

博士学位論文審査要旨

2008年1月15日

論文題目： ポルフィリン/シクロデキストリン超分子系を用いたタンパク質機能制御に関する研究

学位申請者： 石田 善行

審査委員：

主査： 工学研究科 教授 加納 航治

副査： 工学研究科 教授 小寺 政人

副査： 工学研究科 教授 水谷 義

要旨：ポストゲノムの時代に入り、DNAの情報を基に作られるたんぱく質に関する科学に興味もたれている。そのうちで化学が関与できる分野に、たんぱく質機能の制御があげられる。このような分野はたんぱく質工学（プロテインエンジニアリング）あるいはケミカルバイオロジーに分類される。たんぱく質の改質の方法にはたんぱく質を構成するアミノ酸の一部をミューテーションにより、他のアミノ酸に変える方法がある。より化学的な方法として、たんぱく質に外部から人工物（エフェクター）を結合させて、たんぱく質の機能を変える方法がある。本論文では、後者の簡便な手法と超分子化学の概念とを利用して、たんぱく質機能制御を試みた結果が述べられている。

これまでも、水素結合や van der Waals 力を用いてエフェクターをたんぱく質に非共有結合で結びつける手法は、薬学の分野で広く用いられてきた。本研究では、水素結合や van der Waals 力ではなく、Coulomb 力を主たる結合力に用いる手法が検討された。

第1章では、研究の背景ならびに本研究の意義について述べている。

第2章では、カチオン性の表面を有する電子伝達たんぱく質であるシトクロム c (ferricyt c) に対し、多価アニオン性シクロデキストリンをエフェクターとした場合のタンパク質機能制御につき検討された。その結果、エフェクターは ferricyt c と静電相互作用で結合し、アスコルビン酸による ferrocyanide c への還元およびシトクロム c レダクターゼへの電子伝達反応を阻害することを見出している。さらに、ferricyt c に結合したポリアニオン性シクロデキストリンに水溶性ポルフィリンを包接させることにより、シトクロム c の制御された超分子型分子集積にも成功している。

第3章では、筋肉中にあり酸素を貯蔵する機能を担っているミオグロビン(Mb)に注目し、このヘムタンパク質と多価アニオン性シクロデキストリンの相互作用が詳細に検討された結果が述べられている。pH5.5 の弱酸性水溶液中で、多価アニオン性シクロデキストリンはメトミオグロビンと比較的安定な錯体を形成することが、マイクロカロリメトリー滴定から明らかとなった。定圧熱容量変化の測定から、エフェクターがメトミオグロビンへ静電的に結合する際に、タンパク質の疎水性部分がバルク水相へ一部露出することが示唆された。このようなタンパク質の構造変化が、オキシミオグロビンの安定性の低下およびアジ化物イオンのメトミオグロビンへの結合性の低下をもたらすことを明らかにした。

第4章では、ペプチド結合を加水分解する酵素であるキモトリプシンの触媒活性が、多価アニオン性鉄(III)ポルフィリンで有効に阻害され、低下させられた酵素活性がパーメチル化シクロデキストリンで元の活性にまで回復させることができるという、タンパク質機能の on-off 制御に成功した結果が述べられている。さらに4価アニオンの鉄ポルフィリンはキモトリプシンの不可逆

的な変性を誘起するが、8価アニオンの鉄ポルフィリンは、タンパク質との結合に関与しないポルフィリンの負電荷間の静電反発により、タンパク質の変性を誘起しないという興味深い結果も得ている。

第5章では、総括と今後の展望が述べられている。

以上、本研究では極めて簡便な手法を用いるタンパク質機能の改変と超分子化学の概念を応用したタンパク質機能の回復に関する新しい手法が提案されている。かかる手法は簡便性と実行性とを併せ持つという特徴を有しており、今後医学や薬学の分野で実際に応用される可能性を秘めている。このように、本研究は学術上のみならず応用的にも高く評価できる。よって、本論文は、博士（工学）（同志社大学）の学位論文として十分な価値を有するものと認められる。

