

氏名(国籍)	たい こ りん 太 虎 林 (中 国)		
学位の種類	博 士 (理 学)		
学位記番号	博 甲 第 4574 号		
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	数理物質科学研究科		
学位論文題目	<b>Study of Non-Native Heme Coordination Structures Emerging upon Chemical Denaturation of Cytochromes c</b> (シトクロム <i>c</i> の変性過程で生じる非天然ヘム配位構造の構造化学的研究)		
主査	筑波大学教授	Ph.D.	山本泰彦
副査	筑波大学教授	理学博士	木越英夫
副査	筑波大学教授	理学博士	齋藤一弥
副査	筑波大学教授	理学博士	守橋健二

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

本論文では、電子伝達タンパク質シトクロム *c* の変性過程で生じる中間体における非天然ヘム配位構造を解析する研究を通して、シトクロム *c* のフォールディング機構の解明に貢献する多くの新しい知見を得た。シトクロム *c* (cyt *c*) は、活性部位としてヘムをもち、ヘム鉄には軸配位子として His と Met が配位している。Cyt *c* の変性過程では、ヘム鉄の軸配位子が置換された種々の中間体が検出されており、これら中間体の熱力学的安定性は変性反応の反応機構や動力学に大きな影響を及ぼすことが知られている。通常、cyt *c* には、天然状態における軸配位子の一つとして存在する His 以外にも複数の His 残基が存在するため、cyt *c* の変性過程ではこれらの His も軸配位子としてヘム鉄に配位したアンフォールディング中間体 *bis*-His 型が形成され、アンフォールディング機構に大きな影響を与えることが報告されている。本研究では、軸配位子として存在する His 以外にも His をもたない相同タンパク質である好熱性水素細菌 (*Hydrogenobacter thermophilus*) 由来のシトクロム *c*<sub>552</sub> (HT) と緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 由来のシトクロム *c*<sub>551</sub> (PA) における変性過程が NMR スペクトルなど各種分光スペクトルにより解析された。HT と PA の変性過程の解析は、ヘム鉄の非天然配位構造の安定性についての知見を得るために有用であるばかりでなく、ヘム鉄の配位構造の変化と立体構造の形成との相関関係の解明にも寄与する。

酸化型 HT の塩酸グアニジン (GdnHCl) 添加による変性実験から得られた一連の NMR スペクトルでは、GdnHCl 濃度の上昇に伴い、酸化型 HT の常磁性シフトしたシグナルの強度が減少すると共に、ヘム鉄の非天然配位構造に由来するシグナルが 15-40ppm に観測され、それらのシグナル強度が増大した。新たに観測されたシグナルは、*N* 末端のアミノ基を化学修飾したタンパク質の変性過程では観測されなかったことから、*N* 末端のアミノ基が軸配位子 Met に代わってヘム鉄に配位する *N* 末端配位型中間体由来であることを初めて明らかにした。また、*N* 末端のアミノ基が軸配位子 Met に代わってヘム鉄に配位した同様な中間体が、酸化型 PA の変性過程でも生成することを明らかにした。

HT および PA の *N* 末端アミノ酸残基をタンパク質工学的手法により系統的に置換した人工変異体の研究から、*N* 末端配位型は *bis*-His 型に匹敵する安定性を示すことが明らかとなり、*N* 末端配位型はシトクロム *c*

のアンフォールディング機構の調節に寄与する安定な中間体であることが示された。さらに、*N*末端配位型の安定性は、*N*末端のアミノ酸残基の性質およびヘムと共有結合する Cys と *N*末端アミノ酸までの残基数に依存することも実証することにも成功した。また、*N*末端のアミノ基がプロトン化する低 pH 領域では、不対電子を5つもつ高スピン状態が中間体として生成するが、その高スピン中間体におけるヘム鉄の His 以外の軸配位子としては、水分子が配位した六配位構造と配位子をもたない五配位状態とが混在していること、そして六配位構造と五配位構造が NMR のタイムスケールより速い ( $< 2 \times 10^4 \text{s}^{-1}$ ) タイムスケールで相互変換していることを明らかにした。

## 審査の結果の要旨

本論文では、ヘム鉄に対する軸配位子 His 以外には His をもたない相同タンパク質である好熱性水素細菌 (*Hydrogenobacter thermophilus*) 由来のシトクロム  $c_{552}$  (HT) と緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 由来のシトクロム  $c_{551}$  (PA) の変性過程で生じる中間体を解析し、*N*末端のアミノ基が軸配位子 Met に代わってヘム鉄に配位する *N*末端配位型中間体の存在を明らかにした。HT および PA の *N*末端アミノ酸残基をタンパク質工学的的手法により置換した人工変異体の研究から、*N*末端配位型はシトクロム *c* のアンフォールディング機構を調節する重要な中間体であることを示すと共に、*N*末端配位型の安定性は *N*末端のアミノ酸残基の性質や *N*末端アミノ酸の数に依存することも明らかにした。また、*N*末端のアミノ酸が脱離して生じる高スピン中間体における外部配位子交換反応のタイムスケールも決定することに成功した。これらの知見は、変性過程の詳細な解析は、非天然なヘム鉄の配位構造の安定性についての知見を得るために重要であるばかりでなく、ヘム鉄の配位構造の変化と立体構造の形成との相関関係を解明するために有用である。これらの研究成果の学術的価値はきわめて高く、生物無機化学分野の発展に貢献する価値の高い論文である。

よって、著者は博士(理学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。