

|             |                                                                                                                                  |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名         | いし かわ はる と<br>石 川 春 人                                                                                                            |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (工 学)                                                                                                                        |
| 学 位 記 番 号   | 工 博 第 2282 号                                                                                                                     |
| 学位授与の日付     | 平 成 15 年 3 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      | 工 学 研 究 科 分 子 工 学 専 攻                                                                                                            |
| 学 位 論 文 題 目 | STUDIES ON THE SIGNAL TRANSDUCTION MECHANISM<br>MEDIATED BY SMALL MOLECULES IN METALLOPRO-<br>TEINS<br>(金属蛋白質における小分子によるシグナル伝達機構) |
| 論文調査委員      | (主 査)<br>教 授 森 島 績 教 授 船 引 卓 三 教 授 今 中 忠 行                                                                                       |

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、生体内における小分子によるシグナル伝達機構に着目し、いまだに蛋白質化学的に十分な検討が加えられていないシグナル伝達金属蛋白質の構造的、機能的解析を通して、生体内シグナル伝達の分子制御機構の解明を目的とした研究についてまとめられ、4章10節からなる。

第1章では序論として、本論文にまとめられている研究の背景として、現在までに提唱されている小分子と蛋白質の相互作用によるシグナル伝達機構について紹介している。細胞は周辺環境の変化に対応し、自身の恒常性を維持するために、外界の変化を感知し、その変化に対応する蛋白質や、有機分子を合成している。このような、細胞の応答は多数の蛋白質による情報伝達により行われている。特に気体分子は、容易に拡散し細胞内に到達することから、最も重要なシグナル伝達物質として着目されている。しかし、ヘムを利用した気体分子センサー蛋白質の分子構に基づいた研究はまだ少なく、本論文では、気体分子を利用したシグナル伝達機構の解明を目的として、NO および CO をシグナルとして感知する蛋白質の研究を行った。また、ヘムを利用したもう一つのシグナル伝達機構として、ヘムの結合により制御されている蛋白質に着目し、構造と活性化機構について検討することで、ヘムによるシグナル伝達について解明を試みた。本研究では、新たに同定されたヘムを利用した気体分子センサー蛋白質および、ヘムを利用した鉄イオンセンサー蛋白において、分光学的手法を利用した構造化学的な検討を通じてその制御機構を明らかにし、金属イオンを利用した生体内のシグナル伝達機構の解明を目的としている。

第2章では気体分子と蛋白質間の相互作用が、気体分子センサー蛋白質の活性化および制御に重要であると考え、注目することで、気体小分子によるシグナル伝達機構の解明を試みた。1, 2節ではミオグロビンにおける気体分子の結合反応を、レーザーフラッシュフォトリシスと、高圧下での測定を組み合わせ、気体分子の配位に伴う熱力学的パラメータを算出することで、蛋白質内部に埋もれた残基であってもヘム鉄に結合する気体分子を制御していることを示しており、気体分子による蛋白質の制御を検討する際には、蛋白質内部に埋もれた残基にも着目する必要性を示唆している。

3, 4節では、実際に生体内でNO センサー及びCO センサーとして働いている HRI および CooA の構造を、電子吸収、核磁気共鳴、電子スピン共鳴、共鳴ラマン等の分光測定により解析した結果、NO による HRI の活性化は、NO と周辺のアミノ酸残基の相互作用に由来するものであることを示し、CO による CooA の活性化はCO 結合に伴い軸配位子であるプロリンが解離することに由来することを明らかにした。以上、第2章では気体分子センサーの新たな制御機構を解明した。

後半の第3章では、ヘムを利用したセンサー蛋白質の制御機構を検討した。第5節ではヘムにより制御を行う蛋白質のモデルとして、ヘムとミオグロビンが安定に結合する際のヘムの配向の変化の研究を行い、ヘムと蛋白質の認識機構について検討した。

第6節では、細胞内のヘム濃度を感知する Irr の制御機構を明らかにするために、天然型 Irr と、ヘム結合蛋白質に一般的に見られ、Irr においてもヘム結合部位と考えられるヘム結合モチーフ HRM のシステイン残基をアラニンに置換した変

異体を作成し、種々の分光測定によりヘムの配位状態を検討した。その結果、ヘムはヘム鉄が3価の場合はHRMのシステイン残基に結合するが、ヘム鉄が2価に還元されるとヒスチジン残基に結合することが明らかとなった。この結果は、ヘム結合蛋白質に一般的に見られるHRMが細胞内の3価のヘムのみを感知している可能性を示唆しており、今後のヘムをシグナルとする蛋白質研究に知見を与えるものと考えられる。また、ほ乳類のIRP2内部にHRMが存在することに着目し、IRP2の鉄イオン濃度感知機構へのヘムの関与について検討した。3価のヘム存在下でIRP2の各種分光測定を行ったところ、システインとヒスチジンの配位に特徴的なスペクトルを示し、2価では、Irr同様システインは解離した。また、IRP2が酸素とヘム存在下で細胞内で分解されることも明らかにした。この結果は、細菌内に存在するIrrと同様の機構がほ乳類の蛋白質でも利用されていることを示している。このIrrとIRP2に共通の機構は、ヘムをシグナル伝達物質として感知するとともに、自身の分解に利用していることを示唆しており、今後の生体内での鉄代謝機構の解明に対して大きな手がかりになると期待できる。

第4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、近年次々と明らかになってきた細胞内シグナル伝達系において、金属蛋白質による制御機構に着目し、各種分光法を用いた物理化学的手法でそれらの制御機構を構造面から検討したものである。本論文でとりあげられている蛋白質は大きく2種類に分けられ、ヘムを活性中心に有し気体分子を感知する気体センサー蛋白質と、ヘム自身をシグナルとして感知する鉄イオン濃度センサー蛋白質である。得られた主な成果は以下の通りである。

1. ヘムを利用した、気体センサー蛋白質の研究では、まず酸素貯蔵ヘム蛋白質であるミオグロビンモデルとして、気体分子と蛋白質の相互作用を検討し、蛋白質の内部に埋もれた残基も気体分子配位制御に関与していることを明らかにした。
2. 次に、気体センサー蛋白質HRIおよびCooAの活性型、不活性型の構造を核磁気共鳴、電子スピン共鳴、共鳴ラマン等の各種分光法を用いて検討することで、シグナル伝達物質NOおよびCOのヘムへの結合に伴う構造変化を明らかにした。その結果、HRIではNO分子と周辺のアミノ酸残基の相互作用が、CooAではCO結合に伴うヘム軸配位子の解離が、それぞれ構造変化を引き起こし、活性化につながることを明らかにした。
3. ヘムをシグナルとする蛋白質の研究では、ヘムによる蛋白質活性化の制御機構について検討した。まず、ミオグロビンモデル蛋白質として、蛋白質とヘムの立体的相互作用を検討するとともに、これまで構造的には全く検討されてこなかった、ヘムを制御因子として働く蛋白質Irrの構造を各種分光法を用いて解明することで、ヘムによるシグナル伝達制御機構を構造面から検討した。
4. ほ乳類における鉄制御蛋白質IRP2において、ヘムが制御因子となっていることを、分子生物学的手法と、分光学的手法を組み合わせ初めて明らかにし、今後のヘム制御蛋白質研究の指針を示した。

以上、本論文は、ヘムを利用したシグナル伝達金属蛋白質の制御機構に重要な知見を与えるだけでなく、今後の細胞内シグナル伝達機構の解明に重要な指針を与えるものである。従って、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られる。また、平成15年2月20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。