

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 塚本 弘 毅

本論文は、一酸化窒素を亜酸化窒素へ変換する反応を触媒する酵素であるチトクローム P450nor(以後、単に P450nor と記す)に注目し、量子化学を基礎とした分子軌道法を用いて、そのユニークな反応性と活性部位周辺の立体構造との関連について考察すること、及び、酵素の機能と構造の関連性を解析する新たな手法を開発することを試みたものであり、全十三章から構成されている。

第一章では、機能性タンパク質に於ける機能と構造の関連性の解明の重要性とその具体的アプローチについて述べ、本論文の方向性とそのねらいについて述べている。

第二章では、序論として対象となる P450nor のタンパク質としての性質について触れ、これまで、P450nor に対して行われてきた様々な実験とその結果について述べている。各種分光学的実験結果から、P450nor の反応機構は中間体を持っており、この中間体は物理測定による詳細な解析が困難な電子構造であることが示されている。P450nor の反応中間体の電子構造は、その電子数が偶数個であり、これは EPR 分光法(Electron Para-magnetic Resonance Spectroscopy)ではシグナルを捕らえることができない系であり、また、中間体の lifetime も非常に短く、X 線結晶構造解析などから立体構造を解析することも困難である事について述べている。

第三章では、分子軌道法に関して、基礎的な理論から *ab initio* 法、半経験的手法、密度汎関数法について詳細に述べた。分子軌道法とは、分子軌道を Hartree-Fock や Roothaan の SCF 法を用いて求め、また、それを用いて分子の諸性質を論じる方法である。本研究では、半経験的手法である SAM1 法を用いた。半経験的手法とは、各種積分計算値を、実際に計算を行う代わりに、予め実際の分子の諸性質を実現するように定めた経験的なパラメータとして与えることで計算量の激減を図る手法である。これによって、*ab initio* 計算では適用の難しい大きな分子に対しても、容易に分子軌道を求めることができる。SAM1 法は、一般的な半経験的手法とは異なり、NDDO(Neglect of Diatomic Differential Overlap)近似を基礎にしながら、全ての積分をパラメータとして与えることはせず、1 中心及び 2 中心 2 電子反発積分は原子軌道から直接計算した値を使用している。これらの積分値は、実験データと合致するように調整されたパラメータを含む関数によってスケールされる。この関数及びパラメータ化の詳細については現在非公開である。SAM1 法の最大の利点とは、d 軌道を含む基底関数を容易に使用することができ、多くの元素に関して計算が可能な点である。

第四章では、計算に用いた P450 ヘムサイトモデルについて述べた。本モデルは、無側鎖のポルフィリン-鉄錯体及び第 5 配位子として methylthiolate を用いており、他の P450 活性部位計算モデルに広く使用されている活性部位モデルである。第 6 配位子は基本的に一酸化窒素(NO)だが、反応経路を通して変化していく。周辺タンパク質が作り出す酵素環境は総合的に無視した。鉄 3 価 NO 結合体の初期構造として、鉄 3 価 NO 結合状態にある P450nor の結晶構造

(1CL6)を使用した。また、鉄3価H₂O結合体の初期構造として、上で用いた結晶構造のNO配位子を水分子に置換した構造を使用した。

第五章では、計算の結果について詳細に述べている。本論文で示された反応経路は6つのステップから成っている。周辺環境を無視したにも拘わらず、この反応機構はP450norと同様に2個のNO分子を1個のN₂O分子へと変換し、さらに水分子1個を生成する。

