

Title	Structural Studies on Cu,Zn-Superoxide Dismutase from Spinach
Author(s)	北川, 康行
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/11094/2496
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	北 川 康 行
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 7 6 1 7 号
学位授与の日付	昭 和 6 2 年 3 月 2 6 日
学位授与の要件	理学研究科高分子学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	ハウレン草 スーパーオキシドジスムターゼの構造化学的研究
論文審査委員	(主査) 教授 勝部 幸輝 (副査) 教授 中村 晃 教授 小林 雅通 助教授 田中 信夫

論 文 内 容 の 要 旨

スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)は、スーパーオキシド(O_2^-)を過酸化水素(H_2O_2)と酸素(O_2)に変える不均化反応を触媒し、酸素毒より生体を防御する上で重要な役割を担う酵素である。本研究では、ハウレン草よりCu, Zn型SODを抽出、精製し、その一次構造決定をもとに、X線による立体構造解析を行った。

抽出、精製は、硫酸分画、DEAE-Sepharose CL-6Bを用いたイオン交換クロマト、Sephacryl S-200によるゲル濾過、ヒドロキシルアパタイトカラムを用いた吸着クロマトにより行った。

一次構造の決定は、N末端よりの配列に関しては、BrCN分解と2種の酵素(リシルエンドペプチダーゼ、V8プロテアーゼ)による酵素分解を利用し、C末端側の配列に関しては、ヒドラジン分解、カルボキシペプチダーゼYによる酵素分解を利用して行った。この結果、ハウレン草SODは、154残基のアミノ酸より構成されることがわかった。

X線による立体構造解析は、2種の重原子誘導体($K_3UO_2F_5$, $K_2Pt(NO_2)_4$)を用いた重原子同型置換法と分子置換法を組み合わせを行い、一次構造を参考にして電子密度図を解釈し、分子モデルを作製した。原子座標は、Hendrickson-Konnertの方法により、2Å分解能で精密化され、結晶学的なR因子は24.9%となった。

2価の金属イオンとして活性中心を形成する銅と亜鉛は、電子数にひとつしか差がないため、通常の電子密度図上で区別することは難しかったが、両金属の異常分散効果の違いを利用し、波長可変のシンクロトロン放射光を使って、明確に区別することができた。銅は歪んだ平面4配位で、配位子は、His-46, -48, -63, -120であり、亜鉛は正4面体に近い配位をし、その配位子は、His-63, -71, -80,

Asp-83であった。両金属は、6.1Å離れており、His-63のイミダゾールリングによる橋渡しされている複核錯体の構造をとっていた。また、ホウレン草SODの全体の構造は、8本の逆平行β鎖より成るβバレルと3つのループより構成されていることがわかった。

次に、すでに解析報告のある牛のCu, Zn型SODの座標を用いて、動物種と植物種間での立体構造の比較を行った。対応するCα原子間のずれを示すr.m.s.差は1.5Åで、全体の構造、活性中心近辺、2量体形成時の接触領域についてはよく似ていた。構造の異なる箇所においては、アミノ酸残基の挿入のために長くなったペプチド鎖を安定化させる水素結合の形成や、残基間の相補置換が見られた。

9種の一次構造をもとに作成したCu, Zn型SODの分子系統樹においては、進化速度が、見かけ上、一定とは言い難く、近年になるにつれて速くなってきており、大気中の酸素濃度と正の相関が見られた。

論文の審査結果の要旨

スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)は、活性酸素より生体を防御する重要な酵素である。これまでに、活性部位に含む金属の種類によって、Cu, Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SODの3種類が知られている。本論文では、ホウレン草よりCu, Zn-SODを抽出、精製し、その一次構造、三次構造及び四次構造を決定し、生物種間におけるSODの構造の類似点及び相違点を検討することによって、SODの構造と機能との関係を明らかにしている。一次構造の決定は、SODをBrCN及び数種の酵素で分解して生じたペプチド断片のアミノ酸配列を、気相シーケエンサーを用いた自動エドモンド法で決定することによって行い、本酵素が154アミノ酸残基からなることを明らかにした。植物種のSODの一次構造決定は、本論文が最初である。三次構造及び四次構造は、X線結晶解析法によって決定している。2種の同型置換体を用いた同型置換法によって得られた電子密度分布を、分子置換法の原理を応用した新しい方法を用いて精密化し、その解釈を容易にした。また、SOD分子中に存在するCu²⁺とZn²⁺の区別は、波長可変のシンクロトン放射光で、両イオンの吸収端近くの波長を用いて異常分散効果を測定し、異常分散差フーリエ合成によって行っている。この方法は、独創的なもので、今後、原子番号の近い金属を、X線結晶解析法で区別する一般的方法になるものと思われる。このようにして決定された構造は、8本のβ鎖からなるβバレルと3本のループからなっている。Cu²⁺は4つのHisと、Zn²⁺は3つのHisと1つのAspと結合し、Cu²⁺とZn²⁺はHisのイミダドール環を介して結ばれている。すでに立体構造が解析されている牛血液のCu, Zn-SOD及び一次構造既知の8種のCu, Zn-SODと、今回解析したホウレン草のCu, Zn-SODの構造とを比較することによって、Cu²⁺より5Å離れた所に位置するArg-143が、機能発現に重要な役割を果していることを示唆している。また、アミノ酸置換に伴う立体構造変化をも詳細に検討している。本論文は、X線結晶解析によるタンパク質構造の精密化に対し独創的な新しい方法を提供して、SODの精密構造を決定し、SODの構造と機能との関係について新しい多くの知見を得ているので、理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。