

Title	Elucidation of Functional Roles of Heme-Propionate Side Chains in Hemoproteins
Author(s)	Harada, Katsuyoshi
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/23442
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	原 田 勝 好
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 22000 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 工学研究科応用化学専攻
学位論文名	Elucidation of Functional Roles of Heme-Propionate Side Chains in Hemoproteins (ヘム蛋白質におけるヘムプロピオン酸側鎖の機能的役割解明)
論文審査委員	(主査) 教授 林 高史 (副査) 教授 大島 巧 教授 平尾 俊一 教授 桑畑 進 教授 宇山 浩 教授 今中 信人 教授 安藤 陽一 教授 田川 精一

論文内容の要旨

本論文は、ヘム蛋白質におけるヘムプロピオン酸側鎖の機能的役割解明に関する研究成果をまとめたものであり、序論、本章 4 章、及び総括から構成されている。

第 1 章では、酸素貯蔵ヘム蛋白質であるミオグロビンのヘムプロピオン酸側鎖の機能的役割を検討する目的で、プロピオン酸側鎖欠損ヘム（片足ヘム）を合成し、片足ヘムがミオグロビンのヘムポケットに正常に挿入され、安定に保持され得ることを明らかにした。また、プロピオン酸側鎖はミオグロビンに対するヘムの親和性の 10~15% に寄与するという実験的な根拠を得た。

第 2 章では、ミオグロビンで 6 位プロピオン酸側鎖欠損により酸素解離、自動酸化の加速が観測されたことから、6 位プロピオン酸側鎖は Arg45 を介し酸素の安定化に重要な His64 と水素結合ネットワークを形成することにより、酸素錯体の安定化に寄与していると結論した。また、7 位プロピオン酸側鎖欠損により、共鳴ラマンで Fe-His93 結合定数の増加が観測された。その影響で、Fe から CO への π -back donation の増大、CO 結合の加速、CO 解離の減速が認められた。これらの結果から、7 位プロピオン酸側鎖は Ser92 を介し、His93 と水素結合ネットワークを形成し His93 のヘム鉄への配位を制御していると結論した。

第 3 章では、*d*-カンファーの水酸化触媒として機能するモノオキシゲナーゼシトクロム P450cam において、第一電子伝達反応の解析から 6 位プロピオン酸側鎖欠損により電子伝達蛋白質 Pdx の親和性が低下することを明らかにした。即ち、6 位プロピオン酸側鎖は Pdx の結合部位の Arg112 と相互作用し Pdx の適した結合に寄与していると結論した。また、6 位プロピオン酸側鎖欠損により Fe-S 結合が不安定化し、不活性な P420 体へと変化し易くなる事を見出し、6 位プロピオン酸側鎖と周辺のアミノ酸の相互作用は、P450cam の活性を維持するのに重要であると結論した。

第 4 章では、シトクロム P450cam で、7 位プロピオン酸側鎖欠損により基質の親和性が大幅に低下し、低スピン種の存在が優勢となることを UV-vis 及び共鳴ラマンスペクトルから見出した。それに伴い、ヘムが低スピンから高スピン状態へと変化した後に起こる第一電子伝達過程の大幅な減速が観測され、基質水酸化活性が野性型酵素の約

1/50 に低下した。結晶構造解析の結果、7位プロピオン酸側鎖欠損により蛋白質外部から基質結合部位へ連なる水分子アレイが観測された。以上の結果より、7位プロピオン酸側鎖とアミノ酸残基 (Asp297、Arg299) との相互作用が、活性中心から蛋白質外部へ水分子を排除するための水分子チャネルのゲートとなり、一方、外部からの水分子の進入を遮断する役割を果たしていることを示した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、ヘム蛋白質におけるヘムプロピオン酸側鎖の機能的役割解明に関する研究成果をまとめたものである。主な結果を要約すると以下の通りである。

1. 酸素貯蔵ヘム蛋白質であるミオグロビンのヘムプロピオン酸側鎖の機能的役割を検討する目的で、プロピオン酸側鎖欠損ヘム (片足ヘム) を合成し、片足ヘムがミオグロビンのヘムポケットに正常に挿入され、安定に保持され得ることを明らかにしている。また、プロピオン酸側鎖はミオグロビンに対するヘムの親和性の 10~15% に寄与するという実験的な根拠を得ている。
2. ミオグロビンで、6位プロピオン酸側鎖欠損により酸素解離、自動酸化の加速を観測し、6位プロピオン酸側鎖は、酸素錯体の安定化に寄与していることを実験的に明らかにしている。また、7位プロピオン酸側鎖欠損ミオグロビンで、共鳴ラマンで Fe-His93 結合定数の増加、IR で Fe から CO への π -back donation の増大、速度論的解析で CO 結合の加速、CO 解離の減速を観測し、7位プロピオン酸側鎖は His93 のヘム鉄への配位を制御していることを明らかにしている。
3. *d*-カンファアの水酸化触媒として機能するモノオキシゲナーゼシトクロム P450cam において、6位プロピオン酸側鎖欠損により電子伝達蛋白質 Pdx の親和性が低下することを見出し、6位プロピオン酸側鎖は Pdx の結合部位の Arg112 と相互作用し、Pdx の適した結合に寄与することを明らかにしている。また、6位プロピオン酸側鎖欠損により Fe-S 結合が不安定化し、不活性な P420 体へと変化する事を見出し、6位プロピオン酸側鎖と周辺のアミノ酸の相互作用は、P450cam の活性を維持するのに重要であると結論している。
4. シトクロム P450cam で7位プロピオン酸側鎖欠損により基質の親和性が大幅に低下し、低スピン種の存在が優勢となることを見出し、それに伴い、ヘムが低スピンから高スピン状態へと変化した後に起こる第一電子伝達過程の速度と、基質水酸化反応速度が大幅に減速することを明らかにしている。結晶構造解析の結果も併せて、7位プロピオン酸側鎖は活性中心から蛋白質外部へ水分子を排除するための水分子チャネルのゲートとなり、一方、外部からの水分子の進入を遮断する役割を果たしていることを実験的に示している。

以上のように、本論文はミオグロビンとシトクロム P450cam において、ヘムプロピオン酸側鎖はヘムを蛋白質マトリクス内に固定化する役割のみならず、蛋白質機能にも重要な役割を果たしていることを実験的に明らかにしている。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。