第六章では、この反応機構について詳細に考察を行っている。この反応機構は、尾林らが実験結果から提唱している詳細な反応機構とほぼ合致していた。さらに、尾林らが二通りの可能性を示していた反応経路に関しては、我々の計算結果では一方の経路のみ、P450norの反応性を実現できることが示された。また、各構造A~Fのエネルギープロファイルは、構造A,B,C,Fの値が低く、構造D,Eの値が高い、山型のプロファイルを形成したとなった。これによると、P450norの酵素反応は構造D,Eによって形成されるエネルギー障壁を乗り越えて実現されることになる。しかしながら、この時、構造D,Eによるエネルギーの壁は、たかだか5kcal/molであり、P450camにおける同様の計算による結果(50kcal/mol)と比較するとかなり小さい。この事から、P450norの反応機構はエネルギー的に非常に効率が良く、そのことがP450norの高速なターンオーバー(1200s⁻¹)を実現しているのではないかと考えられる。

第七章は、第一章から第六章までのまとめを行っている。P450norの持つ特異な反応性を計算化学的に解明した結果とその考察について改めて触れ、その知見から生命の興味深い戦略について述べている。

第八章では、方法論の開発として、理論的電子密度分布とX線結晶構造解析の過程で得られる電子密度分布とを用いて、量子化学的諸量を得る方法について、その背景と目的について述べた。近年、放射光施設の高出力化に伴って、X線結晶構造解析の解像度も原子分解能程度にまで向上した。高出力な放射光を用いた高分解能解析によって得られる分子の電子密度分布は高密度な情報を有しており、従来X線結晶構造解析では見えなかった水素結合に関与しない水素原子の位置もある程度は見えるようになった。一方、量子力学的解釈から得られる1電子波動関数は、その二乗量を全空間で積分した値を電子密度として定義できる。本手法は、この高出力放射光より得られる高分解能電子密度分布と、量子力学から得られる電子密度を結びつけることによって、従来のSCF計算を用いずに、実験値を基礎とした量子化学的解析を可能にすることを目的としている。この手法により、従来の分子軌道法では対処できないような、大きな酵素分子にも適用することができる。

第九章では、本手法に於ける基礎理論と解析の流れについて詳細に述べている。電子密度は分子軌道の二乗を全空間にわたって積分したものとして定義できる。この定義より、分子軌道より電子密度を求めることができる。同時に、電子密度から分子軌道をある程度推測することも可能であることが期待される。本手法の核とは、実験によって得られた電子密度分布と、計算によって得られた電子密度分布の差の二乗値(s)を定義し、このsの値を最小にするような軌道係数の組を推測することである。本手法では、この軌道係数の組の探索に解析的手法を用いた。分子軌道の形成に用いた基底関数は、STO-3Gである。また、より高精度なフィッティングを行いたければ、より高価な基底系を使用することもできる。最小化手法としては、Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno法(BFGS法)を使用した。

第十章では、本手法の計算実験に用いた二つの分子(水素分子及び一酸化炭素分子)について述べた。水素分子は、実際にはX線結晶構造解析では得られないが理論的実験として行った。ま

た、一酸化炭素分子に関しては、現段階ではまだ実験データの切り出しが終了していないため、水素分子同様理論的に生成した一酸化炭素分子の電子密度分布を入力として、解析を行った。

第十一章では、本手法の計算実験の結果について詳細に述べた。水素分子に関しては、理論的に生成した電子密度分布を入力として、解析を行った結果、正しい軌道係数の組を得ることに成功した。また、一酸化炭素分子に関しては、現段階で最終結果へは収束していないが、 s 値は確実に減少方向に進んでおり、やがて十分な精度で収束すると期待される。

第十二章では、本手法のまとめと、今後の展開について述べている。

第十三章では、本論文全体を振り返り、構造と機能の関連性の解明における本研究の位置付けを行い、まとめとしている。

以上、本論文は、タンパク質における構造と機能の関連性の解明とその方法の開発を目的としたものであり、酵素の反応機構を量子化学的に解析する手法を確立し、これを用いて、チトクローム P450_{nor} の反応機構を明らかにしている。且つ更に、X 線結晶構造解析より得られる電子密度分布を利用した量子化学解析手法を開発し、低分子ながらもその解析法の有する高い有用性と可能性を示しており、上に述べた成果と併せて当該分野に新たな知見を与えたものとして学術上、応用上貢献するところが少なくない。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判断した。