

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	高橋 捷也		
学 位 の 種 類	博士（理学）		
学 位 記 番 号	甲 第		号
学位授与の日付	令和 6 年	月	日
学位授与の要件	文部科学省令学位規則 第4条第1項 該当		
学 位 論 文 題 目	The unique allosteric property of crocodilian haemoglobin elucidated by cryo-EM		
主研究指導教員	西澤 知宏		
論 文 審 査 委 員	(主査) 朴 三用	教授	
	(副査) 関根 俊一	客員教授	
	(副査) 片岡 浩介	准教授	
	(副査) 禾 晃和	准教授	
	(副査)		

論文内容の要旨

血中で酸素の運搬を担うヘモグロビン (Hb) は、 α サブユニットと β サブユニットが2:2で会合した4量体構造($\alpha_1\beta_1/\alpha_2\beta_2$)を取り、それぞれのサブユニットに補欠分子であるヘムを1個ずつ持っており、ヘムに酸素 (O_2) 分子が結合する。酸素の結合・解離に伴って、4量体はR型 (Relaxed form)・T型 (Tensed form) の間で4次構造を変化させ、この遷移によって酸素親和性をアロステリックに変化させる。これによって、酸素分圧の高い肺で結合した酸素を、効率よく末梢組織に届けることができる。Hbによる4量体構造、およびそのアロステリック制御は脊椎動物において広く保存された基本的な仕組みである。酸素以外の様々な因子がHbに結合して、このアロステリック制御に影響を与えることが知られており、このような分子をアロステリックエフェクターと呼ぶ。ヒトを含むほぼすべての脊椎動物では有機リン酸 (DPG:2,3-diphosphoglycerate, ATP, etc.) がT型構造を安定化するアロステリックエフェクターとしてはたらく。一方で、脊椎動物の中で唯一、水棲生物であるワニのもつHbは有機リン酸によるアロステリック制御を受けず、代わりに HCO_3^{2-} (重炭酸イオン) によって酸素放出が促進する。このワニHbにおけるユニークな性質は、ワニの水中での狩猟行動と密接に関係している。すなわち、血中の二酸化炭素(CO_2)濃度が増加すると、水和によって生じた重炭酸イオン(HCO_3^-)が酸素のさらなる放出を促進して、長時間の潜

水を可能としている。この仕組みは、40年以上も昔に発見され、ワニHbのもつ HCO_3^{2-} 依存的なアロステリック制御の性質を、ヒトHbに付与したHb Scubaと呼ばれる改変体で作製されるなど、臨床応用に向けた研究が進められてきた。Hb Scubaにおいて導入された変異体の位置から、 HCO_3^{2-} イオンが α/β サブユニット界面に結合すると予想されたが、その詳細の分子基盤は不明であった。本学位論文では、クライオ電子顕微鏡によってワニHbの構造解析を行うことで、 HCO_3^{2-} イオンによるアロステリック制御の分子基盤を明らかにすることを目的として研究を行った。

以下に実験手順を示す。ワニHbはNorth Texas大学 Clossley研究室にて、研究目的で飼育しているワニ (*Alligator mississippians*) より採血した血液から、Nebraska大学 Storz研究室にて、安定化のために一酸化炭素 (CO) を結合した状態で精製を行った。CO結合型Hbに対して、乾燥を防ぐために湿度を高めた状態で、 O_2 ガスを噴霧して、 O_2 結合型ワニHbの試料調製を行った。観察試料は横浜市立大学内に設置されたVitrobot mark IV (Thermo Scientific社) を用いて、分子の凝集を防ぐために、還元剤であるジチオトレイトール (DTT) を添加した状態で凍結を行った。酸素非結合 (Deoxy) 型の観察試料調製のためには、CO結合型のワニHbに対して、酸素吸収材として亜ジチオン酸ナトリウムを、さらに重炭酸ナトリウムを添加してT型を安定化した状態で、大阪大学タンパク質研究所 栗栖研究室において嫌気性チャンバー内に設置されたVitrobot mark IVを用いて凍結を行った。測定試料は、理化学研究所に設置された、クライオ電子顕微鏡Titan Kriosを用いて撮影を行った。単粒子構造解析用プログラム CryoSPARCを用いて解析を行い、CO結合型、 O_2 結合型、Deoxy型のワニHb構造をそれぞれ約5,700枚、16,000枚、12,000枚の電顕像から、2.29 Å、2.31 Å、2.20 Åの分解能で決定した。構造の比較のために、ヒトHbのCO結合型、 O_2 結合型、Deoxy型の構造解析も同様に行い、それぞれ2.24 Å、2.27 Å、2.35 Åの分解能で構造決定を行った。

