The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Myoglobin reconstituted with cobalt corrinoids as a model of cobalamin-dependent methyltransferase
Author(s)	森田, 能次
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/55924
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　（　森田　能次　）	
論文題名	Myoglobin reconstituted with cobalt corrinoids as a model of cobalamin-dependent methyltransferase （コバルトコリノイド錯体含有ミオグロビンを用いたコバラミン依存型メチル基転移酵素のモデル研究）

論文内容の要旨

金属酵素は、種々の金属錯体あるいは金属イオンを補欠分子として、水中、常温、常圧という温和な条件下で、高効率に様々な物質変換を支援している。　なかでも、生体内で安定なコバルト–炭素結合を生成するコバラミンを補欠分子として有するメチオニン合成酵素は、代謝に関わるメチル基転移反応を加速する触媒であることが知られている。しかしながら、タンパク質部分が巨大かつ、補欠分子の分子構造が複雑であるため、反応中間体であるコバルト１価種の構造やタンパク質内でのメチル基転移反応の詳細なメカニズムは完全には理解されていない。

以上の研究背景から、本著者は酵素のタンパク質部分を含めたモデル化をめざし、タンパク質の効果を考慮した酵素モデルを構築し、反応中間体であるコバルト１価種の構造解析（第一章）及び、メチオニン合成酵素の反応機構解明を実施した（第二章、第三章）。

第一章では、コバラミンのモデル錯体であり、コバルト１価種が比較的安定なコバルトテトラデヒドロコリンの合成を行った。　次に、結晶構造解析が容易かつメチオニン合成酵素と類似の配位環境を有するミオグロビンから天然ヘムを取り除いたアポタンパク質に、合成したコバルト錯体を挿入することで、酵素モデルを構築した。　さらに、コバルト２価種から１価種への還元反応及び、両者の酸化状態の結晶構造を明らかにし、コバルト１価種が４配位構造であることを結晶構造学的に実証した。

第二章では、第一章で得られたコバルト１価種にヨードメタンを添加し、タンパク質内でメチル錯体の生成を試みた。　さらに、生成したメチル錯体のメチル基は室温でヘムポケット内のヒスチジンへ転移することを見出した。　理論計算から、これまでに提唱されている協奏的な反応機構よりも、ヒスチジン軸配位子が脱配位した５配位構造の中間体を経由する反応機構の方が、より優位に反応が進行することを突き止めた。

第三章では、不安定なメチル錯体のモデルとして、より安定なアクア及びシアノコバルト３価錯体を含む再構成ミオグロビンを新たに調製し、X線結晶構造及び配位挙動を詳細に評価した。　シアノコバラミンと比較すると、調製したシアノ錯体のコバルトー軸配位子の結合距離が長いことから、実際の酵素では、メチル基転移反応を加速させる５配位構造の中間体の生成が促進されている可能性を提唱した。

以上のように、酵素のタンパク質部分を含めたモデル化を実施し、ヒスチジンの配位・脱配位がメチオニン合成酵素の多段階の反応を制御していることを明らかにした。　今後、本研究で得られた知見は、巨大かつ複雑なメチル基転移酵素の反応メカニズムの解明と、新たな生体類似触媒の創製に大いに貢献することを述べた。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　森田　能次　）			
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	櫻井　英博
	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	町田　憲一
	副 査	教授	古澤　孝弘

論文審査の結果の要旨

金属酵素は、種々の金属錯体あるいは金属イオンをコファクターとして、水中、常温、常圧という温和な条件下で、高効率に様々な物質変換を支援している。　なかでも、生体内で安定なコバルト–炭素結合を生成するコバラミンをコファクターとして有するメチオニン合成酵素は、代謝に関わるメチル基転移反応を加速させる触媒であることが知られている。　しかしながら、タンパク質部分が巨大かつ、補欠分子の分子構造が複雑であるため、反応中間体であるコバルト１価種の構造やタンパク質内でのメチル基転移反応の詳細なメカニズムは完全には理解されていない。

以上の研究背景から、本著者は酵素のタンパク質部分を含めたモデル化をめざし、タンパク質の効果を考慮した酵素モデルを構築し、反応中間体であるコバルト１価種の構造解析（第一章）及び、メチオニン合成酵素の反応機構解明を達成している（第二章、第三章)。

第一章では、まずコバラミンのモデル錯体であり、コバルト１価種が比較的安定なコバルトテトラデヒドロコリンの設計及び合成を行っている。　次に結晶構造解析が容易かつメチオニン合成酵素と類似の配位環境を有するミオグロビンに着目し、ミオグロビン中の天然ヘムをコバルトテトラデヒドロコリンと置換することで、酵素モデルを構築している。　さらに、コバルト２価種から１価種への還元反応及び、両者の酸化状態の結晶構造解析を実施し、コバルト１価種が４配位構造であることを結晶構造学的に実証している。

第二章では、第一章で得られたコバルト１価種にヨードメタンを添加することで、タンパク質内でメチル錯体の生成を達成している。　さらに、生成したメチル錯体のメチル基は室温でヘムポケット内のヒスチジンへ転移することを見出している。　理論計算から、これまでに提唱されている協奏的な反応機構よりも、ヒスチジン軸配位子が脱配位した５配位構造の中間体を経由する反応機構の方が、より優位に反応が進行することを突き止めている。

第三章では、不安定なメチル錯体のモデルとして、より安定なアクア及びシアノコバルト３価錯体を含む再構成ミオグロビンを新たに調製し、X 線結晶構造及び配位挙動を詳細に評価している。　シアノコバラミンと比較すると、調製したシアノ錯体のコバルト－軸配位子の結合距離が長いことから、実際の酵素では、メチル基転移反応を加速させる５配位構造の中間体の生成が促進されている可能性を提唱している。

以上のように、本論文は酵素のタンパク質部分を含めたモデル化を実施し、コバラミンの軸配位子であるヒスチジンの配位・脱配位がメチオニン合成酵素の多段階反応を制御している可能性を、実験的・理論的に提唱している。　本成果は、メチオニン合成酵素の反応機構の解明に大きく寄与するだけでなく、今後、メチル化を伴う生体触媒の開発設計に重要な指針を与えている。　よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。