

Title	Modification of hexameric tyrosine-coordinated hemoprotein: Construction of an artificial light harvesting system by substitution of the heme cofactor and conversion to peroxidase by mutation of the cofactor-ligated amino acid
Author(s)	真島, 剛史
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69549
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏 名 (真 島 剛 史)	
論文題名	Modification of hexameric tyrosine-coordinated hemoprotein: Construction of an artificial light harvesting system by substitution of the heme cofactor and conversion to peroxidase by mutation of the cofactor-ligated amino acid (ヘムタンパク質環状六量体の機能改変：補因子置換による人工光捕集系の開発と軸配位子置換によるペルオキシダーゼ活性の発現)
論文内容の要旨	
<p>ヘムタンパク質は電子移動、酸素の貯蔵運搬、物質変換など生体内で様々な働きをしており、共通の補因子として鉄ポルフィリン（ヘム）分子を有している。近年、ヘムタンパク質の特性を活かした人工酵素の開発、超分子集合体の構築、およびタンパク質内あるいはタンパク質間での電子移動やエネルギー移動に関する研究が報告されている。またヘムタンパク質に関する研究は、学術的に興味深いだけでなく、将来的には物質変換やエネルギー生産への展開が期待されている。このような研究において、ヘムタンパク質を修飾・改変する手法探索が重要な課題となる。たとえば、プロトヘムIXを補因子として有するヘムタンパク質に着目すると、ヘム結合部位は、配位結合や水素結合、疎水性相互作用等により非共有結合的にヘム分子を保持している。ヘム分子を結合部位から取り除いたアポタンパク質は、種々の金属ポルフィリン類縁体をヘム結合部位に導入可能である。したがって、目的に応じて天然のヘムを人工的な補因子に置換することによって、新しい機能を有するヘムタンパク質の構築やヘムタンパク質の集積化につながる。以上の課題をもとに、本研究では次に示すヘムタンパク質に焦点を当て、補因子の置換および変異導入による機能改変を目指して研究を実施した。</p> <p>ヘムタンパク質の一つであるHexameric Tyrosine-coordinated Heme Protein (HTHP)は、2007年にDobbekらによって発見されたホモ六量体構造をもつタンパク質である。HTHPは海中のバクテリア中に存在するタンパク質であり、90 °Cを超える温度でも安定な構造を維持する耐熱性を示す。また、単量体で約9 kDa、六量体で約53 kDaと比較的小さなタンパク質であり、六つのヘム分子は中心の鉄分子間が1.8 nmの間隔でタンパク中に環状に整列している。</p> <p>第一章では、このHTHPのユニークな構造に着目し、環状の六量体構造を持つHTHPを色素集積の足場として用いることで、配向を固定した色素集積と調製の簡便性を両立した人工色素集積系の構築を実施した。具体的には、HTHPの六つのヘムを再構成法により光増感色素である亜鉛プロトポルフィリンIX (ZnPP)に置換し、色素がHTHPのヘム結合部位に特定の配向で固定、集積されている再構成タンパク質を調製、色素間のエネルギー移動について評価した。</p> <p>さらなる展開として、第二章では、光捕集能のさらなる向上を指向し、ZnPP置換HTHPへ複数種類の色素の集積化を試みた。具体的には、HTHPの表面にシステイン残基を変異導入し、そのシステイン側鎖末端のチオール基に対してマレイミド基を有する色素（ZnPPに対するドナーとして働くFluoresceinおよびアクセプターとして働くTexas Red）をカップリング反応を用いて結合させた。得られた色素集積体では、光捕集可能な波長範囲は可視光領域全域へと拡大し、光励起エネルギーの一分子への収集を確認した。さらに、集積化された色素間におけるエネルギー移動の機構と効率について種々の光化学測定より解明した。