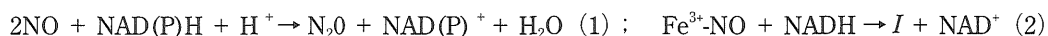


氏 名 (国籍)	蘇 霏 (中 国)
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 3356 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	農学研究科
学 位 論 文 題 目	<b>Studies on the Reaction Mechanism of Cytochrome P450nor</b> (シトクロム P450nor の反応機構の研究)
主 査	筑波大学教授 農学博士 小 林 達 彦
副 査	筑波大学教授 農学博士 星 野 貴 行
副 査	筑波大学助教授 農学博士 中 村 顕
副 査	筑波大学教授 農学博士 田 仲 可 昌

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

シトクロム P450nor (以下 P450nor) は一酸化窒素 (NO) 還元酵素 (Nor) として働き (下式 1), カビの脱窒に関与する。



触媒する反応がモノオキシゲナーゼでない点や電子供与体 NADH から直接電子を受取る (還元過程: 上記 2 式) ことなど, P450 として異常な反応機構をもつ。このような異常性にも関わらず立体構造は他の P450 とよく似ている。すなわち P450 スーパーファミリーのメンバーとしての特質を持ち合わせる。これまで本 P450nor に関し, X線結晶構造解析をはじめとする様々な手法による反応機構の解明が進んでいる。本研究では, NADH から P450nor への直接の電子伝達という興味深い現象に焦点を絞り, おもにタンパク質工学的解析によりその反応機構の解明を行った。さらに, カビ脱窒系に関連する興味深い反応, 共脱窒反応の少なくとも一部の反応が P450nor により引き起こされることを発見し, その解析を行った。

P450nor のヘム遠位ポケットには多くの正荷電アミノ酸 (Lys, Arg) や親水性アミノ酸, および水分子が存在し, 親水性の高い環境を形成している。多くの Lys, Arg 残基より形成される正荷電クラスターは, 上記の部分反応 (2) における NADH の結合に重要であることが示されている。また, Thr243, Ser286, Asp393 などの親水性アミノ酸が反応 (2) における中間体 (I) 形成に重要であることも明らかになっている。本研究では, ヘム遠位ポケットに存在するアミノ酸残基の中で役割が解析されていないもの, とくに酸性アミノ酸 (Glu71, Asp88) および Asn315 などアニオンホールを形成するアミノ酸の機能について解析を行った。

Asp88 の変異体, D88A および D88V では, 還元過程は阻害されず, あるいはむしろ促進されるのに, overall 反応は 20% 強にまで減少するという興味深い現象を観察した。D88A では,  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$  などの酸化型ピリジヌクレオチドに対する結合の親和性が著しく高まっていた。これらの結果より, これら変異体では反応 (2) において電子を渡したあとの NADH, すなわち  $\text{NAD}^+$  の酵素への結合力が高まり, I からの  $\text{NAD}^+$  の解離速度が遅くなることにより overall 反応の速度低下を招いた, と結論した。Asp88 は上記正荷電クラスターの中に存在する。この結果は, 酵素反応全体にとって NADH の結合だけでなく,  $\text{NAD}^+$  の遊離も重要なステップであることを認識させるものである。すなわち正荷電クラスターの中に負荷電 (Asp88)

を配置することにより、NADH と  $\text{NAD}^+$  の両者に適度な親和性を与える、巧みな機構の存在が明らかとなった。

一方 Glu71 は正荷電クラスター最上部 Arg64 の上 (Arg64 と B<sup>1</sup>-ヘリックスの中間) に位置する。この変異体 E71A では I 形成反応の阻害が見られた。Glu71 は NADH の結合に重要な Arg64 を固定する役割をもつと結論した。Glu71 と Asp88 は Arg64 を挟んで位置し、ともに Arg64 から至近距離にある。すなわち Glu71-Arg64-Asp88 は塩橋ネットワークを形成する。NADH 結合に際しては Glu71 が Arg64 を NADH 分子に近づける役割を果たし、電子伝達後には Asp88 が Arg64 を  $\text{NAD}^+$  から引き離す。すなわち NADH 結合および  $\text{NAD}^+$  遊離における Glu71-Arg64-Asp88 塩強ネットワークの重要性がクローズアップされた。

さらにヘム近傍のアニオンホール (ハロゲンイオン結合部位) について検討し、NADH との相互作用におけるそのユニークな機構を明らかにした。アニオンホールを構成するアミノ酸残基の変異体、すなわち N315D, A293L などでは上記還元過程が阻害されたが、N315D では D88A と同様に  $\text{NAD}^+$  への親和性が高まっていた。これらの結果より、アニオンホールは NADH のピリジン環結合のスペースを提供し、さらに還元型 (NADH) は引きつけるが正荷電となったピリジン環 ( $\text{NAD}^+$ ) には反発して早く追い出すというユニークな機構の存在が明らかとなった。

一方カビでは条件により、脱窒と共にユニークな共脱窒現象が観察される。すなわち脱窒産物  $\text{N}_2$  または  $\text{N}_2\text{O}$  を構成する窒素原子の一方が亜硝酸以外の窒素化合物 (共脱窒基質) に由来する。共脱窒産物の種類 ( $\text{N}_2$  または  $\text{N}_2\text{O}$ ) は共脱窒基質の種類に依存する。本研究では共脱窒への P450nor の関与を検討した。その結果、NO とアザイドからハイブリッドの  $\text{N}_2\text{O}$  が生成することを証明し、 $\text{N}_2\text{O}$  を生成する共脱窒反応は二段階で進行すること、およびその後半に P450nor が関与することを明らかにした。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

P450 スーパーファミリーに属し、立体構造の共通性も保存しながら特異な機能を獲得するに至った P450nor の構造～機能相関の解明は、P450 の分子進化や反応機構を考える上できわめて興味深いものである。本研究は、Glu71-Arg64-Asp88 塩橋ネットワークおよびアニオンホールの NADH との相互作用における重要性、とくに速やかな  $\text{NAD}^+$  遊離のための巧妙なメカニズムの存在を初めて明らかにし、P450nor の高速ターンオーバー実現のための中心的機構を解明したものである。さらにカビ脱窒系にユニークな共脱窒活性の少なくとも一部が P450nor によるものであることを明らかにした。

以上のように、本研究の成果は、NADH から P450 への直接電子伝達という異常な反応機構の解明において重要な知見をもたらしたと判定される。

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。