

論文内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 11 年度博士課程進学
氏名 伊東 孝祐
指導教官命 田之倉 優

論文題目

大腸菌由来アゾ還元酵素 AzoR の結晶構造解析

1. 序論

AzoR (Azo Reductase) は、アゾ化合物を分解する微生物のスクリーニングの過程で、メチルレッド、エチルレッドなどのアゾ化合物を分解する酵素として同定された大腸菌由来のタンパク質である。一般的にアゾ化合物は、製造が容易なこと、安定な化合物であることから様々な用途で幅広く大量に使用されている化合物であるが、その安定性のため、一度環境中に放出されると分解されずに環境汚染を引き起こす。具体的には、アゾ化合物は遺伝子変異を引き起こすなどの毒性があることが判っている。そのため、アゾ化合物を大量生産が可能な微生物の酵素によってマイルドな条件下で分解することが非常に重要である。

現在までの酵素学的研究により、AzoR は NADH を電子供与体、FMN を補酵素として、ping-pong Bi-Bi 機構を 2 サイクル繰り返してアゾ基を還元することにより分解することが判っている。しかしながら、これまでに AzoR のような高いアゾ分解活性をもつ酵素の立体構造に関する報告はなく、その反応の分子機構は判っていない。そこで本研究は X 線結晶構造解析により AzoR の立体構造を明らかにし、還元反応の分子機構を明らかにする事を目的とした。

2. AzoR の結晶化、および X 線結晶構造解析

結晶化はシッティングドロップ蒸気拡散法で行った。条件検討の結果、精製タンパク質濃度 45 mg/ml、100 mM HEPES - Na (pH7.5)、200 mM MgCl₂、30% v/v

iso-propanol, 1 mM FMN を含む溶液を使用して、15°C、5 日間で $0.05 \times 0.05 \times 0.2$ mm の棒状結晶を得ることに成功した。結晶学的パラメーターを計算した結果、この結晶は空間群 $P4_22_12$ 、格子定数は $a = b = 92.18 \text{ \AA}$, $c = 51.85 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ であることが判った。AzoR と相同性をもつタンパク質の立体構造はこれまでに明らかになっていなかったため、 K_2PtCl_4 を用いて重原子ラベルした結晶を作製し、SIRAS法 (Single Isomorphous Replacement with Anomalous Scattering method) によって位相を計算した。その結果、1.8 \AA の分解能で FMN との複合体の構造解析に成功した。その際のモデルの精度を表す統計値は、 $R\text{-factor} = 19.7\%$, $R_{\text{free}} = 25.1\%$ であった。これは良質なモデルが得られたことを意味する。また、結晶中の非対称単位には 1 分子存在していた。

3. AzoR の全体的構造

AzoR の全体的な構造は、中心部に 5 本の β -シートがあり、その周囲を 3 本、および 2 本の α -ヘリックスがサンドイッチした形になっている (Fig. 1)。結晶中での非対称単位ではタンパク質は 1 分子のみの存在であったが、AzoR はホモダイマーで機能発現する酵素であると考えられる。その理由として、ゲル濾過クロマトグラフィーで分子量が 2 分子分に相当すること、対称操作をすると活性部位 (FMN 周辺) に 2 分子のアミノ酸残基が寄与している構造になっていることがあげられる (Fig. 2)。つまり非対称単位に 1 分子のみ存在していたことはタンパク質の対称軸と結晶学的対称軸が一致した結果だと考えられる。

似た構造をもつタンパク質を検索した結果、アミノ酸配列の相同性が一部にしかないにもかかわらず、全体的なフォールディング、およびトポロジーは哺乳類の DT-diaphorase (EC 1.6.99.2) [電子供与体: NAD(P)H、補酵素: FAD、腫瘍治療のためのプロドラッグターゲットタンパク質として現在注目を集めている] と類似していた。



