

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 伊 東 孝 祐

本論文では、大腸菌由来アゾ還元酵素 AzoR (Azo Reductase) の結晶構造解析を行い、その酵素の酸化型、還元型の立体構造を、それぞれ 1.38 Å、1.8 Å の分解能で決定し、その結果から 2 電子転移の酸化還元反応の分子機構を提唱した。それは通常の FMN を媒介する反応機構とは違い、エノールフォームをとって反応が進行するというものであった。また、酸化型 AzoR、還元型 AzoR の立体構造の変化から、プロダクトインヒビション、インデューストフィット、 π - π オービタルによる基質認識のメカニズムについても考察を行っている。そして、本研究で構造解析に成功した AzoR の結晶構造は、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った。本論文は第四章からなる。

第一章では、まず、有害であり難分解性化合物であるアゾ化合物を、大量生産が可能な微生物の酵素によってマイルドなコンディションで分解、無毒化することの重要性について述べている。そして、AzoR 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、メチルレッドを分解する酵素として同定されたものであり、電子供与体を NADH 特異的とすること、補酵素が FMN であること、ping - pong Bi - Bi で反応が進行して、アゾ基を還元分解する酸化還元酵素であるということを解説している。さらに、環境問題に関することにとどまらず、AzoR の相同遺伝子が多くの微生物で保存されていることから、生体内でも重要な役割を果たしているであろうという推測もし、本研究の重要性について説明している。

第二章では酸化型 AzoR の結晶構造解析について述べている。AzoR は相同性を持つタンパク質の立体構造が報告されていないため、Pt 誘導体結晶の作製をし、SIRAS 法 (Single Isomorphous replacement with Anomalous Scattering method) によって AzoR と補酵素である FMN との複合体の立体構造を 1.38 Å の分解能で決定した方法について述べている。ここでは、AzoR の結晶化から、重原子誘導体の迅速な作製方法、構造計算について順次その結果を示しながら立体構造の決定にいたるまでの経緯、および得られた立体構造の妥当性を Ramachandran Plot などを用いながら事細かに記述してある。また、酸化型 AzoR の全体構造につきも解説してある。それは、5 本の β -シートが 2 本、および 3 本の α -ヘリックスによりサンドイッチされた構造をとっているものであった。また、温度因子の解析から AzoR は 1 本非常にフレキシブルなループを持つことも明らかにしている。

第三章では、まず酸化還元酵素ではその反応機構を解明するにあたって、還元型での立体構造決定がいかに重要なことであるかを解説し、還元型 AzoR の結晶構造解析について述べている。ここでは、第二章で構造決定に成功した酸化型 AzoR をプローブとし、分子置換法により還元型 AzoR の立体構造を 1.8 Å の分解能で決定した方法、計算について述べている。ここでも還元型 AzoR の結晶作製の方法から構造計算について詳細に述べ、そして得られた立体構造の妥当性を Ramachandran Plot、結晶学的統計値などを用いながら事細かに記述してある。また、酸化型 AzoR でゆらぎの大きかったループの電子密度が確認できなかったことを指摘し、その理由について説明している。それは、還元型の AzoR になっ

たとき、ループがフリップし、自由度が上昇したということであった。また、それは活性中心に近いことから活性発現に重要であるということも示唆するものであった。

第四章では、酸化型 AzoR の構造、還元型 AzoR の構造から多岐にわたりその構造機能相関について述べている。まず、AzoR はホモダイマーで活性発現するということを明らかにした。そして、活性中心で FMN の isoalloxazine ring の *si*-face 側からしか基質を取り込めないという事を明らかにし、AzoR の反応が ping - pong Bi - Bi 機構で進行するという、これまでに得られている酵素学的結果と、本研究で立体構造決定に成功した AzoR の構造が、構造機能相関のうえからも合致していることを明らかにした。また、活性中心にある FMN は 14 本の水素結合によってペプチドと結合しており、本酵素は FMN が非共有結合で補酵素として働くフラボプロテインであることを明らかにした。そして、類似構造を持つタンパク質についてもサーチしている。その結果、AzoR は DT-diaphorase (EC. 1.6.99.2) [電子供与体: NAD(P)H、補酵素: FAD] と似た構造を持つことを明らかにした。このことは、DT-diaphorase 型酸化還元酵素で電子供与体を NADH、補酵素を FMN とする新規構造を持つタンパク質の結晶構造解析に成功したということを示唆する。そして、なぜ AzoR と Dt-diaphorase が異なった電子供与体認識、および補酵素が結合しているのかを、トポロジー、アミノ酸配列、立体構造のあらゆる観点から考察している。その結果、AzoR の NADH 認識の機構が新規なものであるということを示唆した。つまり、新たな興味深い課題もここで提案している。次に、酸化型 AzoR と還元型 AzoR の比較をし、そこから以下のようなことを発見している。まず、FMN の isoalloxazine は還元されるとその N10、N5 を軸とし、折り曲がる構造をとることは知られているが、その方向は FMN のみが還元されたときのそれとは逆方向の折れ曲がりであることを明らかにした。そして、活性中心を覆うループが還元型になると活性中心への基質のコンタクトができやすいように開くことも明らかにした。また、活性中心のフェニルアラニンの chi 1 がフリップすることも明らかにした。そして isoalloxazine 平面からの距離が約 7Å のところにあり、基質を π - π オービタルによる基質認識に関与しているのではないかという示唆をしている。また、活性中心付近にあるチロシンの自由度が高いため、これが基質を認識の際にインディューストフィットするのではとの議論もしている。以上の様に、酵素の基質認識、プロダクトインヒビションなどについて議論できたのも還元型の結晶構造解析に成功してこそ得られた知見であろう。また、通常 FMN の isoalloxazine ring にハイドライドイオンが転移する際には N5 位を攻撃し、N1 がプロトネートする。しかしながら、AzoR 中の FMN isoalloxazine は N1 が 141Gly N-H と水素結合しており、これは還元型でも保たれるものであることを明らかにした。しかしながら、isoalloxazine O2 は 144 His の NE と水素結合しており、これは還元型でも保たれることも明らかにした。つまり、AzoR の 2 電子転移反応は、通常の反応とは違ったエノールを介した 2 電子転移反応であることを酸化型、還元型の AzoR の立体構造解析により強く示唆するものとなった。

以上のように、本研究で得られた知見は、学術上貢献するところ大であると考えられる。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。