

氏 名	人 見 裕
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 1844 号
学位授与の日付	平 成 11 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 合 成 ・ 生 物 化 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Reconstituted Myoglobins with Engineered Function (人工機能を付与した再構成ミオグロビン) (主査)
論 文 調 査 委 員	教 授 北 川 進 教 授 伊 藤 嘉 彦 教 授 齋 藤 烈

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、ミオグロビンへの機能化ポルフィリンの再構成による機能性ヘムタンパク質の創製を目指した研究をまとめたものであり、緒論及び本論5章からなっている。

緒論では、本研究の目的と意義ならびに内容についての概略が述べられている。

第一章では、ミオグロビン内におけるヘムプロピオン酸側鎖とグロビン間の相互作用について熱力学的見地から検討を加えている。ヘムの二つのプロピオン酸側鎖の一つがメチル基に置換された非天然ヘムを補欠分子族とする再構成ミオグロビンの常磁性NMRスペクトルから、ミオグロビン内に存在するヘムの二つの配向の比を定量し、二つの配向の自由エネルギー差をヘムの疎水部分と二つのヘムプロピオン酸側鎖が関与する三つのグロビンとの相互作用の合計として説明できる事を明らかにしている。

第二章では、第一章で調製した再構成ミオグロビンの常磁性NMRおよび各種物理化学測定を行い、6位、7位ヘムプロピオン酸側鎖それぞれのミオグロビンの機能と構造に対する役割について詳細に検討を加えている。その結果、6位のヘムプロピオン酸側鎖は45番目のリシン残基と相互作用することにより、水分子などのヘムポケットへの進入を抑制していること、その結果、酸素錯体の安定性を向上させていること、7位のプロピオン酸側鎖は水素結合ネットワークを介して近位ヒスチジン残基のヘムに対する配向角度とその配位強度を制御していることを明らかにしている。

第三章では、第一章、第二章での研究成果を元に、ヘムのプロピオン酸側鎖への化学修飾を施すことによりタンパク質認識能を有するミオグロビンを創出し、安定なタンパク質複合体の構築を行っている。すなわち、多数の負電荷を化学修飾により導入したポルフィリンをミオグロビンに再構成することにより、チトクロムc分子認識ドメインをヘム活性部位近傍のタンパク質表面に有する再構成ミオグロビンを調製し、静電相互作用を介したチトクロムcとの人工的なタンパク質複合体の構築に成功している。また、再構成に亜鉛ポルフィリンを用い、励起三重項状態の減衰速度を測定することにより複合体形成の挙動と電子移動速度の評価が可能であることを見いだしている。

第四章では、第三章で調製した再構成ミオグロビンを基本に、チトクロムc認識部位の構造が異なる再構成ミオグロビンを用いて、インターフェイスのみを系統的に変化させたタンパク質間電子移動のモデル系の構築が可能になり、その複合体形成挙動と複体内電子移動速度の評価を行っている。複合体形成に静電相互作用が重要な意味を持っていることだけでなく、インターフェイスのダイナミックスが複体内電子移動速度に対して影響を与えるという結果を得、タンパク質複体内電子移動に対するタンパク質複合体のダイナミックスの重要性をモデル研究の立場から初めて明らかにしている。

第五章では、第三章で調製した再構成ミオグロビンのペルオキシダーゼ活性に着目し研究を行っている。再構成ミオグロビンと過酸化水素の反応により生成する高原子価状態のヘムの反応性と導入した分子認識部位構造の特徴を明らかにする目的から、種々の酸化基質を用いて検討を加えている。その結果、再構成ミオグロビンが正または負の電荷を有する基質に対して、それぞれミオグロビンのヘム活性部位近傍に導入した多数の負電荷との静電相互作用の為に高い選択性を示すことを

見いだしている。また、ヘムプロピオン酸側鎖に導入した置換基が疎水的な空間を形成することでフェノール性酸化基質のヘム活性中心への接近を容易にし、再構成ミオグロビンが顕著な酸化活性を示すことも見いだしている。以上、ミオグロビンのヘムプロピオン酸側鎖に置換基を導入することにより、その置換基の分子認識能を反映した基質選択性を有する人工ペルオキシダーゼの創製に成功している。

論文審査の結果の要旨

本論文は、機能化ポルフィリンのアポミオグロビンへの挿入に基づいた再構成法により、新規ヘムタンパク質の創製を目指した研究成果をまとめたものである。主な成果は次の通りである。

1. 非天然ヘムを補欠分子族とする再構成ミオグロビンを用いてヘムプロピオン酸側鎖とタンパク質との相互作用を熱力学的に評価し、この熱力学量に対して分子認識化学的な取り扱いが可能であることを見いだした。
2. 非天然ヘムを補欠分子族とする再構成ミオグロビンを種々の物理化学測定により評価し、ヘムプロピオン酸側鎖のミオグロビンの機能と構造に対する役割を解明した。
3. 機能化ポルフィリンの再構成によりミオグロビンのヘム活性部位近傍のタンパク質表面にチトクロムc認識ドメインを新たに構築し、チトクロムcとの人工的なタンパク質複合体の形成に成功した。
4. 異なるチトクロムc認識ドメインを有する再構成ミオグロビンを用いてタンパク質間電子移動モデル系を構築し、タンパク質複合体のダイナミックスが複合体の形成挙動だけでなく複合体内の電子移動に対しても重要な支配因子であることをモデルの立場から初めて明確に示した。
5. ミオグロビンのヘムプロピオン酸側鎖に分子認識部位を導入することにより、分子認識部位の化学的性質を反映した基質選択性を有する人工ペルオキシダーゼの創製に成功した。

以上、本論文は、機能化ポルフィリンのアポタンパク質への再構成によりヘムの機能制御に成功し、ヘムタンパク質の機能発現の理解だけでなく、ポルフィリンをベースとした機能性分子の創出法に道を開くと共に、タンパク質間電子移動についても重要な知見を得ており、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のあるものと認める。また、平成11年2月3日、論文内容とそれに関連した試問を行った結果、合格と認めた。