Deoxy型では、ヒトHb、ワニHbいずれもT型の結晶構造をよく一致していた。一方で、R型の構造状態ではわずかな違いがみられた。ヒトHbの結晶構造から、CO、あるいは O_2 が結合した状態では二種類の構造 (R型、R2型) を取ることが報告されているが、クライオ電子顕微鏡によって得られたCO結合型ヒトHb構造では、R2型に相当する構造が優先状態として得られた。つまり、結晶パッキングなどの影響を受けない状態では、ヒトHbはR2型のほうが安定な状態として存在することが明らかになった。一方で、ワニHbのCO型構造はR型構造に近く、ヒトとワニのHbで、構造平衡にわずかな違いがあることが分かった。次に、ワニHbのDeoxy構造に見られた HCO_3^{2-} イオンの結合サイトに注目して構造比較を行った。当初想定されていたように、 HCO_3^{2-} イオンは4量体の α/β サブユニット界面に合計二分子結合しており、Hb Scubaにおいて置換しているアミノ酸のうち、 β サブユニットの38番目のLys (Lys β 38、以下同様の表記法で示す)、Tyr β 41は直接 HCO_3^{2-} イオンの配位に関わっていた。一方で、Arg β 39はT型状態のサブユニット間相互作用の安定化に関わっており、ワニHbのもつ HCO_3^{2-} イオンによるアロステリック制御には、これまで予想されてきたより精緻な仕組みによって実現していることが明らかになった。

論文審査結果の要旨

論文の審査は、提出論文の内容、公聴会及び審査会での質疑応答に基づき、4名の審査員（主査：朴 教授、副査：関根 客員教授、片岡 准教授、禾 准教授）によって令和6年12月16日に行われた。

学位論文では、ワニHbの持つ独特な分子機構に関する構造解析に関する研究が報告された。ヒトを含むほとんどの脊椎動物は、有機リン酸によるアロステリックな作用によって、Hbからの酸素放出が促されるが、水棲生物であるワニのもつHbはこの作用を持っておらず、代わりに HCO_3^- （重炭酸イオン）によって酸素放出が促進されるという独特の性質を持つ。しかしながら、ワニHbの構造は現在までに報告されておらず、その詳細の仕組みは、40年以上にわたって不明であった。本論文では、クライオ電子顕微鏡を用いることで、ワニHbの構造を明らかにし、長年の疑問に答える成果を報告した。審査会では、本研究の専門性、総合理学的な理念と知識、および外国語（英語）力に関して、各審査員と以下の質疑応答が行われた。

専門分野に関して、禾副査からは、ワニの生体内の肺、および抹消組織における二酸化炭素濃度の違いと、実際の酸素結合に対する影響に関する質問がなされた。これまでの研究の中で想定していなかったような質問のようではあったが、回答する中で、 HCO_3^- イオンは酸素分圧が低い末梢組織においてHbに対して酸素が再結合するのを抑制するのが主要な役割ではないかというように、論理的な結論を見出していた。

関根副査からは、 O_2 あるいは CO 結合状態の構造多型に加えて、Deoxy状態においてR型とT型の間状態の構造は得られていないのかといった単粒子構造解析の手法に関連した質問がなされた。学位論文中に記載していないが、試してみた解析法などを踏まえて、納得のいく回答がなされた。

片岡副査からは、HbにおけるT/R型のアロステリック構造変化の共通性と、ワニHbにおける独自性、およびその進化的な保存性における質問がされた。なぜワニ以外が HCO_3^- イオンによる制御機構を獲得するに至らなかったのかという質問に対しては、現状では明確な回答を得ることは困難ではあったが、Hb scuba変異体における例を出しながら、本人の考えを明確に述べていた。

朴主査からは、Hbの構造生物学における専門性の高い質問がなされた。ヘム周辺の局所的な構造変化、あるいはヒトHbにおけるアロステリックエフェクターであるIHPの密度に関する質問に関しては、現状のクライオ電子顕微鏡解析における密度マップをもとに、明確な回答がされた。

