【98】

氏　名（本籍）	三　上　真　一（千 葉 県） （み かみ しん いち）
学 位 の 種 類	博　　士（理　　学）
学 位 記 番 号	博　甲　第　4912　号
学位授与年月日	平成 21 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 Entropic Control of Redox Potential of Cytochrome *c*** （シトクロム *c* の酸化還元電位調節におけるエントロピー変化を決定する構造化学的因子の解明）

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	木　越　英　夫
副　査	筑波大学教授	理学博士	守　橋　健　二
副　査	筑波大学教授	工学博士	小　島　隆　彦

論 文 の 内 容 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，酸化還元電位（*Em*）や熱安定性が異なる二種類の電子伝達タンパク質シトクロム *c*，緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* シトクロム c_{551}（PA）と好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* シトクロム c_{552}（HT），及び HT を参考に調製した PA の一連の変異体を用いて，シトクロム *c* の構造と機能の相関関係の解明に有用な知見を得た。*Em* を調節する寄与は，エンタルピー変化（ΔH）とエントロピー変化（ΔS）に分けることができる。シトクロム *c* における *Em* 調節機構を解明する研究では，ΔH を変化させる構造化学的因子の解明が進んでいる一方で，ΔS に関しては十分には解明されていなかった。本研究により，補欠分子族として含まれるヘムの側鎖として存在する 17-プロピオン酸基の電離状態が ΔS 調節に寄与することが初めて明らかにされた。

ヘムに側鎖として結合しているプロピオン酸基 2 つのうち，溶媒に露出している 13-プロピオン酸基の電離平衡の p*K*a は約 4 であり，タンパク質内部の比較的疎水性の環境に存在している 17-プロピオン酸基の p*K*a は約 6 である。本研究では，ヘムの 17-プロピオン酸基近傍のアミノ酸残基を置換して，17-プロピオン酸基が関わる分子内水素結合ネットワークや疎水性環境を変えることにより p*K*a を系統的に調節し，そのことが *Em* 調節にどのように反映されるかが解析された。まず，分子内水素結合の有無が 17-プロピオン酸基の p*K*a に与える影響としては，水素結合形成のための水素供与体をアミノ酸置換で新たに導入すると p*K*a が低下し，既存の水素供与体が取り除かれることにより p*K*a が上昇することが明らかとなった。また，X 線結晶構造解析により，アミノ酸置換で導入した新たな水素供与体が実際にヘム 17-プロピオン酸基と分子内水素結合を形成していることが実証されると共に，17-プロピオン酸基近傍のアミノ酸置換はタンパク質全体の立体構造にはほとんど影響を与えないことも明らかになった。一方，17-プロピオン酸基の p*K*a と疎水性環境との関係に関しては，疎水性の増大に伴い p*K*a は大きくなることが明らかとなった。このようにして，本研究では，17-プロピオン酸基の p*K*a が系統的に異なる一連の変異体が調製され，17-プロピオン酸基の p*K*a と *Em* との関係が詳細に解析された。

調製された一連の変異体について，*Em* を計測すると共に，その温度依存性や pH 依存性が解析され，*Em* の温度依存性から熱力学量（ΔH と ΔS）を，*Em* の pH 依存性から酸化型および還元型シトクロム *c* の 17-プロピオン酸基の p*K*a をそれぞれ求めた。変異体の一つ E43Y の pH 6.0 における ΔS は -92 ± 3 $JK^{-1}mol^{-1}$ であり，PA の -69 ± 3 $JK^{-1}mol^{-1}$ とは著しく異なる値を示した。酸化型および還元型の E43Y と PA における 17-プロピオン酸基の p*K*a（酸化型 / 還元型）は，それぞれ，$5.0 \pm 0.2/6.0 \pm 0.2$，$6.0 \pm 0.2/7.0 \pm 0.2$ であることが示された。したがって，pH 6.0 では，これらのタンパク質の 17-プロピオン酸基の電離状態が，タンパク質の酸化 / 還元に伴って変化することになる。この電子の授受に伴う 17-プロピオン酸基の電離状態の変化は，ΔS を調節する構造化学的因子の一つであると考えられ，17-プロピオン酸基の p*K*a が ΔS の寄与を通して *Em* を調節するという作業仮説が成立すると考えられた。この作業仮説は，本研究で調製された 17-プロピオン酸基の p*K*a が系統的に異なる一連の変異体の研究から実証された。このように，本研究では，シトクロム *c* の *Em* 決定に寄与する ΔS を調節する構造化学的因子の一つを初めて明らかにすると共に，シトクロム *c* の *Em* を ΔS の変化を通して，タンパク質工学により調節するための方法論を明らかにすることに成功した。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文では，緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* シトクロム c_{551} と好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* シトクロム c_{552} の詳細な比較研究を通して，ヘム 17-プロピオン酸基の p*K*a がシトクロム *c* の酸化還元電位の決定に寄与する ΔS を調節する構造化学的因子の一つであることを明らかにした。また，ヘム 17-プロピオン酸基の分子内水素結合ネットワークや疎水性環境を近傍のアミノ酸残基を置換することにより，17-プロピオン酸基の p*K*a を系統的に変える方法を開発すると共に，X 線結晶構造解析により，17-プロピオン酸基近傍のアミノ酸置換はタンパク質全体の立体構造にはほとんど影響を与えないことを実証した。以上の知見は，生体分子の機能と構造との相関関係を解明する研究に役立つだけでなく，シトクロム *c* 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。