

氏名(本籍)	こにし かず のぶ 小西一誠(和歌山県)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博乙第2202号		
学位授与年月日	平成18年3月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Structural and Functional Analyses of Aliphatic Aldoxime Dehydratase (脂肪族アルドキシム脱水酵素の構造機能解析)		
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	深水昭吉
副査	筑波大学教授	農学博士	馬場忠
副査	筑波大学助教授	博士(農学)	中村顕

論文の内容の要旨

Pseudomonas chlororaphis B23 はかつてのアクリルアミド工業生産菌であり、現在も農薬の中間原料であるシアノバレリアミドの工業生産に使用されている実用菌である。最近、ニトリルを分解する本菌がニトリルを合成する酵素を有することが明らかとなった。本酵素は Aliphatic aldoxime dehydratase であり、ヘムを活性中心に持つことが明らかとなっているが、ヘムの配位子やその近傍の構造については未知である。そこで、ヘムの環境を解明するとともに、本酵素の詳細な反応機構の解析に取り組むことにした。

まず始めに、分光学的手法を利用して野生型酵素の解析を行った。酵素の活性型である ferrous form (鉄2価)の共鳴ラマンスペクトルは「第5配位子座に Histidine を有する5配位型ヘム」の典型的なラマンスペクトルを示し、このことから本酵素は空の第6配位子座を反応の場として利用していることが示唆された。続いて、第5配位子座の Histidine を同定するために、Aldoxime dehydratase ファミリーに保存されている全ての Histidine を Alanine に置換した変異体を作成し、これら変異体の酵素諸性質及び CD スペクトル及び共鳴ラマンスペクトルを測定した。この結果、第5配位子座の Histidine が His299 であることを明らかにするとともに、反応機構に重要な役割を果たす His320 が第6配位子座側のヘム上部に存在することを発見した。

次に、反応中間体の捕捉条件を検討した結果、低濃度の酵素に対して大過剰の基質を添加することにより、長寿命の新しい反応中間体(OS-II)が生成することを見出した。酵素と基質を混合した直後に生成した OS-II スペクトルは約10分間そのスペクトルを保持した後、徐々に resting state である ferrous form (鉄2価)へと変化した。この OS-II の構造解析を詳細に行うため、¹⁵N 置換した標識ブチルアルドキシムを(基質として)利用した共鳴ラマン測定等を行い、OS-II の非常に興味深い以下の2つの特徴を明らかにした。まず一つは OS-II のヘム鉄を2価あるいは3価と考えるには波数が高すぎる ν_4 (1379 cm⁻¹) バンドを観測したことであり、もう一つは OS-II のヘム鉄と基質の N の結合を単結合と考えるには高すぎる Fe-N 伸縮振動 (857 cm⁻¹) バンドを観測したことである。以上の実験結果より、OS-II が Fe(IV) = N を含む構造を持つと考察し、新規な反応機構を提唱した。

審査の結果の要旨

新規酵素 Aliphatic aldoxime dehydratase は水溶液中での脱水反応を触媒し、(容易には作れない) CN 三重結合を形成する反応を触媒するユニークかつ希有な酵素である。活性中心であるヘムの配位子やその近傍の構造については未知であったが、本研究によって、ヘムの第 5 配位子座のヒスチジン残基が His299 であることが明らかになるとともに、反応機構に重要な役割を果たす His320 が第 6 配位子座側のヘム上部に存在することが初めて判明した。さらに、低濃度の酵素に対して大過剰の基質を添加することにより、長寿命の新しい反応中間体 (OS-II) が生成する現象が発見され、OS-II が Fe (IV) = N を含む構造であることが明らかとなった。これらは特筆すべき研究成果であり、一連の成果を基に提唱された詳細な反応機構は、従来知られている他のヘム酵素の機構とは全く異なる様式を示し、インパクトのある研究として高く評価できる。さらに、これらのヘム環境の構造と触媒機構に関する基礎的知見は今後、酵素のタンパク質工学的改良等を行う上で重要であり、最終的には、本酵素を直接触媒として用いた有用物質 (ニトリル) 生産への応用が期待される。

以上のように、本研究の成果は、酵素科学領域のみならず応用微生物学領域においても大きく貢献するものと判定される。

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。