</p> <p>また、第三章では、HTHPの機能向上を目指して、HTHPのヘムに対する軸配位子に着目し、HTHPの軸配位子をチロシンからヒスチジンへと置換した変異体HTHPを調製した。UV-visスペクトル測定から、得られた変異体が、ヒスチジンが配位したヘムを持つことを確かめ、ABTSおよびGuaiacolを基質として用いることで、ペルオキシダーゼ活性の向上を確認した。加えて、二電子酸化反応であるチオアニソールの酸化反応に対しても、野生型と比較して、触媒回転数の向上が見られた。</p> <p>以上、本著者は、環状六量体構造を持つヘムタンパク質であるHTHPに着目し、人工光捕集系の開発とペルオキシダーゼ活性付与を達成した。本研究は、今後の効率的な人工光触媒や新規生体金属触媒の構築に大きく寄与するものである。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (真 島 剛 史)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	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 能木 雅也
	副 査	教 授 古澤 孝弘
論文審査の結果の要旨		
<p>ヘムタンパク質は電子移動、酸素の貯蔵運搬、物質変換など生体内で様々な働きをしており、共通の補因子として鉄ポルフィリン（ヘム）分子を有している。近年、ヘムタンパク質の特性を活かした人工酵素の開発、超分子集合体の構築、およびタンパク質内あるいはタンパク質間での電子移動やエネルギー移動に関する研究が報告されている。またヘムタンパク質に関する研究は、学術的に興味深いだけでなく、将来的には物質変換やエネルギー生産への展開が期待されている。以上の研究背景から、本著者は次に示すヘムタンパク質に焦点を当て、補因子の置換および変異導入による機能改変・向上を達成している。</p> <p>ヘムタンパク質の一つである Hexameric Tyrosine-coordinated Heme Protein (HTHP)は、2007年に Dobbek らによって発見されたホモ六量体構造をもつタンパク質である。HTHP は海中のバクテリア中に存在するタンパク質であり、90℃を超える温度でも構造変化を起こさない高い熱安定性を持つ。また、単量体で約 9 kDa、六量体で約 53 kDa と比較的小さなタンパク質であり、六つのヘム分子は中心の鉄分子間が 1.8 nm の間隔でタンパク中に環状に整列している。</p> <p>第一章では、ユニークな環状の六量体構造を持つ HTHP を色素集積の足場として用いることで、配向を固定した色素集積と調製の簡便性を両立した人工色素集積系の構築を実施している。具体的には、HTHP の六つのヘムを再構成法により光増感色素である亜鉛プロトポルフィリン IX (ZnPP)に置換し、色素が HTHP のヘム結合部位に特定の配向で固定、集積されている再構成タンパク質を調製し、さらに色素間のエネルギー移動について評価している。</p> <p>さらなる展開として、第二章では、光捕集能のさらなる向上を指向し、HTHP へ複数種類の色素の集積化を試みている。具体的には、HTHP にシステイン残基を変異導入し、マレイミドとチオールのカップリング反応を用いて、ZnPP に対してそれぞれドナーおよびアクセプターとなる色素である Fluorescein および Texas Red を導入している。得られた色素集積体において、捕集可能な波長範囲の可視光領域全域への拡大と、光励起エネルギーの一分子への収集を確認し、集積化された色素間におけるエネルギー移動の機構と効率を種々の光化学測定より解明している。</p> <p>また、第三章では、HTHP の機能向上を目指して、HTHP のヘムに対する軸配位子に着目し、HTHP の軸配位子をチロシンからヒスチジンへと置換した変異体 HTHP を調製している。UV-vis スペクトル測定から、得られた変異体が、His が配位した Heme を持つことを確かめ、ABTS および Guaiacol を基質として用いることで、ペルオキシダーゼ活性の向上を確認している。</p> <p>以上のように、本論文は、環状六量体構造を持つヘムタンパク質である HTHP に着目し、人工光捕集系の開発とペルオキシダーゼ活性付与を達成した。本研究は、今後の効率的な人工光触媒や新規人工生体触媒の構築に大きく寄与するものである。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。</p>		