

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	堤 真衣子
論文題目	Physicochemical Characterization of Histamine Dehydrogenase and Its Enzymatic Reaction （ヒスタミン脱水素酵素とその酵素反応の物理化学的特性評価）		
（論文内容の要旨）			
生体内において酸化還元反応は数多くあり、そのほとんどが酵素触媒で進行する。こうした酸化還元酵素反応系は、特に生体エネルギーの獲得系で中心的役割を果たしている。酸化還元酵素の反応特性評価においては、多くの場合定常あるいは遷移状態の反応速度解析が用いられている。それに加えて、酸化還元酵素の熱力学的特性評価、とりわけ酸化還元電位評価等も、酵素反応特性を理解する上で非常に重要である。しかしながら、一般的には、酵素の酸化還元電位の評価が非常に難しいこともあり、速度論と熱力学の両側面から酸化還元酵素反応を解釈する試みは必ずしも多くない。 本論文では、放線菌<i>Nocardioides simplex</i>のヒスタミン代謝の初発酵素として知られているヒスタミン脱水素酵素（HmDH）を取り上げた。HmDHは共有結合型FMNと鉄硫黄クラスター（FeS）を持っており、そのコファクタ構成と予想される分子内電子移動経路から、本酵素反応は速度論と熱力学の両側面から理解するのに格好のモデルであるとみなした。そこで、HmDHの各酸化還元コファクタの酸化還元電位を評価し、コファクタ間の電子移動反応に注目してHmDHが触媒する一連の反応特性を物理化学的に理解することを目的とした。さらに、ここで得られた知見をもとに、ヒスタミンのアンペロメトリックセンサの構築を検討した。 第1章では、各種電極基材を用いて、HmDHの電気化学的解析を行い、FMNとFeSの電気化学的特性を明らかにした。電気化学信号の特性が電極基材に依存することを見出し、電極への酵素の吸着状態がコファクタ間の電子移動反応に影響を与えるものとして、その現象を解釈した。 第2章では、HmDHがもつFMNの分光学的特性とFeSの電気化学的特性に注目して、2つのコファクタの酸化還元電位を個別に評価することに成功し、両者のそれぞれの電位のpH依存性を明らかにした。また、還元的半反応における1モノマーあたりの反応電子数はpHに依存し、2電子受容する場合(pH < 9)と1電子受容する場合(pH > 9)があることを見出した。この性質とESRスペクトル解析をもとに、FMNの可視吸収スペクトルのピークを、相当する酸化還元種に帰属した。さらにモノマー2電子還元状態には2つの極限酸化還元状態があることを指摘し、その平衡の移動現象を見出した。先に述べたコファクタの酸化還元電位をもとに、上述の酸化還元挙動を平衡論的に説明できることを明らかにした。さらに、酵素活性のpH依存性に			

についてもコファクタの酸化還元電位のpH依存性から説明できることを示し、還元型FMNから酸化型FeSへの1電子移動反応の標準ギブズエネルギー変化量が酵素活性に大きく影響することを明らかにした。

第3章では、ストップフロー法を用いた還元的半反応の遷移状態を解析し、モノマー当たり2電子還元が行われるpH領域では、本酵素反応が基質の2電子酸化反応、FMN-FeS間の1電子移動反応、基質阻害に起因するセミキノン型FMNと基質の結合反応、という3段階の過程で構成されていることを明らかにした。一方、モノマー当たり1電子還元が行われるpHでは、基質による酸化型FMNの2電子還元の後、酸化型FeSへの分子内1電子移動反応が起こりにくくなっており、逆にモノマー間の電子移動反応が非常に速くなることを示した。これらの挙動は第2章で示した熱力学的特性とも矛盾しないことを示した。また、紫外・可視スペクトル及び蛍光スペクトル解析によって、FMN近傍のチロシンの脱プロトン化が示唆され、FMN-FeS間の1電子移動反応に関わるアミノ酸側鎖の変化もpHによる酸化還元挙動の違いをもたらす一因であることを明らかにした。

