



|              |                                                                                                                                                                                                                    |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | The Thermal Stability and Coenzyme Binding of the Oxidoreductases : Crystal Structures of Cytochrome c552 and 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase                                                             |
| Author(s)    | 中村, 昇太                                                                                                                                                                                                             |
| Citation     | 大阪大学, 2006, 博士論文                                                                                                                                                                                                   |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                    |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/46531">https://hdl.handle.net/11094/46531</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">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="#">ご参照ください</a> 。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名 なか むら しょう た 中 村 昇 太

博士の専攻分野の名称 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 第 20241 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 18 年 3 月 24 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

薬学研究科分子薬科学専攻

学 位 論 文 名 The Thermal Stability and Coenzyme Binding of the Oxidoreductases :  
Crystal Structures of Cytochrome c552 and 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid  
Dehydrogenase  
(酸化還元酵素の熱安定性と補酵素結合に関する構造学的研究: チトク  
ローム c552 と 3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素の X 線結晶構造)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 宇野 公之

(副査)

教 授 田中 徹明 教 授 今西 武 教 授 小林 資正

助教授 大久保忠恭

### 論 文 内 容 の 要 旨

近年、構造生物学は大きな発展を遂げた。Photon Factory や SPring-8 などの放射光施設が建設され、生体高分子の構造解析における高輝度 X 線の有用性が認識されると、実験室レベルの X 線回折装置においても大幅に高輝度化が進んだ。その結果、遺伝子技術の発展と併せ、構造解析の高分解能化と迅速化が果たされた。また、この発展により数多くの立体構造が決定されデータベース化されたことによって、比較研究が可能になり、生体高分子の機能や安定性と構造との相関を詳細に解析できるようになりつつある。そのような状況のなか、本研究では 2 種類の酸化還元酵素、(I) チトクローム *c* と (II) 脱水素酵素を選び、その高分解能 X 線結晶構造解析を通じて構造熱安定性相関と酵素活性に関わる構造変化機構を明らかにした。

#### I. チトクローム *c* をモデルにした蛋白質の構造-熱安定性相関研究

微生物は 100°C 以上の高温から 0°C 以下の低温に至るまで様々な環境で生育している。好熱菌の蛋白質は高温環境に適応するために、常温菌の蛋白質と同様の機能を維持しつつ、より熱安定性を向上させていると考えられている。蛋白質の熱安定化機構を解明するために、私はチトクローム *c* をモデルとした構造-熱安定性相関の研究を行ってきた。チトクローム *c* は多くの生物に高い相同性で保存されているため、幅広い生物種から選択が可能である。その中から、至適生育温度が 37°C である *P. aeruginosa* 由来のチトクローム *c* (PA)、52°C である *P. hydrognothermophila* 由来のチトクローム *c* (PH)、72°C である *H. thermophilus* 由来チトクローム *c* (HT) の 3 種を比較対象として用いた。

X 線結晶構造解析により PH の立体構造を 2.2 Å の分解能で決定するとともに、CD を用いた熱力学的解析により PA、PH、HT の熱安定性を評価した。さらにすでに立体構造の報告されている PA、HT との詳細な比較を行った。その結果、3 種の熱安定性の差を特徴付けているアミノ酸 5 残基を同定し、各残基が熱安定化に寄与する機構を明らかにすることができた。5 残基中 1 残基が PA と、3 残基が HT と同じである PH は、PA と HT の中間的な熱安定性を示した。また得られた熱安定化機構を検証するため、5 残基の系統的な変異体作製を行い、それらの熱力学的解析を行った。その結果、HT の 5 残基に相当する変異を入れた全ての PA 変異体において、熱安定性の増加が見られ、

その増加には加成性が見られた。一方、PA の 5 残基に相当する変異を入れた全ての HT 変異体では熱安定性が減少し、さらにその不安定化の度合にも加成性が見られた。以上の結果より、これら 5 残基による熱安定性への寄与には安定化、不安定化の両方向に加成性が成立することが明らかとなった。またこれら 3 種のチトクローム *c* 固有の熱安定性がわずか 5 残基によって決定されていることを示した。

