



Title	ミオグロビンを構造基盤とした機能性ヘムタンパク質の構築
Author(s)	清田, 浩平
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49188
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名 きよ 清 た 田 こう 浩 へい 平

博士の専攻分野の名称 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 第 2 1 9 4 7 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

薬学研究科分子薬科学専攻

学 位 論 文 名 ミオグロビンを構造基盤とした機能性ヘムタンパク質の構築

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 宇野 公之

(副査)

教 授 田中 徹明 教 授 今西 武 教 授 小林 資正

論 文 内 容 の 要 旨

近年、分子生物学や構造生物学を初めとする学問領域の発展により、新規機能を担うタンパク質が次々と発見され、それらの詳細な立体構造や機能が解明されつつある。このような状況のなか、これまで蓄積された構造情報を基にタンパク質をデザイン・機能改変し、有用な人工タンパク質を創製することが注目されるようになった。本研究では、ヘムタンパク質に着目し、ミオグロビンを構造基盤として酸化活性を持つ人工タンパク質の構築を試みた。

生体中には、活性中心にヘム（鉄ポルフィリン錯体）を共通に含む一群のタンパク質が存在し、これらはヘムタンパク質と総称される。ヘムタンパク質はヘムの持つ酸化還元能を巧みにコントロールして種々の反応を触媒したり、ガス分子の感知や輸送などの多様な機能を発現している。このことから、ヘムタンパク質を人工タンパク質の創製基盤として利用すれば、金属を持たないタンパク質にはできないユニークな活性を構築できる可能性がある。

著者は、人工タンパク質に与える機能として特に酸化反応触媒活性に注目した。酸化反応は応用範囲が広く、アルカン類や芳香族などの不活性な基質を人工タンパク質によって容易に酸化できれば、環境負荷や激しい反応条件を伴わないクリーンかつマイルドな触媒になると考えられる。天然のヘムタンパク質をそのまま酸化触媒として利用するのはコスト的に不利であるとともに、既存の酵素反応しか行えないことから、人工ヘムタンパク質の創製には大きな利点がある。

これまでの報告から、ヘムタンパク質の機能の差異はヘム鉄の配位子を含めたヘムを取り巻くアミノ酸の違いに由来することが明らかとなっている。このことから、蓄積された構造情報や機能情報を基にアミノ酸変異をヘム周辺へ導入すれば、機能性人工ヘムタンパク質の創製が可能であると考えられる。

著者は酸素運搬貯蔵能を担うミオグロビンを機能改変の基盤骨格として利用することを考えた。ミオグロビンは非常に単純で安定な構造を持つ。また、すでに大量発現系が確立され、立体構造情報を初めとする過去からの膨大な研究データが蓄積されていることから、人工ヘムタンパク質の構造基盤としての条件を満たす。しかし、ミオグロビンのヘムポケットの構造は酸素分子の結合に適しているため、そのまま利用して酸化活性を付与することは難しい。そこで著者が所属する研究室で調製された、ヘムポケットの位置を逆転させたミオグロビン変異体 H64V/V68H/H93A/H97F (VHAF) に着目し、VHAF を鋳型に 97 位の His を Ala にかえた H64V/V68H/H93A/H97A (VHAA) を調製した。4 重変異体 VHAF、VHAA の近位側ヘムポケットは、野生型 (WT) の遠位側ヘムポケットに比べて広く、より自由に活性部位周辺の環境を改変できる可能性が高い。

ヘムポケットが逆転しているため、4重変異体ではヘムポケットの物性が変化していると考えられる。そこでまず、分光学的手法を用いてヘム配位環境について評価した。紫外可視吸収スペクトル及び共鳴ラマンスペクトルの結果から、VHAFとVHAAのヘムは酸化型では6配位高スピン構造、還元型では5配位高スピン構造を示すことがわかった。WTと同じ構造特性を有することから、近位側にヘムポケットが構築できたことが示された。また、近位側ヘムポケットの周辺は、WTでは存在した遠位Hisがないために疎水性の高い環境となっていることがわかった。さらに、VHAFとVHAAではWTよりヘムの保持能が低下していることがわかった。

