

氏名(本籍)	柴田友和(京都府)		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第6008号		
学位授与年月日	平成24年3月23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	Quantitative characterization of relationship between heme electronic structures and functional properties of myoglobin and hemoglobin (ミオグロビンおよびヘモグロビンのヘム電子構造とタンパク質機能の相関関係の定量的研究)		
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	大塩寛紀
副査	筑波大学教授	工学博士	小島隆彦
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、筋肉中に存在する酸素 (O_2) 貯蔵タンパク質ミオグロビン (Mb) および赤血球中に存在する酸素運搬タンパク質ヘモグロビン (Hb) の機能調節機構を解明する研究を行い、活性中心であるヘムの電子構造、特にヘム鉄の電子密度がこれらタンパク質の機能の調節に重要な構造化学的因子であることを初めて明らかにした。本研究のアプローチの独創性は、ヘム鉄の電子密度を大きくかつ系統的に変化させるためにヘム側鎖として強い電子求引基であるトリフルオロメチル基を一つ、または二つもつフッ素化ヘムをそれぞれ合成し、Mb に導入した再構成タンパク質を調製したこと、そして、Mb のヘム鉄原子の電子密度を半定量的に反映する指標を見いだしたことである。Mb の O_2 親和性は、ヘム鉄の電子密度の減少に伴い低下する一方で、一酸化炭素 (CO) 親和性はヘム鉄の電子密度の変化にはほとんど影響を受けないことが示され、Mb における O_2 と CO の識別は、ヘム鉄原子の電子密度の変化を通して行われることが明らかになった。さらに、ヘム鉄の電子密度の減少は、Mb のヘム鉄の自動酸化反応を遅くすることも明らかになった。

本研究で構築した Mb や Hb などのヘムタンパク質研究の新しいアプローチの一つであるヘム鉄の電子密度の評価法は、酸化型ヘムタンパク質のヘム鉄に結合した水分子の電離平衡反応の平衡定数 (pKa) に基づいて行われる。ヘム鉄の電子密度が減少 (増大) すれば、ヘム鉄に結合した水分子の酸素原子の電子密度も減少 (増大) するので、pKa が低下 (上昇) することを利用する手法である。本研究で調製された一連のフッ素化ヘムを含む再構成 Mb で観測された pKa は、予想通り、トリフルオロメチル基1つの導入に伴って約1低下することが示された。また、トリフルオロメチル基の導入によるヘム鉄の電子密度の減少は、密度汎関数法による計算化学でも確認された。

次に、ヘム鉄原子の電子密度を系統的に変化させた一連のヘムを含む Mb の O_2 親和性を評価するために、Mb の50%が O_2 と結合する酸素分圧である P_{50} を測定したところ、Mb のヘム鉄の電子密度を反映する pKa と O_2 親和性を反映する $\log(P_{50})$ の間には良好な直線関係が成立することが明らかとなった。得られた関係式から、ヘム側鎖へのトリフルオロメチル基一つの導入に伴い O_2 親和性は約1/2.7に低下することが明らか

となった。さらに、 O_2 結合と解離の反応速度を測定した結果、ヘム鉄の電子密度の減少による O_2 親和性の低下は、解離反応速度の増大に起因することが明らかになった。一方、Mb の CO 親和性は、 O_2 結合の場合とは異なり、ヘム鉄の電子密度の変化の影響をほとんど受けないことは示された。したがって、ヘム鉄の電子密度の変化は、 O_2 親和性に与える影響を通して、Mb の O_2 と CO の識別を調節することが明らかになった。

さらに、様々な分光法や計算化学を駆使した解析により、ヘム鉄の電子密度の変化は、Mb におけるヘム鉄と外部配位子との結合およびヘム鉄に結合した配位子と近傍のアミノ酸残基ヒスチジンとの水素結合にも影響を及ぼすことが明らかになった。また、Mb はヘム鉄が Fe^{2+} の場合のみ O_2 と結合することができるが、 O_2 と結合した Fe^{2+} には自動酸化が起これり Fe^{3+} が生じて Mb は O_2 と結合できなくなる。この自動酸化反応速度が、ヘム鉄の電子密度の減少に伴って遅くなることを明らかにした。さらに、Hb におけるサブユニット間相互作用により、天然のヘムがもつビニル基側鎖の π 電子系のヘムポルフィリン環 π 電子系に対する配向が変わることで、ヘム鉄の電子密度が変化することを示唆する実験結果を得ることに成功した。このように、ヘム鉄の電子密度はヘムタンパク質の機能調節に重要であることが明らかになった。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文では、酸素貯蔵タンパク質ミオグロビンや酸素運搬タンパク質ヘモグロビンの機能とヘム電子構造の関係を詳細かつ定量的に解析する研究を行い、ヘム鉄の電子密度がこれらヘムタンパク質の機能調節に重要な役割を担っていることを初めて明らかにした。ミオグロビンの酸素親和性、外部配位子識別、および自動酸化は、ヘム鉄の電子密度を通して調節されることが実証され、分子の立体構造の解明以来半世紀以上も未解決であったミオグロビンのこれら機能調節の分子機構が初めて明らかになった。本研究により得られた知見の大部分は、ヘムタンパク質のみならず多種多様な生体高分子における機能調節機構の理解にも一般化できる内容であり、新規生体分子を創製するための分子設計指針として役立つことが期待される。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、生物化学、生体分子科学の研究分野の発展に貢献する価値の高い論文である。

平成 24 年 2 月 14 日、数理物質科学研究科学位論文審査委員会において審査委員の全員出席のもと、著者に論文について説明を求め、関連事項につき質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって、合格と判定された。

上記の論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、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。