総合試験結果の要旨

2008年1月15日

論文題目： ポルフィリン／シクロデキストリン超分子系を用いたタンパク質機能制御に関する研究

学位申請者： 石田 善行

審査委員：

主査： 工学研究科 教授 加納 航治

副査： 工学研究科 教授 小寺 政人

副査： 工学研究科 教授 水谷 義

要 旨：

本論文提出者は、2005年4月より本学大学院工学研究科博士課程後期課程に在学している。本年3月をもって同課程に3年間在籍したことになるが、各年度において優れた研究成果を挙げ、英語の語学試験に合格し、ドイツ語についても十分な能力を有すると認定されている。本論文の主たる内容は *Angew. Chem. Int. Ed.* (1編)、*Chem. Asian J.* (1編) に掲載され、さらに *Chem. Asian J.* (1編) に印刷中であり、十分な評価を得ている。2008年1月12日午後1時30分より約1時間半にわたって提出論文に対する学術講演会（博士論文公聴会）が開かれたが、提出者の説明により十分な理解が得られた。さらに講演終了後、審査委員により論文に関連した諸問題につき口頭試問を実施した結果、いずれも十分な学力を有することが確認された。

よって、総合試験の結果は合格であると認める。

博士學位論文要旨

論文題目： ポルフィリン/シクロデキストリン超分子系を用いた
タンパク質機能制御に関する研究

氏名： 石田 善行

要旨： 構造および機能が解明された天然タンパク質を、遺伝子工学および化学的手法により一層優れた機能を持つタンパク質に作り変え、自在に操ることができれば、医薬の分野のみならず、広く工業的に利用できる可能性がある。このような分野は、現在タンパク質工学(プロテインエンジニアリング)という学問として活発に研究がなされている。プロテインエンジニアリングのターゲットは立体構造の安定化や、有機溶媒への可溶化、酵素活性の向上などから端を発し、様々な目的に応じるためにその手法も多岐にわたる。その中で、タンパク質に人工分子を結合させる化学修飾法は、遺伝子操作によるアミノ酸置換よりも容易に実行でき、かつ20種類のアミノ酸ではなし得ない人工分子特有の機能をタンパク質に付加できることから、タンパク質機能の制御もしくは改変という観点から興味深い。

化学修飾によりタンパク質の機能を変える場合、その対象となるのはタンパク質表面である。全てのタンパク質は固有のアミノ酸配列に基づく疎水性および親水性(アニオン性、カチオン性、非イオン性)ドメインで構成される特徴的な表面を有する。そのようなユニークなタンパク質表面はタンパク質同士やタンパク質とリガンドとの相互作用、すなわち細胞の増殖、分化、免疫応答、シグナル伝達、酵素反応、アポトーシスなどといった多くの生命現象に深く関わっている。タンパク質間の会合では、それぞれのタンパク質の表面にあるいくつかのアミノ酸残基が、相手のタンパク質のアミノ酸残基と相補的に多点相互作用することで、非共有結合的にタンパク質複合体を形成する。よって天然のタンパク質に手を加えて、その機能を制御するためには、タンパク質の表面と特異的に結合するタンパク質レセプター(エフェクター)を見つけ出し、その特性を活かすことが大切であろう。このような観点から、著者は超分子化学によるタンパク質機能の制御を目指し、シクロデキストリン(CD)およびポルフィリン誘導体をエフェクターとして、タンパク質との錯形成およびタンパク質機能の制御について基礎的研究を実施した。そのために用いたタンパク質はいずれも構造および機能がよく理解されているものを選んだ。

