

氏 名	ふる かわ よし あき 古 川 良 明
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 2130 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	Electron Transfer Reactions Regulated by Structural Dynamics in Hemoproteins (ヘム蛋白質における動的構造変化による電子移動反応の制御機構)
論文調査委員	(主 査) 教 授 森 島 續 教 授 川 崎 昌 博 教 授 齋 藤 烈

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、蛋白質の動的な構造変化による電子移動(ET)反応の制御機構を解明する目的で、鉄-プロトポルフィリン錯体(ヘム)を活性中心として含むヘム蛋白質をモデルとして利用し、各種分光学的手法を用いて研究を行い、その結果についてまとめたもので、6章9節からなる。

第1章では序論として、溶液中での蛋白質構造は常に変化している動的なものであることを紹介し、ET反応が蛋白質の動的構造変化によって制御されている可能性を明示した上で、現在までのこの研究分野における問題点を示している。また、蛋白質ET反応が、「電子ドナーとなる蛋白質とアクセプターとなる蛋白質との会合過程」、「複合体内におけるET過程」、及び「ET後に起こる複合体の解離過程」の三つの過程からなることに着目し、蛋白質の動的構造変化がET反応の各過程に与える影響について、系統的に解明する必要性を述べている。

第2章では、蛋白質には相手蛋白質との会合部位が数多く存在し常に蛋白質複合体の構造が変化していることに着目し、蛋白質複合体の動的構造変化によるET反応の制御機構について検討している。第1節では、シトクロム b_5 (Cyt b_5)とミオグロビン(Mb)という二つのヘム蛋白質をモデルとして用い、両蛋白質の複合体に化学的な架橋を施すことで会合部位の変化を抑制し、ET反応速度を分光学的手法により測定している。観測されたET反応速度は、酸化還元部位であるヘム間の距離が13~20Åに分布した多くの複合体によって説明されるが、それらは形成される複合体の約30%しか占めず、ET反応は酸化還元中心間の距離が短い少数の複合体によって制御されていることを明らかにしている。第2節では、シトクロム c (Cyt c)・Cyt b_5 をモデルとして、ETを司る複合体形成に必要な蛋白質間相互作用を、複合体の解離定数の圧力依存性から算出される体積変化により検討している。その結果、Cyt c ・Cyt b_5 間での複合体形成には静電的相互作用が重要であるとされてきたが、ETを司る複合体では疎水的相互作用が働いていると考えられ、例えば会合部位のアミノ酸配向が変化することで相互作用の様式が変化し、ET反応が制御されると結論付けている。

第3章では、蛋白質構造の熱的な揺らぎがET過程に与える影響に着目している。蛋白質構造の揺らぎは圧力によって抑えられることを利用し、構造揺らぎの大きな蛋白質であるCyt b_5 (第3節)及びMb(第4節)におけるET反応の圧力依存性を検討している。ET反応速度の圧力依存性を説明する理論的な式を導出し、観測されたET反応速度の圧力変化を解析した結果、蛋白質の熱的な構造揺らぎによって、主に水素結合の距離やアミノ酸側鎖の位置が変化することで酸化還元中心間の距離が変化し、ET反応に影響を及ぼすことを初めて実験的に示唆し、蛋白質構造の揺らぎがET反応を制御しうることを検証している。

第4章では、蛋白質構造の動的な変化が会合・解離過程、つまり蛋白質間分子認識を制御しうることに着目し、シトクロムP450camとプチダレドキシン(Pdx)をモデルとして用い、動的な分子認識によるET反応の制御機構について検討している。第5節では、P450camは負に帯電した錯体とのみET反応を行い、正に帯電した錯体とは反応しなかったことから、P450camは負に帯電したPdxとの会合において静電的相互作用による認識機構が働いていることを示唆している。さ

らに、P450cam/Pdx 間の会合は、溶液の浸透圧を増加させると弱まることも見出している（第6節）。これは、浸透圧の増加により、蛋白質周囲の水分子が取り去られた効果であると考えられ、P450cam/Pdx 間の会合では水分子がいわば「接着剤」のように働き、その一つとして水分子を介した水素結合が P450cam/Pdx 複合体界面において形成され、互いの蛋白質が認識しあい、ET 反応が制御されていることを示唆している。

第5章では、これまでの研究で明らかにしてきた蛋白質構造の動的変化による ET 反応への寄与をより詳細に検討するため、Cyt b_5 に蛍光ラベルを施し蛋白質 1 分子での ET 反応を全反射蛍光顕微鏡により観測している。その結果、1 分子レベルでは、ET 反応速度は ET が起こるまでの待ち時間（ET 時間）として表現されるが、ET 時間はおよそ 200—800ms の間に不均一に分布しており、ET 時間の分布が蛋白質の動的構造変化により制御されている可能性がある結論付けている。

第6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、ヘム蛋白質の電子移動反応に着目し、蛋白質構造の動的変化による電子移動反応の制御機構を各種分光法を用いて明らかにした結果についてまとめたもので、得られた主な成果は以下の通りである。

1. 蛋白質はその表面の様々な部位で相手の蛋白質と相互作用するが、形成する複合体に化学的な架橋を加えることで会合部位の変化を抑制した結果、全ての会合部位で電子が移動するのではなく、酸化還元中心間の距離が小さい少数の会合体により電子移動速度が決定されていることが明らかとなった。

2. 蛋白質複合体の会合定数の圧力依存性から蛋白質間に働く相互作用を検討した結果、酸化還元に伴う蛋白質の構造変化は会合部位におけるアミノ酸残基の配向を変化させ、静電的相互作用から疎水の相互作用といった異なる蛋白質間相互作用を誘引し会合部位を変化させることで、電子移動反応が制御されうることが提唱した。

3. 圧力により蛋白質構造の揺らぎに摂動を加え電子移動反応を検討した結果、蛋白質の熱的な構造揺らぎによる水素結合の距離やアミノ酸側鎖の位置の変化が、電子移動速度に影響を与えていることを実験的に明らかにした。

4. 蛋白質間電子移動反応の際に形成される蛋白質複合体の会合定数の浸透圧効果から、会合体界面に存在する水分子を介した水素結合が、蛋白質間に働く分子認識に重要であることを初めて見出し、蛋白質表面における水分子の数を変化させることで、電子を移動させるべき相手蛋白質を特異的に認識していることを示した。

以上、本論文は蛋白質構造の動的変化が電子移動反応を制御する機構を明らかにしたものであり、電子伝達蛋白質による数多くの酵素反応を検討する上での重要な知見を与えるものである。したがって、本論文は、学術上はもとより、実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1月15日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行なった結果、合格と認めた。