

Title	Modified Hemoproteins with Artificial Interface on the Protein Surface for Biomolecular Complexation
Author(s)	永井, 宏和
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57459
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	なが い ひろ かつ 永 井 宏 和
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学位記番号	第 23785 号
学位授与年月日	平成22年3月23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	Modified Hemoproteins with Artificial Interface on the Protein Surface for Biomolecular Complexation (生体分子複合体形成を指向した化学修飾ヘムタンパク質に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教授 林 高史 (副査) 教授 桑畑 進 教授 井上 豪 教授 大島 巧 教授 今中 信人 教授 宇山 浩 教授 平尾 俊一 教授 町田 憲一 教授 安藤 陽一

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、ヘムタンパク質の化学修飾に立脚した新しい生体分子複合体の構築に関する研究成果をまとめたものであり、序論・総括を含む全4章で構成されている。

第1章は本論文の序論であり、研究の背景及び目的、戦略、概要について論じた。

第2章ではヘムタンパク質の一種であるミオグロビンと、ガラクトシド認識タンパク質であるピーナツレクチンによるタンパク質-タンパク質複合体形成をめざした。具体的にはヘムプロピオン酸末端に単糖（ガラクトース）が修飾されたグリコヘム1及び、二糖（ラクトビオン酸）が修飾されたグリコヘム2を合成し、アポミオグロビンに挿入することで、グリコヘム1再構成ミオグロビン（rMb(1)）及び、グリコヘム2再構成ミオグロビン（rMb(2)）をそれぞれ調製した。再構成ミオグロビンの糖ユニットが分子認識のインターフェイスとして機能することを、ピオチン-ストレプトアビジン沈殿法により定性的に確認し、詳しい結合挙動を蛍光消光法により観測した。ピーナツレクチンに対し、再構成ミオグロビンでは有為な結合挙動が観測され、二糖を有するrMb(2)の方が単糖を有するrMb(1)よりも強い相互作用を示した。また、その結合定数は 10^4 M⁻¹オーダーと算出された。次いで、ハイスループットスクリーニングを指向した実験系として、マイクロプレートアッセイにてその相互作用を評価したところ、蛍光消光法の実験結果と一致した。これらから、再構成ミオグロビンはピーナツレクチンと安定な複合体を形成し、糖の構造に依存したレクチンへの結合挙動を示すことが明らかとなった。

第3章では再構成法を駆使することで電子伝達ヘムタンパク質であるシトクロム b_{662} と、DNAの複合体形成をめざした。ヘムプロピオン酸末端に長さの異なる2種類のリンカーを介し、アンモニウム基を修飾し、カチオン部位を有する人工ヘム（アミノヘム）の合成をおこなった。アミノヘムをアポシトクロム b_{662} に挿入することで、カチオン部位を有するシトクロム b_{662} の構築を達成した。再構成シトクロム b_{662} のカチオン部位とDNAの相互作用を蛍光消光法にて確認したところ、再構成タンパク質では大きな蛍光の消光が観測され、有為な相互作用が確認でき

た。次いで、ゲルシフトアッセイにより詳しい評価をおこなった。野生型シトクロム h_{602} ではバンドのシフトが観測されないのに対し、再構成体では大きなバンドのシフトが観測された。これは蛍光消光法の実験結果と一致し、解離定数は 10^{-7} ~ 10^{-8} Mオーダーと算出された。また、水晶振動子マイクロバランス (QCM) 測定法にてタンパク質とDNAの相互作用を実験的にさらに裏付け、DNA 1 分子に対しおよそ 4 分子の再構成シトクロム h_{602} が結合していることを明らかとした。

第 4 章は本論文の総括であり、天然には見られない生体分子複合体形成において再構成法の有用性を結論づけた。

論文審査の結果の要旨

本論文は、ヘムタンパク質の化学修飾に立脚した新しい生体分子複合体構築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. ヘムタンパク質の一種であるミオグロビンと、ガラクトシド認識タンパク質であるビーナツレクチンによるタンパク質—タンパク質複合体形成をめざす目的から、ヘムプロピオン酸末端に単糖または、二糖が修飾された人工ヘム (グリコヘム) を合成し、アポミオグロビンに挿入することで、再構成ミオグロビンの調製を達成している。再構成ミオグロビンの糖ユニットが分子認識のインターフェイスとして機能することを、ピオチン—ストレプトアビジン沈殿法により定性的に確認し、詳しい結合挙動を蛍光消光法により観測している。再構成ミオグロビンでは、ビーナツレクチンに対し有為な結合挙動が観測され、二糖を有する再構成ミオグロビンの方が単糖を有する再構成ミオグロビンよりも、強い相互作用を示すことを明らかとしている。また、ハイスループットスクリーニングを指向した実験系として、マイクロプレートアッセイによりその相互作用を評価しており、その結果は蛍光消光法の実験結果と一致している。これらから、再構成ミオグロビンはビーナツレクチンと安定な複合体を形成し、糖の構造に依存したレクチンへの結合挙動を示すことを明らかとしている。
2. 電子伝達ヘムタンパク質であるシトクロム h_{602} と DNA の複合体形成をめざす目的から、ヘムプロピオン酸末端にアンモニウム基 (カチオン部位) を有する人工ヘム (アミノヘム) を合成し、アポシトクロム h_{602} に挿入することで、再構成シトクロム h_{602} の構築を達成している。再構成シトクロム h_{602} のカチオン部位と DNA の相互作用を蛍光消光法にて確認したところ、有為な相互作用が確認されている。次いで、ゲルシフトアッセイにより詳しい評価をおこなったところ、野生型シトクロム h_{602} ではバンドのシフトが観測されないのに対し、再構成体では大きなバンドのシフトが観測されている。また、QCM 測定にてタンパク質と DNA の相互作用を実験的にさらに裏付け、DNA 1 分子に対して、およそ 4 分子の再構成シトクロム h_{602} が結合していることを明らかとしている。

以上のように、本論文は有機合成化学的手法を駆使して、分子認識能を有するインターフェイスをタンパク質表面に構築し、天然には見られない新しい生体分子複合体の構築を達成している。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。