Fig. 1 AzoR 全体構造のリボンモデル

対称操作を行いホモダイマーとして表示した。

一方のモノマー分子を黒色、もう一方のモノマー分子を灰色で表示した。図の中心、紙面垂直方向に 180° 対称軸が存在することがわかる。

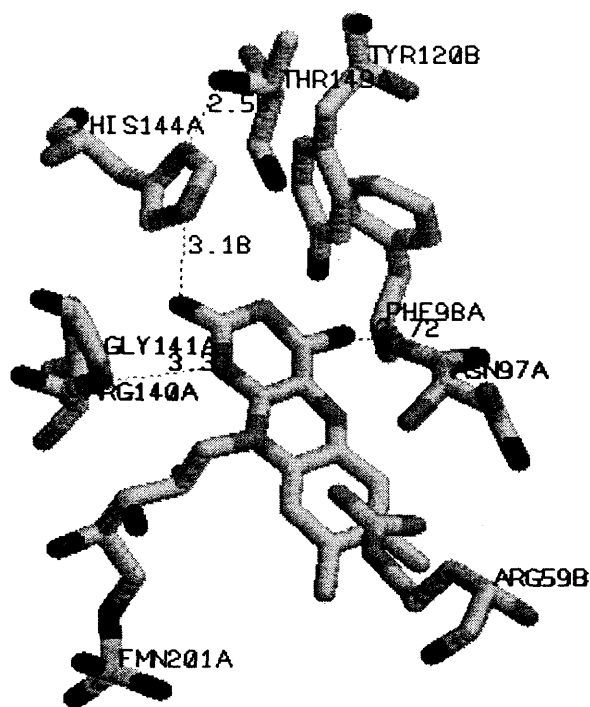


Fig. 2 活性中心部位

活性部位周辺 (FMN 周辺) のアミノ酸残基を示した。各々モノマーからのアミノ酸残基をそれぞれ A、B として表示した。両モノマー分子が活性発現に必要なことが考えられる。また、水素結合をドットラインで表示し、距離を Å 単位で表示した。

4. 活性中心部位

FMN は活性中心と考えられるイソアロキサジン環部位、リビトール部位、リン酸部位それぞれにおいて水素結合によりペプチドと結合している。また、FMN のイソアロキサジン環は、*si*-face が活性ポケットの方を向いていて、*re*-face がタンパク質側を向いていて空間が満たされており、一方向 (*si*-face) のみからしか基質が接触できない形になっている。このことは、活性部位に同時に 2 つの基質が結合できないことを示しており、ping-pong mechanism で反応が進行するという酵素学的実験から得られた結果と合致する。

5. 反応機構 (2 電子酸化還元反応) の推測

通常ヒドライドイオンにより 2 電子が供与される際には、イソアロキサジン環 N5 位をヒドライドイオンが攻撃し、N1 位に水素イオンが結合するが、本酵素中のイソアロキサジン環 N5 近辺には水素イオンを供与するようなアミノ酸残基、および水分子が存在しない。しかしながら、イソアロキサジン環 N5 位は 140Arg - 141Gly のペプチド結合の N-H と水素結合を形成している。また、イソアロキサジン環 O2 は 144His と水素結合を形成している。これらのことから、互変異性によるエノール形成をともなった反応機構を考えている (Fig. 3)。

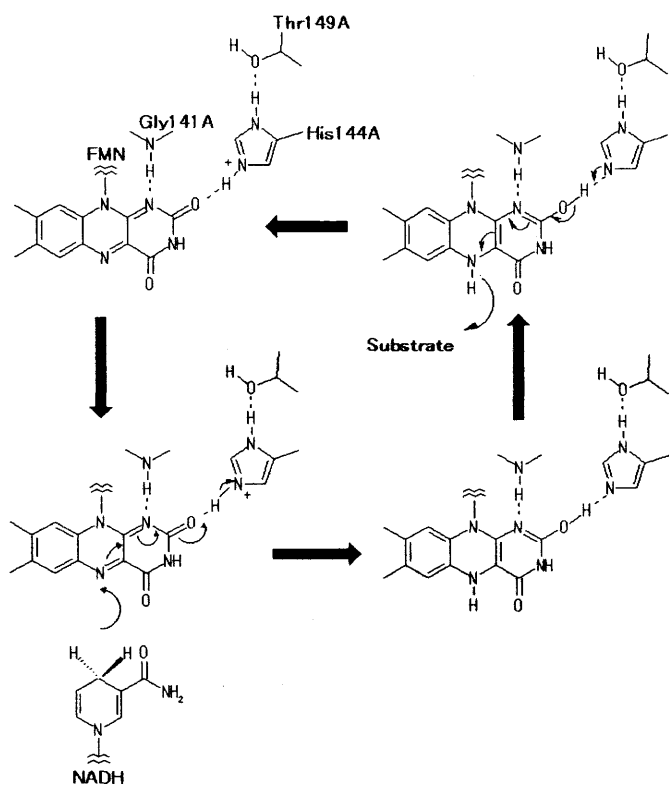


Fig. 3 反応機構（2電子酸化還元反応）の推測

6. まとめ

AzoR (Azo Reductase) は、アゾ化合物を分解する酵素として同定された大腸菌由来のタンパク質である。この酵素の X 線構造解析を行い、1.8 Å の分解能で FMN との複合体の構造解析に成功した。その結果、AzoR は相同性がほとんど無いにもかかわらず、全体的なトポロジーは哺乳類の DT-diaphorase (EC 1.6.99.2)[電子供与体：NAD(P)H、補酵素：FAD] と類似していることが明らかとなった。しかしながら活性中心付近の立体構造が異なっていた。また、AzoR はホモダイマーで機能発現していることが示唆された。本研究で解析に成功した結晶構造は、電子供与体を NADH 特異的、補酵素を FMN とする DT-diaphorase 型酸化還元酵素のはじめての例である。