

氏 名	とう しゃ たけ ひこ 當 舎 武 彦
学位の種類	博 士 (工 学)
学位記番号	工 博 第 2320 号
学位授与の日付	平 成 15 年 9 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	工 学 研 究 科 分 子 工 学 専 攻
学位論文題目	MOLECULAR MECHANISM OF CYTOCHROME P450CAM-CATALYZED OXYGENATION REACTION REGULATED BY THE ASSOCIATION WITH PUTIDAREDOXIN (プチダレドキシンの結合により制御される P450cam の酸素添加反応の分子機構)
論文調査委員	(主 査) 教 授 森 島 績 教 授 船 引 卓 三 教 授 齋 藤 烈

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、ヘム酵素チトクロム P450 による酸素分子の活性化ならびに酸素添加反応の分子機構を解明するために、緑膿菌由来の P450cam とその電子供与体であるプチダレドキシ (Pdx) との複合体形成に関する研究を行っている。本論文では、特に Pdx 結合に伴う P450cam の構造変化の解明および、その構造変化の酵素活性におよぼす影響について検討しており、5 章 7 節から構成されている。

第 1 章では序論として、本論文の研究背景がまとめられており、P450cam に関する現在までに行われてきた研究を総括的に紹介している。P450cam は酸素分子を活性化して基質であるカンファーの水酸化反応を触媒するが、そのために、Pdx から 2 当量の電子伝達を必要とする。興味深いことに、この P450cam-Pdx 間の電子伝達反応は、相互認識の特異性が高く、Pdx 以外の電子供与体では P450cam へ十分に電子伝達できないことが知られている。しかし、P450cam-Pdx 複合体の構造が未だ解明されていないため、P450cam と Pdx の相互作用部位や電子伝達経路は未解明であり、P450cam-Pdx 間の電子伝達反応の分子機構はよく理解されていない。さらに、P450cam-Pdx 間の電子伝達反応では、Pdx は P450cam に結合して構造変化を誘起することが知られており、その構造変化が酵素活性に重要であると考えられているが、その詳しい分子機構は解明されていない。本論文では、各種分光法を中心とする物理化学的手法とアミノ酸置換などの生物化学的手法を組み合わせ、P450cam-Pdx 間の電子伝達反応の分子機構、さらに Pdx の結合により制御される P450cam の酸素添加反応の分子機構の詳細な解明を目的としている。

第 2 章では P450cam と Pdx の相互作用部位やその電子伝達経路の解明を目指して研究を行った。第 1 節では、P450cam の軸配位子近傍に存在するグルタミン 360 番目に注目し、そのアミノ酸置換体を作成して、Pdx との親和性や電子伝達速度を測定したところ、グルタミン 360 番目を含む軸配位子周辺の水素結合ネットワークが P450cam の酸化還元電位を調節し、電子伝達反応を制御していることが示された。第 2 節では、P450cam と電子供与体間の反応特異性の決定因子を解明するために、P450cam のヘム近傍に哺乳類由来 P450 において電子供与体との電子伝達経路や相互作用部位として機能すると考えられるループ構造を導入したキメラ P450 を作成した。しかし、このキメラ P450 は、哺乳類の P450 の電子供与体である P450 還元酵素とは反応せず、水酸化生成物の生成は確認されなかった。このことから、P450 とその電子供与体間の反応特性には、電子供与体結合部位の構造だけではなく、電荷の分布状態や電子供与体の結合に伴う構造変化も重要であることを示唆している。

そこで、第 3 章では、Pdx 結合に伴う P450cam の構造変化の解明を試みた。第 3 節では、核磁気共鳴 (NMR) を用い、Pdx 結合に伴うヘム近傍の構造変化を分子レベルで明らかにすることを目的とした。本研究ではヘムからの環電流効果を利用し、ヘム近傍に存在するいくつかのプロトンシグナルの帰属に成功した。また、これらのシグナルが Pdx の添加に伴いシフトすることから、Pdx の結合に伴い基質がヘム鉄に近づくことを見出した。第 4 節では、P450cam のロイシン 358 番目

をプロリンに置換したL358P変異体の分光学的特性が、Pdx結合型P450camに類似することに着目した。そこで、L358P変異体のX線結晶構造解析を行うことにより、Pdx結合に伴うP450camの構造変化の解明を試みた。その結果、Pdx結合は、ヘム面を傾かせ、ヘム近傍の水素結合を切断するような構造変化を誘起することがわかった。

