The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Structure-Function Relationship of the Engineered Diiron Active Site in the Hemerythrin-like Domain of a Bacterial Chemotaxis Protein
Author(s)	岡本, 泰典
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34481
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　岡本　泰典　　）	
論文題名	Structure-Function Relationship of the Engineered Diiron Active Site in the Hemerythrin-like Domain of a Bacterial Chemotaxis Protein (微生物由来走化性タンパク質のヘムエリスリン様ドメインにおける二核鉄中心の改変とその構造機能相関に関する研究)

論文内容の要旨

多様な機能を発現する多核金属タンパク質は生物学的な観点だけでなく実用的な観点からも魅力的であるが、反応性および構造の複雑性からその構造・機能変換は困難とされている。本論文では、多核金属タンパク質の構造・機能変換をめざし、二核鉄金属タンパク質の金属中心の改変と構造機能相関について記述した。本研究では、多様な機能を示すが、構造的特徴に類似性が見られる二核鉄タンパク質群に着目し、その中でも単純な構造であるヘムエリスリン (Hr) 様ドメインDcrH-Hrを研究対象として選択した。金属中心近傍のアミノ酸残基を利用することで困難とされている多核金属中心の改変を達成し、種々の測定によって金属中心の構造と反応性について評価した。

まず、第一章では、金属中心の改変に先立ち、DcrH-Hrの機能的特徴について記述した。酸素運搬体であるHrと同じ二核鉄構造を有するにも関わらず、DcrH-HrはHrよりも高い酸素親和性と速い自動酸化過程を有することを明らかとし、DcrH-Hrは酸素運搬体よりも酸素センサーとして適していることを示した。さらに、Hrにおいて単離することが困難な二核鉄中心の混合原子価状態がDcrH-Hrでは安定に存在することを見出し、その結晶構造を明らかとした。HrとDcrH-Hrとの機能の違いは、二核鉄中心近傍の空間が密なHrには見られない大きな疎水性の空孔がDcrH-Hrの二核鉄中心近傍には存在するため、酸素分子や水分子の二核鉄中心へのアクセスが容易なことに起因する可能性を示した。

次に第二章では、DcrH-Hrの二核鉄第一配位圏の改変を狙い、二核鉄中心近傍のIle119をGluへと置換したI119E変異体の構造と機能について記述した。結晶構造解析から、二核鉄中心の新たな配位子としてGlu119が導入されていることを確認した。さらに各種分光測定から、Glu119の二核鉄中心への配位をpH依存的にコントロールすることが可能であり、酸素や還元剤と二核鉄中心の反応性もGlu119の二核鉄中心への配位によって変化することを明らかとした。 このように非配位性のアミノ酸残基を積極的に配位性アミノ酸残基へと置換することで、困難とされる二核鉄中心の第一配位圏の改変が可能であることを示した。

タンパク質の機能変換をめざし、第三章では、Ile119をHisへと置換したI119H変異体において、新たに発現された過酸化水素存在下での外部基質の酸化反応について述べた。 結晶構造解析、振動分光測定およびDFT計算から、I119H変異体には二つの構造が存在することを示しており、二核鉄第二配位圏に変異導入したHis119が二核鉄中心に結合した外部配位子に対して水素結合の提供可能な構造の時に酸化活性が発現するメカニズムを提唱した。 第二配位圏の改変によってHrタイプの二核鉄中心の元来有する酸素結合能から外部基質の酸化能へと機能変換が可能であることを示した。

最後に結言にて、第一章から第三章で記述した、直接的に金属中心を構成していない環境・空間に着目した多核金属タンパク質の構造・機能変換、即ち金属タンパク質の新しい分子工学的手法について総括し、今後の期待される展開について記述した。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　岡本　泰典　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	（教授）	林　高史
	副 査	（教授）	桑畑　進
	副 査	（教授）	井上　豪
	副 査	（教授）	南方　聖司
	副 査	（教授）	今中　信人
	副 査	（教授）	宇山　浩
	副 査	（教授）	平尾　俊一
	副 査	（教授）	町田　憲一
	副 査	（教授）	安藤　陽一
	副 査	（教授）	古澤　孝弘

論文審査の結果の要旨

多様な機能を発現する多核金属タンパク質は生物学的な観点だけでなく実用的な観点からも魅力的であるが、反応性および構造の複雑性からその構造・機能変換は困難とされている。本論文では、多核金属タンパク質の構造・機能変換をめざした二核鉄金属タンパク質の金属中心の改変とその構造機能相関について記述されている。本研究では多様な機能を示すが、構造的特徴に類似性が見られる二核鉄タンパク質群に着目し、その中でも単純な構造であるヘムエリスリン (Hr) 様ドメイン DcrH-Hr を研究対象としている。金属中心近傍のアミノ酸残基を利用することで困難とされている多核金属中心の改変を達成しており、種々の測定によって金属中心の構造と反応性について評価している。

第一章では、DcrH-Hr の機能的特徴について述べている。酸素運搬体である Hr と同じ二核鉄構造を有するにも関わらず DcrH-Hr は Hr よりも高い酸素親和性と速い自動酸化過程を有することを明らかとし、DcrH-Hr は酸素運搬体よりも酸素センサーとして適していることを示している。さらに、Hr において単離することが困難な二核鉄中心の混合原子価状態が DcrH-Hr では安定に存在することを見出し、その結晶構造の解析も行っている。これらの DcrH-Hr と Hr との機能の違いについて、二核鉄中心近傍の空間が密な Hr には見られない DcrH-Hr に特有の大きな疎水性の空孔に着目して議論している。

第二章では、DcrH-Hr の二核鉄第一配位圏の改変を狙い、二核鉄中心近傍の Ile119 を Glu へと置換した I119E 変異体の構造と機能について論じている。結晶構造解析から、二核鉄中心の新たな配位子として Glu119 の導入を確認している。各種分光測定から、Glu119 の二核鉄中心への配位を pH 依存的にコントロールすることが可能であり、酸素や還元剤と二核鉄中心の反応性も Glu119 の二核鉄中心への配位によって変化することを明らかとしている。 このように非配位性のアミノ酸残基を積極的に配位性アミノ酸残基へと置換することで困難とされる二核鉄中心の第一配位圏の改変が可能であることを示している。

第三章では、Ile119 を His へと置換した DcrH-Hr の I119H 変異体において、過酸化水素存在下では本来示さない外部基質の酸化能の付与を達成している。 結晶構造解析、振動分光測定および DFT 計算から、I119H 変異体には二つの構造が存在することを見いだし、二核鉄第二配位圏に変異導入した His119 が二核鉄中心に結合した外部配位子に対して水素結合の提供可能な構造の時に酸化活性が発現するメカニズムを提唱している。Hr 型二核鉄中心の第二配位圏の改変によって、本来有する酸素結合能から外部基質の酸化能へと機能変換が可能であることを示している。

以上のように、本論文では直接的に金属中心を構成していない環境・空間に着目することで、困難とされる多核金属タンパク質の分子工学を達成している。

よって本論文は博士論文として十分に価値あるものと認める。