総合理学的な観点からの質問では、構造生物学以外からのHbに関する質問が多くなされた。朴主査、禾副査、片岡副査からは、アロステリックエフェクターの種類、あるいはそれらの生理学的な役割に関していくつか質問されたが、回答として不十分な点も多く、専門分野に近い領域における知識不足がやや目立った。特に、

片岡副査からは、グロビン遺伝子の転写調節に関する質問においては、全く把握されていない様子であった。一方で、胎児性のHbに関する質問においては、卵生であるワニにおいても同様に遺伝子が保存されていることなど、積極的に知識習得を行っている様子が見られたため、今後の継続的な努力が期待された。一方で、水素結合の形成条件、アロステリック制御の定義、あるいはミオグロビンとヘモグロビンにおける構造・生化学的な違いなど、一般的な生化学に関しては概ね明快な解答がなされていた。

外国語（英語）力については、発表に使用したスライドの中から、ワニとヒトのHbを比較して、アミノ酸残基の置換と HCO_3^- イオンにおける影響に関して説明したスライドを選択し、英語で説明し、各審査員から英語での質疑が行われた。学位審査以外にも、公开发表において英語の質問に対して明確に回答できていたことなども含めて、十分なレベルに達していると評価された。

最後に審査員全員で討議を行った。研究内容においては、ワニHbにおける長年の疑問を解決した研究として、学位に十分値するとの評価を受けた。また専門分野のみならず、関連科目に関する質疑応答、英語力等全てを総合的に判断して、申請者は学位を得るにふさわしい十分な資格を有すると判定された。

最終試験の結果の要旨（主査が全体を総括したもの）

論文に関する専門分野の科目 合格

【試験の要旨】

ヘモグロビン (Hb) は二つの α サブユニットと β サブユニットを持つ4両体として、アロステリック構造変化により、細胞へ酸素分子を運んでいる機能を持つ。Hbはタンパク質の中でも、構造と機能の研究が最も研究されている。しかし、Hbの進化の過程で、ヒトと異なる酸素分子を運ぶ機能を持つ動物や爬虫類などが報告されてきた。その中、ワニHb (*Alligator mississippians*) は水中で呼吸ができるユニークな機能を持つことが知られており、その機能は血液中の CO_2 ガスが水に溶解、重炭酸イオン(HCO_3^-)になり、酸素親和性を変化させる機能を獲得している。しかし、Hb分子に HCO_3^- の構造生物学的な知見は謎のままであった。申請者は、クライオ電子顕微鏡単粒子解析手法により、ワニHbの R状態およびT状態の高分解能での構造解明から、ユニークな機能解明に成功した。審査員により専門的な質問にも適切な回答が得られており、申請者は専門分野に関する十分な知識を有するものと判断された。

関連分野の科目（理学のみ） 合格

【試験の要旨】

理学の観点から、審査員からは様々な質問が行われ、これまでに行ってきた実験に近いことは比較的よく答えることができるのに対し、少し離れた分野になると少し噛み合わない回答もあったが、総合的には学位取得に値する十分な学識を有すると判断された。

外国語科目 合格

【試験の要旨】

英語によるプレゼンテーション（発表スライドを1枚選んで説明）、ならびに論文中に記載された" General Introduction "から判断し、十分な英語の能力があるとの評価を受けた。

○ 総合判定 合格

【その要旨】

博士論文の内容及び試験の結果は、上記各項目いずれも一定の水準に達していることを示しており、総合的に見ても博士の学位を授与するに十分な資格を有するものと判断された。

主査 横浜市立大学大学院生命医科学研究科

教授

朴

三 用

署名

朴 三 用



最終試験結果の要旨（主査・副査が個別に出したもの）

論文に関する専門分野の科目 [90 点]

【試験の要旨】ワニHbのアロステリックエフェクターである重炭酸イオン(HCO_3^-)の発見から、40年以上にわたって不明であった。申請者は、クライオ電子顕微鏡の手法により、ワニHbのT状態とR状態の構造解明に成功した。しかも、 HCO_3^- イオンの結合部位を特定によるアロステリック制御を矛盾なく説明することが出来、レベルの高い研究であると評価した。

関連分野の科目（理学のみ） [85 点]

