



Title	Protein engineering of plant sulfite reductase : A study on its substrate recognition and redox property
Author(s)	中山, 雅登
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/2249">https://hdl.handle.net/11094/2249</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	なか やま まさ と 中 山 雅 登
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 7 6 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 14 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻
学 位 論 文 名	植物亜硫酸還元酵素の基質認識とレドックス特性の蛋白質工学的研究 Protein engineering of plant sulfite reductase: A study on its substrate recognition and redox property.
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 長谷 俊治  (副査) 教 授 谷澤 克行 教 授 福山 恵一

### 論 文 内 容 の 要 旨

植物亜硫酸還元酵素 (SiR: E.C.1.8.7.1) は、 $[4\text{Fe-4S}]$  クラスターとシロヘムを持つ単量体酵素で、亜硫酸 ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) を硫化物イオン ( $\text{S}^{2-}$ ) へ、また亜硝酸 ( $\text{NO}_2^-$ ) をアンモニウムイオン ( $\text{NH}_4^+$ ) へと 6 電子還元する。SiR は葉緑体ストロマに存在し、還元反応に必要な電子をフェレドキシン (Fd) から受け取る。基質はヘム鉄に結合した状態で、2 電子還元により S-O や N-O 結合の酸素が 1 原子ずつ解裂して水分子として遊離し、この過程が 3 回繰り返されて全反応が完結すると考えられる。この還元反応過程や補欠分子間の電子移動、亜硫酸への強い親和性を決定する構造的要因等、SiR の反応機構に関する詳細な研究はまだ行われていない。

近年、大腸菌 SiR ヘムサブユニットの X 線結晶構造が解かれ、シロヘム活性中心近傍の保存性の高い 4 残基の塩基性アミノ酸が、基質認識や還元過程に重要な役割を担うことが示唆された。SiR の基質認識と還元機構の構造・機能相関を解明を目指して、トウモロコシ SiR の塩基性残基を部位特異的置換した改変体を作製し、酵素学的解析を行った。また、野生型 Fd に加え、酸化還元電位が変化した Fd 改変体を電子キャリアーに用いて、SiR への電子移動や還元反応の比較解析も行った。

部位特異的置換により、SiR 改変体、R193E、R193A、K276Q、K278N を得た。活性測定の結果、改変体は全て亜硫酸還元活性を失っていたが、亜硝酸に対しては R193A は強い基質親和性を、R193E は強い活性を、それぞれ示した。結果として、SiR のシロヘム近傍の塩基性残基が基質の認識と還元に重要であることを実験的に初めて示した。

高電位 Fd 改変体 S46G に依る SiR の酵素活性は、ヒドロキシルアミン以外の基質では検出されなかった。S46G の SiR に対する電子移動は極端に遅いこと、ヒドロキシルアミンと他の基質は SiR の同一サイトで還元されること、また S46G と野生型 Fd では SiR との複合体形成に有意な差はないことが実験的に確認された。SiR 改変体でも S46G を用いて SiR 野生型と同様な解析を行ったところ、そのヒドロキシルアミン還元活性が亜硫酸によって競争的に阻害され、亜硫酸に対する親和性が残留することが判明した。さらに S46G からの電子移動速度が野生型 Fd よりも速い SiR 改変体も確認された。

以上のことから、SiR にとって活性中心近傍塩基性アミノ酸は、基質の結合やその還元反応の進行、補欠分子の電位や分子内の電子移動経路を左右する重要な因子であることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

中山雅登君は、植物亜硫酸還元酵素の蛋白質工学的研究を行い、1) 鉄硫黄クラスターとシロヘムを保持した活性型の野生型および変異型酵素の作製法を確立し、2) 補欠分子族であるシロヘム近傍の塩基性アミノ酸群が亜硫酸と亜硝酸の特異的認識と還元反応の駆動に必須であること、及び3) 本酵素の触媒機能を規定しているレドックス特性が電子供与体であるFdの酸化還元電位により制御できること、をはじめて明らかにした。これらの業績は、亜硫酸や亜硝酸等の酸素原子を活性化するヘム酵素の反応機構に新地見を提出したものであり、博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。