第4章では、HmDHは高基質濃度で基質阻害を示すことに注目し、その要因を熱力学および速度論的視点から論じた。HmDHのFMN近傍のアミノ酸に対して、基質阻害を示さない*Rhizobium*属由来のヒスタミン脱水素酵素の配列に近づけるような部位特異的変異導入を行った。これら変異体酵素の速度解析、紫外・可視吸収スペクトル解析及び酸化還元電位評価から、モノマー2電子還元状態におけるセミキノン型FMNの熱力学的な安定性が基質阻害に関わっていることを明らかにした。これは第3章で述べた遷移状態の解析結果とよく一致し、過剰量の基質存在下ではセミキノン型FMNに基質が結合するものの、基質の2電子酸化が進行しないことが基質阻害の原因であると結論した。

第5章では以上の知見をもとに、オスミウム錯体存在下でHmDHがヒスタミンの電気化学酸化反応の良好な触媒となり、かつ基質阻害を示さないことを見出し、数十 μM までのヒスタミンに線形応答するアンペロメトリックセンサを構築できることを実証した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

酸化還元酵素及びその触媒反応について研究する際、速度解析だけでなく熱力学的視点からも考察することは非常に有効であるものの、一般に酵素の酸化還元電位の評価が難しいことから、速度論と熱力学の両側面から酸化還元酵素反応を解釈する試みは必ずしも多くなかった。

本論文は放線菌 *Nocardioides simplex* のヒスタミン代謝の初発酵素として知られているヒスタミン脱水素酵素 (HmDH) に注目し、電気化学的および生化学的な手法を用いて、HmDH 及びその酵素反応について多面的な特性評価を試みたものである。さらに、得られた知見をもとに、基質であるヒスタミンがアレルギー反応に関与する生理活性アミンであることに着目して、ヒスタミン定量の応用研究も行っており、その評価できる点は以下の通りである。

1. HmDH が電極と直接反応することを見出し、その電極反応解析により、HmDH 分子内のコファクタ間電子移動反応が電極素材に依存することを明らかにした。
2. FMN の分光学的特性と FeS の電気化学的特性を利用して、それぞれの酸化還元電位を評価することに成功し、両者の電位の pH 依存性を明らかにした。また、多段階酸化還元状態の HmDH の FMN の紫外可視吸収スペクトルを帰属した。さらに還元的半反応におけるモノマー反応電子数が pH に依存し、2 電子受容する場合と 1 電子受容する場合があること、また、前者での 2 つの極限酸化還元状態の平衡が移動することを明らかにした。さらに、以上のような酸化還元状態変化が現れる現象をコファクタの酸化還元電位から説明できることを示した。酵素活性の pH 依存性についても本酵素の熱力学的特性から説明できることを示し、コファクタ間の 1 電子移動反応が酵素活性に大きく影響を及ぼすと結論付けた。
3. 還元的半反応の遷移状態の解析によって、本酵素反応が基質の 2 電子酸化反応、コファクタ間の 1 電子移動反応、セミキノン型 FMN と基質の結合反応という 3 段階の過程で構成されていることを示し、pH に依存した酵素反応スキームを提唱した。
4. 部位特異的変異導入した酵素の活性評価、紫外・可視吸収スペクトル解析及び酸化還元電位評価から、セミキノン型 FMN の安定性が基質阻害に大きく関わることを熱力学的及び速度論的観点から論じた。さらに、遷移状態の速度解析結果を考慮し、セミキノン型 FMN に基質が結合することが基質阻害の要因になっていると結論した。
5. オスミウム錯体をメディエータとして用いることで、基質阻害を示すことなく、HmDH を用いたヒスタミンのアンペロメトリックセンサを構築できることを示した。

以上のように本論文は、HmDH が関わるヒスタミン酸化反応及び基質阻害反応に関して熱力学的及び速度論的観点からその特性を論じた。また、ここで得られた基礎的知見をもとに、ヒスタミンセンサを作成し、その可能性を論じており、酵素化学、生化学、生物物理化学、分析化学の発展に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成22年2月12日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降