【試験の要旨】理学分野での質問に関しては、生き物の種によってなぜアロステリックエフェクターが異なっている理由について質問を行ったが、部分的には適切な回答ではなかった。しかし、鳥類と魚類でのアロステリックエフェクターについては、明瞭な回答が得られた。

外国語科目 [90 点]

【試験の要旨】学位論文の“General Introduction”に記述された内容、ならびに英語による短時間のプレゼンテーションをもとに判断した。英語の能力としては、学位取得に十分なレベルにあるものと考えられる。

○ 総合判定 合格

【その要旨】博士論文の内容及び試験の結果は、上記各項目いずれも一定の水準に達していることを示しており、総合的に判断しても、博士の学位を授与するに十分な資格を有するものとする。

審査委員 横浜市立大学大学院 生命医科学研究科 教授 朴 三 用

署名 朴 三 用



最終試験結果の要旨（主査・副査が個別に出したもの）

論文に関する専門分野の科目 [80 点]

【試験の要旨】

ヘモグロビンのアロステリック変化について、R型とT型の中間的な構造がないか、クライオ電顕解析における対称性の取り扱いとも関連して質問したところ、概ね問題なく回答していた。

関連分野の科目（理学のみ） [90 点]

【試験の要旨】

ヘモグロビンと関連のあるミオグロビンとの違いについて説明を求めた。ヘモグロビンとミオグロビンのサブユニット構成、生理的な役割や酸素親和性の違いについて、概ね問題なく回答していた。

外国語科目 [90 点]

【試験の要旨】

ワニヘモグロビンの構造に見出された、ワニ特異的なアミノ酸残基と重炭酸イオンの相互作用について英語でほぼ問題なく説明した。

○ 総合判定 合格 / 不合格

【その要旨】

重炭酸イオン依存性を示すワニのヘモグロビンの構造解析に取り組み、クライオ電顕を用いて複数の構造を高分解能で解明し、ヒトヘモグロビンと比較することで、その特異性の構造基盤をはじめて明らかにした。生物進化の観点からも興味深く、学位取得に値する。

審査委員 横浜市立大学大学院 生命医科学研究科 客員教授 関根 俊一

署名 関根 俊一



最終試験結果の要旨（主査・副査が個別に出したもの）

論文に関する専門分野の科目

[85 点]

【試験の要旨】ヘモグロビンへの酸素の結合とR-T型の変化および HCO_3^- の結合の間の因果関係について質問したが、正しく納得のいく説明が得られた。また、ヘモグロビンのリン酸結合と HCO_3^- 結合の能力が両立可能なのか、さらに、 HCO_3^- 結合能を獲得したワニ型のヘモグロビンにデメリットはないのか、なども問うたが、現在得られる知見に基づいて回答していた。動物種によって異なるアロステリックエフェクターが使われるが、それらがどのような代謝過程と関連しているのかについては、詳しく答えることはできなかった。

関連分野の科目（理学のみ）

[75 点]

【試験の要旨】ヘモグロビンの構造と並んで古くから研究されてきたグロビン遺伝子の転写調節について尋ねたが、ほとんど知るところはない様子だった。ヘモグロビン以外にヘムを持つタンパク質の例を問うたが、ミオグロビン、ヘモシアニンなどの酸素運搬タンパク質を挙げたが、その他の例が挙がることなく、専門領域以外の知識はやや少ない印象であった。

外国語科目

[90 点]

【試験の要旨】英文報告書は、主論文では触れられていない内容も含んでおり、英語の文章表現としてこなれない箇所もあるが、おおむね分かりやすい英語で表現されていた。論文発表会での英語での議論のようすからも、英語でのコミュニケーション能力に問題はないことが伺えた。

○ 総合判定

合格

【その要旨】本論文では、ワニおよびヒトのヘモグロビンのそれぞれ3タイプの立体構造とアロステリックエフェクターとの結合様式を解明し、過去の知見と照らし合わせて新たな議論を展開した。より俯瞰的な視点を持ってほしいと感じる部分もあるが、最終試験での質疑では的確な議論ができており、博士の学位にふさわしい十分な学識を有すると判断した。