次に外来性配位子結合能を評価した。ミオグロ빈はもともと酸素を結合・保持する機能を有し、酸素と同様の二原子からなるCOやCN⁻にも高い親和性を示す。ミオグロ빈に4重変異を施して近位側にヘムポケットを構築したことで、これら外来性配位子に対する結合能が変化している可能性が高い。解離定数を測定した結果、COはWTよりVHAFやVHAAに対して結合しやすいことが明らかになった。一方、CN⁻はWTに対してより高い親和性を示したが、これは4重変異体のヘム鉄周辺にHisがないためにHCNの脱プロトン化が効率的におこなわないためだと考えられた。

さらに、4重変異体のペルオキシダーゼ活性を測定した。ペルオキシダーゼは代表的なヘム酵素の一つで、安価な過酸化水素を用いて様々な物質の酸化反応を触媒する。ミオグロ빈とペルオキシダーゼはヘム鉄にHisが配位している点で類似しており、事実WTミオグロ빈は弱いながらもペルオキシダーゼ活性を示す。溶媒のアクセスしやすいヘムポケットを持つ4重変異体はWTより高いペルオキシダーゼ活性を示す可能性があるため、両者を比較した。グアヤコールを基質として用いたところ、VHAFとVHAAのKmはWTに比べて約50倍に、Vmaxは約2倍～5.5倍に上昇し、結果的にペルオキシダーゼ反応の回転数がVHAFでは約95倍に、VHAAでは約240倍に上昇した。したがって、近位側にヘムポケットを持つ4重変異ミオグロ빈は、基質がヘムポケットへアクセスするのに有利な構造を持つことが示された。

最後に、4重変異体の構造的特徴を理解し、人工タンパク質の構造基盤として今後さらに利用するため、VHAFのX線結晶構造解析を行った。その結果、VHAFは近位側に水分子が配位した6配位型ヘムを含み、ヘムポケットが形成されていることがわかった。また、WTと比べてVHAFはヘムが約40度と大きく傾いた構造を形成し、そのためにヘムポケットが溶媒側へ大きく開いていることが明らかとなった。しかしながら、このような大きな構造変化にもかかわらずグロビンフォールドは依然として保持されていたことから、グロビンフォールドはきわめて安定であるとともに、タンパク質内部でのヘムの配置に大きな自由度を与えうることが明らかとなった。

以上のことから、近位ヘムポケットを持つミオグロ빈変異体は、ヘムタンパク質の新規機能構築のための基盤骨格として利用価値の高い構造をもつことがわかった。本研究で得られた知見は、新たな機能を持つ人工ヘムタンパク質の開発に寄与するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

近年の遺伝子工学や構造生物学の隆盛により、遺伝子操作技術とタンパク質立体構造情報を基礎として、有用な機能を備えた人工タンパク質を発現・構築することが可能になりつつある。このような背景のもと、本研究では頑強な骨格構造を持つミオグロ빈を骨組みとして用い、活性中心に含まれるヘムを利用して、有機分子に対する酸化活性を示す新規タンパク質の構築を試みた。ミオグロ빈は本来小分子である酸素を結合・貯蔵する機能を担っているため、種々のサイズを持つ有機分子を結合・酸化するための空間を所持していない。そこでまず、ヘム面の酸素が結合する側（遠位側）にある狭い空間ではなく、溶媒側により近くて有機分子が接近しやすいと考えられる側（近位側）に広い空間を構築することを試みた。

近位側からヘム鉄に配位するHis93及び近傍のHis97を側鎖体積の小さなAlaに置換して空間を構築する一方、もともと空間があった遠位側にはヘム鉄に配位可能なHisを配置することにより、安定なミオグロ빈変異体を調製することができた。この標品を用いてグアヤコールに対する酸化活性を測定したところ、野生型ミオグロ빈に比べて100倍以上の活性を示すことがわかった。解析を進めた結果、この原因はミカエリス定数の低下にあることが明ら

かとなり、基質となる有機分子に対する結合親和性が期待通り上昇していることがわかった。

X線結晶構造解析を行った結果、この変異体は野生型ミオグロビンと同様の立体構造を保っていることが明らかとなった。しかしながら、変異体では巨大な分子であるヘムがタンパク質内で約 40 度傾き、遠位面のほぼ全面を溶媒に向けているという驚くべき構造を持つことがわかった。この知見は、ミオグロビンの骨格構造がきわめて安定であることを示すとともに、ヘム面の傾きを利用した新規機能を付加できる可能性を示すものである。

以上の結果は人工タンパク質の構築に対してきわめて有用な知見を与えるものであり、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいと判断した。