

氏名(本籍)	たか やま しん いち 高山真一(東京都)		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第4572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	Elucidation of Molecular Mechanisms Responsible for Controlling Redox Function of Cytochromes <i>c</i> (シトクロム <i>c</i> の酸化還元機能調節機構の解明)		
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	岡本健一
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	守橋健二

論文の内容の要旨

本論文では、代表的な電子伝達タンパク質の一つであるシトクロム *c* の機能と構造との関係を解明する研究を、立体構造が類似しているにもかかわらず酸化還元電位 (E_m) や熱安定性がお互いに異なる二種類の相同シトクロム *c*、緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* シトクロム *c* (PA) と好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* シトクロム *c* (HT)、を用いて、従来よりもはるかに系統的かつ高精度に行い、シトクロム *c* の機能調節に関わる分子機構を明らかにした。

HTの熱変性温度は、PAのものに比べて約30℃も高いことが明らかとなっている。PAの熱安定性に関与すると考えられるアミノ酸残基をHTでの対応する残基に置換すると、PAより熱安定性の高い一連の人工変異体が得られる。PAおよびこれらの変異体の E_m のpH依存性を詳細に比較検討することにより、シトクロム *c* の E_m を調節する分子機構が明らかにされた。PAの E_m は、ヘム 17-プロピオン酸基の電離を反映して、pH6付近でpHの低下に伴い約60mV上昇する。このヘムプロピオン酸基の近傍に存在するアミノ酸残基にF34Y, E43Yの変異を導入すると、PAよりpKaが2pH単位以上低下することが示された。これらの変異体では、導入されたTyrがヘム 17-プロピオン酸基と新たな水素結合を形成することによりそのpKaを低下させていると考えられた。また、PAの疎水性コアにおけるF7A, V13M, V78Iの変異は、タンパク質内部の空隙を埋めることにより疎水性コアのパッキングをより密にし、タンパク質の構造を安定化することが知られている。これらの変異を導入した変異体(F7A/V13M/V78I)の E_m は、PAとほぼ同様のpKaを示したが、測定したpH領域で E_m の値が全体的に約70mV低下することが明らかとなった。この結果は、タンパク質内部の疎水性コアの安定化により、酸化型シトクロム *c* でのFe-Met配位結合が安定化されることを反映していると考えられる。また、これらのアミノ酸5残基を全て置換した5置換変異体(F7A/V13M/F34Y/E43Y/V78I)の E_m のpH依存性には、ヘム 17-プロピオン酸基のpKaに影響を及ぼす変異(F34Y, E43Y)と疎水性コアの安定性に影響を及ぼす変異(F7A, V13M, V78I)の両方の影響の足し合わせが反映されていた。この結果から、ヘム 17-プロピオン酸基のpKaとFe-Met配位結合強度による E_m 調節機構は、それぞれ独立して寄与することが明らかとなった。

また、HT と PA のヘム近傍に存在する 64 残基の側鎖のアミド基のヘムに対する配向が E_m 及ぼす影響を定量的に明らかにすると共に、HT の軸配位子 Met を含む長いループ領域のコンフォメーション変化が E_m の調節に関わっていることを初めて明らかにした。さらに、生体内におけるタンパク質間電子移動のモデルとして、シトクロム c から青色銅タンパク質（プラストシアニン，ラスチシアニン）への電子移動反応を解析し、電子移動速度の調節因子である再配置エネルギー λ を見積もることに成功した。得られた λ 値 $380 \pm 50 \text{meV}$ は、過去に報告されているシトクロム c と電極との反応 ($\sim 600 \text{meV}$)，修飾プラストシアニンにおけるタンパク質内電子移動反応 ($\sim 700 \text{meV}$) から求められた λ と比較して著しく低い値であった。これらの結果から、タンパク質間の電子移動反応では、 λ を最小にするような複合体が形成されることにより、効率的な電子移動が行われていることが示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文では、立体構造が類似しているにもかかわらず機能が異なる二種類の相同シトクロム c ，緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* シトクロム c (PA) と好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* シトクロム c (HT)，の系統的かつ詳細な比較研究を通して、シトクロム c の酸化還元電位 (E_m) が、ヘム鉄と軸配位子 Met との配位結合の強度，ヘム 17-プロピオン酸基の電離，ヘム鉄と近傍のアミノ酸側鎖の静電的相互作用，ヘムを覆うループの内部運動などにより調節されていることが明らかになった。また、タンパク質間電子移動反応では、再配置エネルギー λ を最小にするような複合体が形成されることにより、ドナーとアクセプターの酸化還元電位の差が小さくても効率的な電子移動が達成されていることが示唆された。以上の知見は、生体内における電子移動反応の解明に重要であるだけでなく、電子伝達タンパク質を工学的に利用する上でも有用であると考えられる。これらの研究成果の学術的価値はきわめて大きく、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。