

Title	Three-Dimensional Structure and the Reaction Mechanism of the Fungal Peroxidase from <i>Arthromyces ramosus</i>
Author(s)	國島, 直樹
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38844
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	くにしま なお き 國 島 直 樹
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 1 1 2 2 1 号
学位授与年月日	平成 6 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物化学専攻
学位論文名	Three-Dimensional Structure and the Reaction Mechanism of the Fungal Peroxidase from <i>Arthromyces ramosus</i> (真菌 <i>Arthromyces ramosus</i> 由来ペルオキシダーゼの立体構造 と反応機構)
論文審査委員	(主査) 教授 松原 央 (副査) 教授 福井 俊郎 教授 長谷 俊治 助教授 福山 恵一

論 文 内 容 の 要 旨

ペルオキシダーゼ [EC1.11.1.7] は過酸化水素 H_2O_2 による種々の水素供与体の酸化反応を触媒するヘム蛋白質であり、代表的な酸化還元酵素としてその速度論的性質等が古くから研究されてきた。本酵素は分子量 3 万—5 万の単一鎖蛋白質で、一分子の鉄 (III) プロトポルフィリン IX を非共有結合的に含んでいる。本酵素の触媒する酸化反応は三段階の素反応から成る。本研究では X 線結晶構造解析により得た真菌 *Arthromyces ramosus* 由来ペルオキシダーゼ (ARP) の立体構造をもとに、本酵素反応の最初の段階である compound I 形成反応の機構について論議した。このため ARP の立体構造を、ついで反応中心であるヘム鉄に基質類似体を結合させた ARP の立体構造を決定し、得られた構造情報をもとに ARP における compound I 形成反応の機構を推定した。ペルオキシダーゼの立体構造は ARP の他に、チトクロム c ペルオキシダーゼ (CCP) およびリグニンペルオキシダーゼ (LiP) のものが報告されている。これら 3 種の酵素の compound I 形成反応の速度や速度の pH 依存性などはそれぞれ異なっている。そこで ARP・CCP・LiP の立体構造を比較することにより、これらの反応の性質の違いの原因を明らかにした。

ARP の結晶構造は重原子同型置換法で解き、7.0—1.9 Å 分解能の反射を用いて R 値 17.4% まで構造を精密化した。その結果、本酵素中の 9—344 番のアミノ酸を含むペプチド部分、およびヘムに加えて 2 箇所のカルシウム結合部位、Asn 結合型糖鎖の一部、および 246 の結合溶媒分子が明瞭に同定できた。ARP の基本的な構造は CCP および LiP のそれらと共通である。ARP のヘム鉄は完全なる 5 配位構造をとっていた。また本酵素はヘム鉄にアンモニアを結合して低スピン複合体をつくる。ペルオキシダーゼにおいて X 線解析により 5 配位構造が確認されたのはこれが初めてである。またヘム鉄にアンモニアが配位することはヘム鉄の酸化還元電位が高いことを意味すると考えられる。

ARP の compound I 形成反応機構を明らかにするためヘム鉄に三ヨウ素イオン (I_3^-) を結合した複合体の立体構造を 2.2 Å 分解能で決定した。その結果、ARP の compound I 形成反応は、以前に報告されている CCP の compound I 形成反応機構では説明できないことがわかった。そこで反応中間体の詳細なモデルをコンピューターグラフィックスを用いて検討した。その結果 ARP の compound I 形成反応では、CCP の場合と違い、反応の進行のためには活性部位ヒスチジンのイミダゾール環の回転が必要で、この回転が compound I 形成反応の律速段階になっていると考えられる。また ARP での活性部位アルギニンの役割は、CCP で指摘されている O—O 結合の異種の開裂を助けることに加えて、反応全体を通して基質のコンフォメーションを反応に都合の良いように固定することであることがわかった。

論文審査の結果の要旨

国島君は、 H_2O_2 による各種水素供与体の酸化反応を触媒するペルオキシダーゼの反応機構を解明すべく、菌体外酵素を真菌 *Arthromyces ramosus* より単離、結晶化に成功した。とくに注意した点は初期培養液からの酵素の精製と、結晶成長に seeding を旨く利用したことである。立体構造は結晶の重原子同型置換法で解き、酵素の 9-344 番目のアミノ酸を含む部分、およびヘム、2ヶ所の Ca 結合部位、Asn 結合糖鎖の一部と結合溶媒分子を明瞭に同定した。ヘム鉄が完全な 5 配位構造をとること、ヨウ素誘導体の立体構造解析から初期反応で形成される Compound I の新しい反応形式を提出し、従来のもものと比べてより明解な示唆を与えることに成功した。以上の結果、この論文は博士(理学)の学位論文として十分に価値あるものと認める。