審査委員 横浜市立大学大学院 生命医科学研究科 准教授 片岡 浩介

署名

片岡 浩介



最終試験結果の要旨（主査・副査が個別に出したもの）

論文に関する専門分野の科目 〔 85 点〕

【試験の要旨】

本論文において、申請者は、これまで構造決定が困難であったワニ由来ヘモグロビンについてクライオ電子顕微鏡単粒子解析に着手し、R状態およびT状態のコンフォメーションを明らかにするとともに、アロステリックエフェクターとして同定されていた HCO_3^- の結合様式も明らかにすることで、ワニ由来ヘモグロビンが効率よく酸素を放出する分子機構を理解する上で重要な構造基盤を解明した。また、並行してヒト由来ヘモグロビンについてもR状態とT状態のクライオ電子顕微鏡構造を決定し、結晶のパッキングの影響を受けていない溶液中でのコンフォメーションを明らかにした。公聴会および審査会において、T状態、R状態の分類方法などについて質問したところ、適切な回答が得られた。 HCO_3^- が生体内のどのような環境で作用し、またヘモグロビンの構造にどのような影響を及ぼすのかなどについて質問したところ、 HCO_3^- の生体内での濃度から判断すると、 HCO_3^- は、酸素濃度や赤血球の存在部位に依存せず、酸素の放出を促進する効果を示すはずであること、また、 HCO_3^- は、酸素分圧が低い環境で酸素が放出された際にT状態の構造を安定化することで酸素の再結合を抑制すると考えられること等の回答が得られた。以上の回答状況および、他の審査員からの質問に対する回答状況も考慮し、学位授与に相当する専門的知識が身に付いていると判断した。

関連分野の科目（理学のみ） 〔 80 点〕

【試験の要旨】

化合物の結合様式を解析する際に水素結合の形成の有無を評価する基準について質問したところ、概ね適切な回答が得られた。また、アロステリック制御の定義についても説明を求めたところ、適切な回答が得られた。一方、胎児ヘモグロビンの性質やアロステリックエフェクターである有機リン酸の作用機序について質問したが十分な回答は得られなかった。

外国語科目 〔 95 点〕

【試験の要旨】

学位論文に添付された英文報告書の内容及び公聴会、審査会における口頭での発表内容の説明に基づき、判定を行った。英文報告書については、ごく僅かな文法上の誤りは見受けられたが、研究の背景を説明し、議論を行うための外国語能力は十分に備えていると判断した。また、口頭でのスライドの説明や英語での質疑に関しても問題なく、十分な外国語能力があると判断した。

○ 総合判定 合格

【その要旨】

申請者は、クライオ電子顕微鏡単粒子解析を効果的に用いることで、ワニおよびヒト由来ヘモグロビンの立体構造を解明し、酸素放出機構を理解する上で重要な構造情報を明らかにした。本研究から得られた知見は、ヘモグロビンの酸素運搬機能の理解の深化に寄与するだけでなく、将来的には人工血液の作製など医療応用にもつながる有用なものであると考えられる。申請者は、専門的知識、関連分野の知識、外国語の能力いずれについても学位授与の水準に十分達しており、問題なく合格として良いと判定した。

審査委員 横浜市立大学大学院 生命医科学研究科 准教授 禾 晃和






署名 禾 晃和



学位授与に値するか否かの意見書

令和 6 年 12 月 16 日

学位審査部会御中

主査	横浜市立大学大学院 生命医科学研究科教授	朴 三用	
副査	横浜市立大学大学院 生命医科学研究科 客員教授	関根 俊一	
副査	横浜市立大学大学院 生命医科学研究科准教授	片岡 浩介	
副査	横浜市立大学大学院 生命医科学研究科客大学院客員准教授	禾 晃和	
副査	横浜市立大学大学院 生命医科学研究科教授／准教授		

- 1 学位申請者氏名
高橋 捷也
- 2 学位論文名
The unique allosteric property of crocodilian haemoglobin elucidated by cryo-EM
- 3 学位論文審査の結果
合格
様式第 4 号「学位論文審査の結果の要旨」のとおり
- 4 最終試験の結果
論文に関する専門分野の科目 合格
関連分野の科目（理学のみ） 合格
外国語科目 合格
総合判定 合格〔 4 人中 4 人が合格と判定〕
様式第 5 号「最終試験の結果の要旨」のとおり

令和 6 年 12 月 16 日に審査委員会を開催し、表記の論文について審査し、最終試験を行った結果、博士（理学）の学位を授与することができると判定しましたので、報告します。