【29】

| | |
|---|---|
| 氏名（本籍） | 工藤（くどう）　孝（たかし）（秋田県） |
| 学位の種類 | 博士（農学） |
| 学位記番号 | 博甲第2469号 |
| 学位授与年月日 | 平成13年1月31日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 審査研究科 | 農学研究科 |
| 学位論文題目 | 一酸化窒素還元酵素チトクロムP450norの反応中間体形成過程の解析 |
| 主査 | 筑波大学教授　農学博士　祥雲弘文 |
| 副査 | 筑波大学教授　工学博士　國府田悦男 |
| 副査 | 筑波大学教授　農学博士　馬場忠 |
| 副査 | 筑波大学教授　理学博士　藤村達人 |

## 論文の内容の要旨

カビ*Fusarium oxysporum*の脱窒系に一酸化窒素還元酵素として関与するチトロクロムP450nor（P450nor）はNAD（P）Hから直接電子を受け取り，一酸化窒素（NO）を亜酸化窒素（$N_2O$）に還元するという，極めて特異な接触反応を行う。一分子のヘムのみを持つP450で，フラビンタンパクなどの他の電子伝達成分の介在を必要とせずNAD（P）Hから直接2電子を受け取る例は，他には知られていない。一方，そのアミノ酸一次配列および結晶構造は他のP450と相同性を示すことから，P450norはP450スーパーファミリーに属することが判明している。従ってP450norは共通構造を保ちながら特異な機能を獲得したP450として多大な関心を集めている。P450norはその反応過程において，NO結合型がNAD（P）Hにより還元され，反応中間体を形成することが明らかとなっている。本研究は，P450norとNAD（P）Hとの直接相互作用の機構解明という視点から，反応中間体形成過程について，解析を行ったものである。

本研究では，まず，*Cylindrocarpon tonkinense*のP450nor1, P450nor2のcDNA及び遺伝子の取得を行った。P450nor2は他のアイソフォームと異なり，NADPHの方に電子供与体特異性が高い。そこで，得られたP450nor2のcDNAを利用して*F. oxysporum*のP450norとのキメラP450norを作製し，NADHとNADPHとを識別している部位の検索を行った。その結果，*F. oxysporum*のP450norのN末端側約160残基中に，NADHとNADPHの識別に重要な部位が含まれることが明らかとなった。一次構造の比較，および*F. oxysporum*のP450norの立体構造から得られる知見をもとに，この領域について種々の変異体を作製し，解析を行った。その結果，75番目のセリン残高（Ser75）を*C. tonkinense*のP450nor2と同様にグリシン残基に置換すると（Ser75Gly）NADPHによる活性の上昇が観察され，この部位がNADHとNADPHの識別に強く関与していることが明らかになった。

P450norはヘム遠位側ポケット入口を形成するB'－ヘリックスとF, Gループの間が大きく開いており，ヘム遠位側に大きなポケットを形成しているという構造上の特徴を持つ。さらに，そのポケット内外には多数の塩基性アミノ酸残基が存在している。これら構造上の特徴がNAD（P）Hとの直接相互作用に対応するものであると予想し，これらの塩基性アミノ酸残基について変異体を作製し，解析を行った。その結果，特にポケット内部に位置する塩基性アミノ酸残基の置換により，活性の大幅な低下が認められた。さらに，この活性の低下が中間体形成過程の速度の低下によるものであることが明らかとなり，これらの塩基性アミノ酸残基がNAD（P）Hによる還元反応である中間体形成過程に重要な役割を果たしていることが示された。さらに，ハロゲンイオン（$Cl^-$, $Br^-$）

やリン酸イオンについて，中間体形成過程に与える影響を解析した結果，これらのイオンもまた，中間体形成過程を大きく阻害することが明らかとなった。そこで臭素イオン（$Br^-$）が結合したP450norの立体構造解析をおこなったところ，$Br^-$はプロトン供給ネットワーク終端の，ヘム近傍の「アニオンホール」に結合することが判明した。従って，これらのイオンは中間体形成過程において，プロトン供給および電子伝達の段階を阻害しているものと推察された。ハロゲンイオンによる阻害は，酸化型スペクトルの変化を伴うものであったが，ヘム遠位側ポケットの塩基性アミノ酸残基のうち，Arg174やArg64残基の変異体は中間体形成過程が大幅に低下したにもかかわらず，酸化型スペクトルの変化はごくわずかであった。したがって，Arg174やArg64残基の変異による活性低下は，プロトン供給や電子伝達ではなく，NAD（P）Hとの結合能の消失によるものと推察された。

以上の結果より，P450norにはArg174，Arg64残基を中心とするNAD（P）Hとの結合部位が明らかに存在すること，およびヘム近位側から電子伝達がおこなわれる通常のモノオキシゲナーゼP450とは異なり，ヘム遠位側に電子供与体であるNAD（P）Hが「基質」として結合し，電子伝達が行われるという，特異な反応機構が機能していることが明らかとなった。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は，生命科学における最重要酵素の一つであるP450の分野で，その特異な反応機構から世界的に注目されているP450norについて，おもにNAD（P）Hとの相互作用という側面から解析を行ったものである。N末端側にNAD（P）H識別部位があることを推察し，そこから他のP450において重要な基質認識部位の一つであるB'－ヘリックス上のSer75残基がNADHとNADPHの識別に関与することを見出した。それによりP450norが通常のモノオキシゲナーゼP450とは全く異なり，電子供与体であるNAD（P）Hとヘム遠位側で結合して還元を受けることを示した。さらに，ヘム遠位側ポケット内外の多数の塩基性アミノ酸残基について変異体を作製して解析を行い，これらの塩基性アミノ酸残基の正電荷が，NAD（P）Hが関与する中間体形成過程に重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに，阻害剤ハロゲンイオンの結合部位および中間体形成阻害機構の解明を行った。ハロゲンイオンによる阻害機構と変異の導入による失活の機構との相違から，Arg174，Arg64残基がNAD（P）Hとの結合においてきわめて重要であることを示した。これらの成果は，P450norとNAD（P）Hとが直接結合していることの大きな証拠となるものであり，P450norの特異な反応機構の解明や，P450およびその他の酵素の構造と機能の相関解明をめざす研究の今後の進展に大きな貢献を果たすことは疑いがない。

よって，著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。