

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 李 愚哲

本論文では、石油に含まれる硫黄化合物のジベンゾチオフェン (DBT) を分解する *Rhodococcus erythropolis* 由来の dsz 脱硫酵素群の X 線結晶構造解析を行い、その基質結合および反応機構について述べている。本論文は第一章の序論、第五章の結論を含む全 5 章からなる。

第一章の序論では、DBT が石油、特に軽油に含まれる有機硫黄化合物であり、硫黄酸化物放出による環境汚染の原因となることを説明し、DBT 分解酵素による石油の脱硫への応用性について説明している。また、dsz 脱硫酵素群はまだその立体構造解析が行われておらず、本論文は脱硫酵素の構造としてははじめての報告であると述べ、脱硫酵素群の構造解析は生物脱硫研究に大いに役立つものと説明している。

第二章では、脱硫反応の第一ステップを担う DszC の結晶構造について述べている。DszC の構造解析はアポ酵素結晶、基質 FMN との複合体結晶を用いた分解能 2.6Å の X 線回折データから行っている。その結果、DszC はアミノ酸配列の相同性が 30% 以下であるアシル CoA デヒドロゲナーゼ (ACAD) と全体構造は類似するものの、活性部位を囲むループ構造の違いにより、補酵素が FAD (ACAD) から FMN に変わると説明している。また、C 末端のループ構造が ACAD の基質結合ポケットに相当する部位を封鎖しており、基質の DBT が FMN と同じ経路で活性中心に導入されることを示している。DszC と FMN との複合体構造では FMN のイソアロキサジン環の si 面に His92、His391、Tyr96 などの残基が位置し、酵素活性において重要な残基であることを示している。さらに、変異体の解析により H92A 変異体が活性を有しないことから触媒に関わる重要な残基であることを見出している。FMN 結合ポケットの奥には DBT が結合する空洞が存在することから DBT の結合モデリング解析を行った結果、Gly91、Gly95、Gly164 残基が DBT の結合に重要であることも示している。

第三章では、脱硫反応の第二ステップを触媒する *Bacillus subtilis* 由来の BdsA の結晶構造について述べている。セレノメチオニン化された BdsA を結晶化し、異常分散効果を用いた分解能 2.4Å の構造解析に成功している。その構造から BdsA は四量体を形成し各々のサブユニットは TIM バレル、 β ヘアピン、 α ヘリックスバンドルにより構成されていると分析している。各サブユニットの重ね合わせでは、 α ヘリックスバンドルが Val304、Gly373 残基付近を軸にした hinge motion を示すことからドメイン間の動きにより反応中間体を溶媒から保護する反応機構を提唱している。また、BdsA と基質の FMN、DBT スルホンとのドッキングシミュレーション解析を行い、その結合部位を特定することに成功

している。この結果から BdsA の His156、Arg159、Tyr160 残基が FMN のリン酸基を認識する、FMN 結合モデルを提唱している。また、DBT スルホンの結合部位は N 末端のループ部位に位置し、二量体を形成するサブユニットからドメイン交換された β ヘアピンが基質結合部位の形成にも関わっていることを示している。

第四章では、脱硫反応の最終ステップを担う DszB の構造について述べている。本章では重原子同型置換法による構造解析により DszB の結晶構造を分解能 1.8Å で決定している。また、DszB の C27S 変異体と基質 BPSi との複合体の結晶構造解析にも成功している。DszB の構造からは DszB が二つの α/β ドメインからなる球状タンパク質であり、その立体構造上、基質結合ファミリーに属することから DszB が基質結合タンパク質から進化した酵素であることを示している。また、DszB の C27S 変異体と基質との複合体結晶構造では、基質のビフェニル環が Phe61、Phe203、Pro28、Trp255 残基と疎水性相互作用により結合していることを明らかにしている。そして基質の結合により、Ser27 残基と His60 残基が基質のスルフィン酸を介した水素結合を形成することを見出している。この知見から、基質の結合により活性中心には触媒残基の Cys27、His60 残基が Cys-His 対を形成することを示し、thiolate-imidazolium 対の求核反応によるアシル中間体形成を介した触媒機構を提唱している。また、Cys-His 対に立体構造上隣接している Arg70 残基は反応中間体の負電荷を中和する oxyanion hole として働くことも示している。

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。