

Title	CONCERTED EFFECT OF NH...S HYDROGEN BONDING AND CONFORMATIONAL CHANGE IN CYTOCHROME P450 SYSTEM
Author(s)	甲角, 幸秀
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45603
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	甲 角 幸 秀
博士の専攻分野の名称	博士 (理 学)
学位記番号	第 19074 号
学位授与年月日	平成 16 年 12 月 10 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科高分子科学専攻
学位論文名	CONCERTED EFFECT OF NH \cdots S HYDROGEN BONDING AND CONFORMATIONAL CHANGE IN CYTOCHROME P450 SYSTEM (Cytochrome P450 における活性中心の構造変化に伴う NH \cdots S 水素結合の機能解明)
論文審査委員	(主査) 教授 上山 憲一 (副査) 教授 月原 富武 助教授 山本 仁 講師 岡村 高明

論 文 内 容 の 要 旨

一酸素挿入反応を触媒する Cytochrome P450 は、Cys 残基が配位したヘム鉄を活性中心に持つ金属酵素である。*Pseudomonas putida* 由来の P450cam では 5 配位 Fe(III)状態、putidaredoxin (Pdx) と結合して反応に必要な電子を受け取り、酸素が配位した 6 配位 Fe(II)状態になる。最近、Pdx との結合だけで P450cam のヘム鉄の状態が変化することがわかってきた。結合部位表面の残基の構造変化がどのようにして活性中心の鉄イオンの状態を制御しているのかは明確ではない。

P450 モデル錯体の研究から、NH \cdots S 水素結合がヘム鉄の電子状態を制御していることが明らかにされた。P450cam の結晶構造からも、配位 S 原子へ主鎖アミド基からの水素結合の形成が示唆され、その周囲の残基がループ構造 (Cys ligand loop) をとっている。この Cys ligand loop は、続く α ヘリックスと一体にならず、独立した状態になっている。このため、ループ構造のアミド C=O 基が外側を向き、Pdx との結合残基と水素結合ネットワークで結ばれていた。Cys ligand loop は、Pdx との結合により、水素結合ネットワークと NH \cdots S 水素結合を通してヘム鉄に電子を伝えるのに適した構造と考えられる。

本研究では、この Cys ligand loop に注目し、構造変化に伴うヘム鉄の状態変化と NH \cdots S 水素結合との関係について、化学的および生化学的に調べた。まず、Cys ligand loop の外側から影響を受ける NH \cdots S 水素結合がヘム鉄に与える影響を調べるために、5 配位 Fe(III) Cys ligand loop モデル錯体と、配位子の外側に向けた C=O 基と相互作用可能な化合物を添加して、複合体形成時の錯体の状態変化を調べた。その結果、Cys ligand loop のアミド平面の回転により生じる NH \cdots S 水素結合の変化が、錯体の安定性や酸化還元電位に影響を与えることがわかった。

また、この 5 配位 Fe(III) Cys ligand loop モデル錯体を、P450 と同じく還元することで 5 配位 Fe(III)状態から 6 配位 Fe(II)状態にすることができた。今までの錯体の研究から、NH \cdots S 水素結合は Fe(III)状態は安定化するが Fe(II)状態は安定化しないということがわかっている。つまり、鉄の酸化状態により NH \cdots S 水素結合の効果が異なり、Cys ligand loop の flexible な構造が酸化状態に応じ NH \cdots S 水素結合の変化させ水素結合の切断で Fe(II)を安定化させたと考えられる。

さらに高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 から抽出した P450Tth と *T. thermophilus* [7Fe-8S] ferredoxin

(FdTt) が熱に安定な新たな P450 系であることがわかった。P450Tth の結晶構造解析と P450Tth-FdTt の相互作用予測から、P450cam と同様に、FdTt との結合残基と水素結合ネットワークで結ばれた Cys ligand loop と NH \cdots S 水素結合によってヘム鉄が制御される分子機構が見つかった。

本研究により、P450 に見られる Cys ligand loop は、NH \cdots S 水素結合をサポートするだけではなく、redox partner の結合時や様々な酸化状態のヘム鉄を制御させるために必要な構造であり、その構造はペプチドモデルで作られているヘアピンターン構造と α ヘリックス構造との中間にあり、いずれにも変わりうるものと推定するに至った。

論文審査の結果の要旨

本論文は、酸素添加酵素として重要な P450 の酵素反応サイクルで、Fe(III) と Fe(II) の還元反応における NH \cdots S 水素結合の形成と切断がタンパク質の局所部分のペプチド鎖の構造変化と直接に関与していることを実験的に示し、酵素反応が個々の中間体を一度安定化させていることを錯体化学的にも明らかにした。本論文は、P450 酵素の硫黄配位原子への水素結合が反応を制御している機構を明らかにしたものであり、博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。