続く第4章では、第3章で示したPdx結合に伴うP450camの構造変化が酵素活性にどのような影響をおよぼすのかを様々な視点から検討している。第5、6節では第4節で用いたL358P変異体をPdx結合型モデルとして利用し、その機能解析を行うことにより、Pdx結合に伴うP450camの構造変化の意義について検討した。第5節では、L358P酸素体を種々の還元剤と反応させて水酸化生成物の生成を調べたところ、野生型P450camの場合に比べ、有意な量の水酸化生成物を確認することができた。これはPdx結合に伴うP450camの構造変化が酸素結合体への電子伝達反応を促進していることを示している。第6節では、L358Pの気体分子との親和性を検討した。その結果、L358Pにおける酸素解離速度は野生型の5分の1程度に抑制されることがわかった。すなわち、Pdxの結合は、酸素結合体から酸素の解離を抑制し、酸素体への電子伝達反応の効率を高めていると考えられる。また、第7節では、基質類似体が結合したP450camのPdx結合に伴う構造変化を調べることで、構造変化と反応効率の関係について考察した。その結果、Pdxの結合に伴う構造変化が観測されない場合には、水酸化反応の効率が悪く過酸化水素生成が多く観測された。これは、Pdxの結合に伴う構造変化が、水酸化反応の効率を高め、過酸化水素の発生を抑制している可能性を示している。すなわち、Pdxの結合は電子伝達反応の促進だけではなく、酸素結合体からの酸素の解離や過酸化水素の発生を抑制し、水酸化反応を効率よく行っているものと解釈された。

第5章では全編を通じての総括と、研究結果の要旨がまとめられている。

#### 論文審査の結果の要旨

本論文は、一原子酸素添加酵素であるP450camとその電子供与体であるブチダレドキシシン (Pdx) 間の電子伝達反応、特にPdx結合によって制御されるP450camの酸素添加反応の分子機構についてまとめられたものである。本論文では、アミノ酸置換体を用いた生化学的手法と核磁気共鳴やX線結晶構造解析を中心とした物理学的手法を組み合わせ、P450cam-Pdx間の相互作用部位やPdx結合に伴うP450camの構造変化の内容とその機能的意義を検討している。得られた主な成果は以下の通りである。

1. アミノ酸置換体を用いたP450cam-Pdx間の電子伝達反応に関する研究では、軸配位子周辺の水素結合ネットワークがヘム鉄の酸化還元電位を調節し、電子伝達反応を制御していることを示した。また、緑膿菌由来のP450camのヘム近位側表面に哺乳類由来のP450の配列の一部を導入したキメラ型酵素の研究からは、P450とその電子供与体間の反応特異性を決定している因子について、単にP450の電子供与体認識部位の構造だけでなく、認識部位の電荷の分布や電子供与体が結合した際のP450の構造変化が重要であることなどを提案した。
2. Pdx結合に伴うP450camの構造変化に関する研究においては、核磁気共鳴を用いることによって、Pdxの結合によるヘム近傍の構造変化を詳細に変化した。さらに、P450camのアミノ酸置換体の一つ (L358P変異体) が、Pdxが結合していないにもかかわらず、Pdx結合時のP450cam分光学的特性を示すことを発見した。そこで、L358P変異体のX線結晶構造解析を行うことによって、より詳しくPdx結合に伴うP450camの構造変化を検討した。その結果、Pdxの結合はヘム面を傾かせ、基質をヘムに近づけるような構造変化を誘起することを明らかにした。
3. 次に、Pdx結合に伴う構造変化がP450camの酵素活性に及ぼす影響について検討した。本研究では、L358P変異体をPdx結合型P450camのモデルとして用い、L358P変異体の機能解析を行い、Pdx結合によるP450camの構造変化の機能的意義を検討した。これにより、Pdx結合は電子伝達反応やP450camにおける酸素分子の活性化を促進することが示された。

以上、本論文は、P450cam-Pdx複合体形成による一原子酸素添加反応の分子機構に重要な知見を与えるだけでなく、今後の生体内での蛋白質間電子伝達機構の解明に重要な指針を与えるものである。従って、本論文は、学術上、実際上寄与するところが少なくない。よって本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成15年8月20日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。