第1章では、序論としてタンパク質表面認識によるタンパク質機能の制御についての研究背景を述べるとともに、本研究の意義ならびに各章の要旨について述べた。

第2章では、カチオン性表面を有し、電子伝達を担うシトクロム *c*(ferricyt *c*)に着目し、アニオン性 CD 誘導体であるヘプタキス(6-*O*-カルボキシメチル-2,3-*di-O*-メチル)- β -CD (CDM- β -CD)を ferricyt *c* に対するエフェクターとして用い、CDM- β -CD と ferricyt *c* との相互作用について、錯体形成メカニズムや、錯体の構造、ferricyt *c* の機能の制御について検討した。さらに第2級水酸基側を *O*-メチル化した β -CD が meso-フェニル型ポルフィリンと非常に安定な trans 型 2:1 包接錯体を形成することを利用し、5,10,15,20-テトラキス(4-グルカミノカルボニルフェニル)ポルフィリン(TGPP)と CDM- β -CD との包接錯体と ferricyt *c* との相互作用による ferricyt *c* の集積化について検討した。その結果、CDM- β -CD は ferricyt *c* 活性中心付近に静電相互作用により結合し、ferricyt *c* の酸化還元電位を負側にシフトすることや、ferricyt *c* の熱安定性を低下させることがわかった。また CDM- β -CD と TGPP との包接錯体が、ferricyt *c* と静電相互作用により ferricyt *c* : CDM- β -CD : TGPP = 2 : 2 : 1 からなる超分子3成分錯体を形成することを明らかにした。以上の結果から、タンパク質結合部位を有するシクロデキストリン - ポルフィリン包接錯体を用いることで、人工超分子系を用いたタンパク質集合体を構築することができると結論した。

第3章では、酸素結合タンパク質であるミオグロビン(Mb)の機能に対する多価アニオン性 CDM- β -CD の影響について検討した。CDM- β -CD 存在下で酸化型 Mb であるメトミオグロビン (metMb)と N_3^- との錯体の安定性が低くなり、結合定数(K)は最小で CDM- β -CD 非存在下の約半分になることがわかった。また Mb の酸素付加体であるオキシミオグロビン(oxyMb)の安定性が CDM- β -CD 存在下で低くなり、oxyMb 自動酸化反応の擬一次速度定数(k_{obs})が最大で CDM- β -CD 非存在下の約3倍になることがわかった。これらの効果は Cl^- 、 Br^- 、 CH_3COO^- 、 $CF_3SO_2O^-$ 、 ClO_4^- などの1価のアニオンの効果と似ているが、CDM- β -CD では1価のアニオンに比べてより低濃度で Mb の機能に対する効果を示すことがわかった。CDM- β -CD は1価のアニオンよりも Mb に対して高い親和性を有しており、タンパク質に対するエフェクターの合成用土台としての CD の有用性を示すことができた。今後エフェクターの添加により deoxyMb の酸素親和性を思い通りに調整し、かつ oxyMb の安定性を高めることができれば、Mb は新たな酸素運搬物質としての有望な材料となろう。

第4章では、多価アニオン性ポルフィリンをタンパク質に対するエフェクターとして用い、それを *O*-メチル化 CD による包接でタンパク質表面から引き剥がすことにより、ポルフィリンの結合および解離と同期したタンパク質機能の on-off 制御を試みた。その結果、4価アニオン性ポルフィリン鉄錯体である FeTPPS および8価アニオン性の FeP8M はともに加水分解酵素である ChT の触媒活性に対して阻害剤として働くことが分かった。さらに全ての水酸基を *O*-メチル化した CD である TMe- β -CD あるいは TMe- γ -CD の添加により、低下した ChT の触媒活性が回復することが分かった。FeTPPS は ChT の触媒活性を100%阻害することはできないが、阻害された ChT の酵素活性は TMe- β -CD の添加により100%回復させることができた。一方、FeP8M の場合は ChT の触媒活性をかなりの程度(~85%)低下させることができるが、TMe- γ -CD は十分な回復効果を示すことができなかった。ポルフィリンの構造に由来する ChT の触媒活性阻害能と *O*-メチル化 CD による回復効果の間には、二律背反の関係が示された。これらの結果から、今後より良いエフェクターとしてのポルフィリンの分子設計を精密化する必要性が示唆され、今回得られた結果は、その指針を与えるものである。

第6章では、総括として本研究より得られた成果と今後の展望につき述べた。