Ala 1-Ser91 と Val1247-Arg332) から構成される。プロテアーゼによる断片化実験により、ドメイン 2 が独立した立体構造単位であることが知られているが、ドメイン 1 の 2 つのポリペプチド鎖領域については独立した立体構造単位であるのが不明であった。そこでオボトランスフェリン N ローブの 6 つのジスルフィド結合のうち、ドメイン 1 に存在する 2 つのジスルフィド結合 (Cys10-Cys45 と Cys20-Cys36) のみを保持する部分還元 N ローブを調製し、キモトリプシンによる断片化を試みた。その結果、ドメイン 1 の N 末端側の領域にほぼ相当する Ala 1-Tyr72 からなるフラグメントを取得し、円偏光二色性スペクトル分析の結果から、このフラグメントが独立した立体構造単位であることを示した。

2. Fe^{3+} の取り込みに際して、トランスフェリンはドメイン間のクレフトが開いたアポ型の構造から、閉じたホロ型の構造に移行する。ホロ型では、4 つのアミノ酸残基の側鎖と炭酸アニオンが Fe^{3+} に配位している。ホロ型の形成は、何らかの低分子キレート剤を用い、アポ型に Fe^{3+} とキレート剤の複合体を添加して中間体を形成させた後、キレート剤を炭酸アニオンに置換することにより完了する。そこで、この中間体の構造を解明するため、アポ型 N ローブにニトリロ酢酸- Fe^{3+} 複合体を結合させた分子種について X 線結晶構造解析を行い、2.1Å の分解能で構造決定に成功した。この中間体はドメインが開いた構造をとっており、 Fe^{3+} にはタンパク質の 2 つのリガンド Tyr92-OH と Tyr191-OH ならびにニトリロ酢酸が配位した特異な構造をとることを明らかにした。

3. ホロ型からの Fe^{3+} の放出には、無機アニオンの共存が不可欠である。そこで無機アニオン結合サイトの構造を知るため、アポ型 N ローブを硫酸アンモニウム溶液中で結晶化し、その結晶構造を 1.9Å の分解能で解明した。このアポ型の構造では、開いたドメイン間のクレフトの奥に 2 分子の硫酸アニオンが結合し、その結合サイトは一部 Fe^{3+} の配位アミノ酸側鎖と重複していた。この結果から、無機アニオンによる Fe^{3+} の放出は、 Fe^{3+} 結合サイトへの無機アニオンの拮抗的結合によることを明確にした。

4. オボトランスフェリン N ローブのホロ型の結晶構造は、2.3Å レベルの分解能ですでに明らかにされていたが、詳細な構造機構解析には、より高分解能の結晶構造が必要であった。そこでホロ型 N ローブの高分解能の X 線結晶構造解析を試

み、1.65Åの分解能での構造決定に成功した。このホロ型の構造と上記アポ型および中間体の構造を比較し、 Fe^{3+} の取込および放出に際しての構造変換の機構を検討した。その結果、ドメイン1とドメイン2は2本の β 鎖によりつながれており、ドメイン間の開閉に際してこれら β 鎖がヒンジとして働くこと、またこの開閉は β 鎖の近傍を通る回転軸を中心に2つのドメインの相対位置が49.7度回転する機構に基づくことを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

トランスフェリンは血中にて鉄イオン(Fe^{3+})を分子内に取り込み、標的細胞へ運搬後、細胞内において Fe^{3+} を放出する機能をもつ。本タンパク質の立体構造については、分子量約80,000のポリペプチド鎖がNローブとCローブに折り畳まれ、各ローブは2つのドメインから構成されることが知られているが、機能と関連した構造機構の詳細については不明の点が残されていた。本論文の著者は、ニワトリのトランスフェリンであるオボトランスフェリンのNローブを用い、 Fe^{3+} の取込と放出の構造機構について詳細な解析を行っている。本論文の評価すべき点は以下のとおりである。

1. ドメイン1は一次構造上離れた2つの領域(Ala1-Ser91とVal247-Arg332)から構成され、これらが独立した立体構造単位であるのか不明であった。そこで、ジスルフィド結合を部分的に還元したNローブをキモトリプシンで消化し、ドメイン1のN末端側の領域にほぼ相当するフラグメント(Ala1-Tyr72)を調製すると共に、円偏光二色性スペクトル分析により、このフラグメントが独立した立体構造単位であることを示した。

2. Fe^{3+} の取り込みに際して形成される中間体の構造を解明するため、アポ型Nローブにニトリロ酢酸- Fe^{3+} 複合体を結合させた分子種についてX線結晶構造解析を行い、2.1Åの分解能で構造決定に成功した。この中間体は、 Fe^{3+} にタンパク質の2つのリガンドTyr92-OHとTyr191-OHならびにニトリロ酢酸が配位した特異な構造をとることを証明した。

3. 無機アニオンによるホロ型からの Fe^{3+} の放出の構造機構を知るため、アポ型Nローブを硫酸アンモニウム溶液中で結晶化し、結晶構造を1.9Åの分解能で解明した。この構造に基づき Fe^{3+} 結合サイトへの無機アニオンの拮抗的結合が Fe^{3+} の放出の促進に与ることを明確にした。

4. ホロ型Nローブの高分解能のX線結晶構造解析を試み、1.65Åの分解能での構造決定に成功した。このホロ型の構造と上記アポ型および中間体の構造を比較し、 Fe^{3+} の取込および放出に際しての構造変換の機構を検討した結果、2つのドメインをつなぐ2本の β 鎖の近傍を通る回転軸を中心に、ドメイン間の相対位置が49.7度回転することにより大きな構造変換を起こすことを明らかにした。

以上のように、本論文はオボトランスフェリンによる Fe^{3+} の取り込みと放出の構造機構について新たな知見を示したもので、応用生命科学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成13年2月8日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。