

別紙 4

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 Finding of New Functions of Heme Proteins Based on Crystal Structures

(結晶構造を基にしたヘムタンパク質の新規機能の創出)

氏 名 白瀧 千夏子

論 文 内 容 の 要 旨

鉄は生物が生きていく上で必要不可欠な栄養素の一つである。例えば、種々の酵素の活性中心として機能しているヘム(鉄-プロトポルフィリン IX)は中心金属として鉄を含んでいる。ヘムを含有するタンパク質(ヘムタンパク質)は、活性中心が同一であるにも関わらずヘム近傍のアミノ酸の構造によって様々な機能を示すことから、酵素の構造と機能の関係を探る研究が数多く報告されてきた。そして、小型のヘムタンパク質であるミオグロビンがこのような研究においてヘムタンパク質のモデルとして使用され、本来は酵素としての機能を持たないミオグロビンをアミノ酸の置換により種々の酸化反応を行う酵素に変換する研究が行われてきた。しかし、ミオグロビンの変異体を用いた触媒的な芳香環水酸化反応はこれまで殆ど報告されていなかった。本研究では、ミオグロビン変異体を用いたメトキシナフタレンとナプロキセンの触媒的な芳香環水酸化反応を達成した。今回用いたミオグロビン変異体の中で 1-メトキシナフタレンの水酸化活性が最も高かったのは H64D 変異体であり、その活性は一分間あたり 23 回であった。また、H64D/T67R/V68I 変異体は H64D/V68I 変異体よりもナプロキセンに対する水酸化活性が高く、これは導入されたアルギニンが基質のカルボキシ基と相互作用することで、

基質の配向が制御されたことによると考えられる。1-メトキシナフタレンやナプロキセンの酸化反応では可視光領域に強い吸収を有する色素分子が生成するため、これらの反応は酵素反応活性を簡便に見積もる手法として有用である。

さらに本論文では、ヘム獲得タンパク質 HasA_p による人工金属錯体の捕捉と、人工金属錯体を結合した HasA_p の細胞への影響についても明らかにした。緑膿菌は鉄制限条件下で HasA_p と呼ばれるヘム獲得タンパク質を分泌することが知られている。分泌された HasA_p は宿主由来のヘムを捕捉し、このヘムを細胞の外膜に存在する特異的レセプターである HasR へと受け渡す。受け渡されたヘムは HasR 中を通過し、最終的には細胞質に輸送され、分解されて鉄分として利用されることが考えられている。本研究では、HasA_p がヘムとは形状の異なる人工金属錯体である鉄メソポルフィリン IX、鉄サロフェン、そして鉄フタロシアニンを捕捉可能であることを見出した。これらの人工金属錯体を結合した HasA_p の結晶構造の解析から、HasA_p がヘムと同様にこれらの人工金属錯体を結合できることが明らかになった。さらに、鉄イオンのキレート剤とヘムを結合した HasA_p、そして鉄フタロシアニンを結合している HasA_p を同時に添加した培地で緑膿菌を培養したところ、緑膿菌が増殖しないことを見出した。これは、鉄フタロシアニンを捕捉した HasA_p が緑膿菌のヘム獲得を阻害し、緑膿菌が鉄不足により増殖できなくなったことによると考えられる。緑膿菌は、多剤耐性菌の出現や、その院内感染が社会的な問題となっている細菌であり、抗生物質を用いない新しい緑膿菌の殺菌方法の開発が待ち望まれている。本研究成果は、鉄獲得阻害を利用した緑膿菌の殺菌方法の開発に繋がると期待する。