

Title	銅型亜硝酸還元酵素における電子移動反応の研究
Author(s)	徳力格爾
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42495">https://hdl.handle.net/11094/42495</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	徳力格爾
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 15965 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科化学専攻
学位論文名	銅型亜硝酸還元酵素における電子移動反応の研究
論文審査委員	(主査) 教授 鈴木晋一郎  (副査) 教授 海崎 純男    教授 中村 春木

### 論文内容の要旨

脱窒菌由来の銅型亜硝酸還元酵素 (NIR) は、 $\text{NO}_2^-$  から  $\text{NO}$  への 1 電子還元反応を触媒する酵素である。従来の知見によると、この酵素は分子量 3 万 5 千の単一サブユニットからなる三量体であり、各サブユニットにはタイプ 1 銅とタイプ 2 銅が 1 個ずつ含まれている。そして、タイプ 1 銅は電子供与タンパク質から電子を受け取る部位で、タイプ 2 銅はその電子をタイプ 1 銅から受け取り、 $\text{NO}_2^-$  を還元する部位と理解されている。しかしながら、NIR への電子供与タンパク質が明らかになっているものは少なく、また、NIR の 2 つの銅部位間のタンパク質内電子移動反応の詳細や、この電子移動反応と、次に起こるタイプ 2 銅における基質触媒反応との相関性などは、本酵素を理解する上で重要であるにもかかわらず解明されていない。

そこで本研究では、2 つの菌種、メタノール質化性脱窒菌 *Hypomicrobium denitrificans* A3151 と脱窒菌 *Alcaligenes xylooxidans* GIFU 1051 からの NIR (それぞれ Hyp-NIR と Axx-NIR) を用いて、電気化学的手法による生理的電子供与体の検討、パルスラジオリシス法を用いたタンパク質内電子移動反応の検討を行った。

#### 1) 電子伝達タンパク質と NIR 間の電子移動反応

NIR の電子供与体の候補として、それぞれの菌種から Hyp-Cyt<sub>c550</sub> と Axx-Cyt<sub>c551</sub> を単離精製した。これらはいずれも分子量約 1 万で、6 配位の低スピン型ヘムを 1 つ持つ c 型ヘムタンパク質である。サイクリックボルタメトリー法を用いて、Hyp-Cyt<sub>c550</sub> と Hyp-NIR 間、および Axx-Cyt<sub>c551</sub> と Axx-NIR 間の電子移動反応速度をそれぞれ測定した。これらの Cyt c は、既に報告されている NIR の電子供与体 (ブルー銅タンパク質) と同様な速度で速やかに電子を渡すことから、それぞれの NIR の生理的電子供与タンパク質であると推定された。一方、Hyp-NIR の分光学的データから、この酵素はサブユニットあたりタイプ 1 銅 2 個、タイプ 2 銅 1 個を含むと考えられ、新奇的 NIR であることが本研究で明らかになった。

#### 2) NIR におけるタンパク質内電子移動反応

パルスラジオリシスを用いて、Axx-NIR 中のタイプ 1 銅からタイプ 2 銅への電子移動反応速度定数 ( $k_{\text{intra-ET}}$ ) の pH 依存性を調べたところ、基質存在下では  $k_{\text{intra-ET}}$  の pH プロファイルはベル型を示した。これを  $\text{NO}_2^-$  還元反応速度定数の pH プロファイルと比較すると、両者は良く一致しており、これらの 2 つの反応が連係していることが明らかになった。ベル型のプロファイルには、NIR のタイプ 2 銅活性部位周辺の水素結合ネットワークを形成しているアミノ酸残基 (Asp と His) のプロトン解離が、関与していることが推定された。一方、Hyp-NIR では、基質不在の

条件下では分子内電子移動が起こらなかった。基質が存在すると初めて分子内電子移動反応が観測されたが、A<sub>xg</sub>-NIR と比べると非常に遅いことが分かった。これは、Hyp-NIR のタイプ 2 銅の酸化還元電位はタイプ 1 銅よりも負側にあり、基質がタイプ 2 銅に結合することによってタイプ 1 銅の電位に近くなるために電子移動が起こると考えられた。また、Hyp-NIR の酵素活性と  $k_{\text{intra-ET}}$  の pH 依存性は、A<sub>xg</sub>-NIR のようにベル型にはならなかった。Hyp-NIR の結晶構造解析は未だ行われていないが、A<sub>xg</sub>-NIR の酵素活性やタンパク質内電子移動で重要である水素結合ネットワークが、Hyp-NIR では少し異なっている可能性もある。

#### 論文審査の結果の要旨

脱窒菌由来の銅型亜硝酸還元酵素は 2 種類の銅イオンを含み、電子供与体から 1 電子受け取り、基質である亜硝酸イオンを一酸化窒素に還元する酵素である。徳力格爾君は、2 つの脱窒菌、*Alcaligenes xylosoxidans* GIFU 1015 と *Hyphomicrobium denitrificans* A3151 からの還元酵素について、両酵素の電子供与体がいずれもシトクロム *c* であること、それぞれの酵素中の 2 種類の銅間の酵素内電子移動反応と基質還元反応が相互に連係して触媒反応が起こっていることを明らかにした。また、後者の脱窒菌からの還元酵素が、従来報告されている酵素と銅の数が異なる新奇なものであることを見出した。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。