## II. 脱水素酵素の補酵素結合によるヘリックス構造安定化機構の解明

*Pseudomonas* SP.B-0831 株由来 3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素 (Ps3 $\alpha$  HSD) は、様々なステロイド化合物を基質として、水酸基とケト基間の変換反応を補酵素依存的に触媒する酸化還元酵素である。またその基質特異性は幅広く、ステロイド骨格だけでなく、非ステロイド骨格の *p*-ニトロベンズアルデヒドなどの基質も酸化還元できる。このカルボニルリダクターゼ活性は細菌の生体異物代謝の初期過程に関与しており、生体防御機構として重要である。この Ps3 $\alpha$  HSD の反応機構を解明するために、私は Ps3 $\alpha$  HSD の結晶構造解析を行った。

構造解析の結果、分解能 1.8 Å の NADH 結合型 Ps3 $\alpha$  HSD の結晶構造を決定した。得られた結晶構造では、非対称単位中にダイマーとして存在しており、興味深いことに補酵素 NADH は、片方のモノマーのみに結合していた。NADH が結合していないモノマーにおいては、基質結合ポケット付近の残基番号 185-207 の領域で電子密度が観測されず、その領域はフレキシブルなループ構造をとっていると考えられた。一方、NADH が結合していたモノマーにおいては、この領域に 2 本の  $\alpha$ -ヘリックスの形成が見られた。結晶構造中における補酵素 NADH と Ps3 $\alpha$  HSD との相互作用を解析した結果、補酵素結合に伴うループから  $\alpha$ -ヘリックスへの構造変化は、Val186、Thr188 と NADH との相互作用によって引き起こされることが明らかになった。また形成された 2 本の  $\alpha$ -ヘリックスは基質結合ポケットに存在する多数の水分子と水素結合ネットワークを形成していた。これら水分子も 2 本の  $\alpha$ -ヘリックス構造の安定化要因であることが示唆された。

CD 測定により、溶液中においても NADH 濃度依存的に  $\alpha$ -ヘリックス含量の増加が見られたことから、基質結合の有無に関わらず補酵素 NADH の結合だけにより、2 本の  $\alpha$ -ヘリックスが形成することが示された。基質結合ポケット付近で生じる、ループから  $\alpha$ -ヘリックスへのダイナミックな構造変化が Ps3 $\alpha$  HSD の幅広い基質選択性に寄与していることが示唆された。以上の結果から反応機構を考察した。酸化還元反応時には、まず NADH の結合によって 2 本の  $\alpha$ -ヘリックスが形成され、基質結合ポケットには水分子が入り、その後、基質が水分子と交換し、2 本の  $\alpha$ -ヘリックスによって NADH の近傍に捕捉され酸化還元反応が遂行されるという機構を提唱した。

以上 2 種類の酸化還元酵素の構造学的研究から、チトクローム *c* をモデルにした構造-熱安定性相関研究では熱安定性に寄与する 5 残基を同定し、3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素の構造学的研究からは、補酵素結合に伴う構造変化に寄与する 2 残基を同定することができた。蛋白質の安定性や補酵素結合に伴う構造変化が、わずか数残基で説明できるという大変興味深い知見が、この研究を通して得られた。

## 論文審査の結果の要旨

本研究で申請者は X 線結晶解析を主に構造生物学的アプローチにより 2 種類の酸化還元酵素、チトクローム *c* とステロイド脱水素酵素に関して蛋白質の熱安定化機構と基質・補酵素認識機構の解明を行った。熱安定化機構に関しては 3 種類の生育温度の異なる菌由来のチトクローム *c* を用いて安定性に関与する熱力学的パラメータの解析と立体構造の詳細な比較検討により熱安定性の差を特徴付けているアミノ酸残基を同定した。さらに系統的に作成した変異体の研究により安定化に加成性が成立することを見出し熱安定化機構のモデルを提出した。基質・補酵素認識機構に関しては生体異物代謝及び防御機構において重要な役割を担っている 3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素の立体構造を高分解能で決定し、遊離型と補酵素結合型の比較から基質結合部位近傍で補酵素結合に伴うループから  $\alpha$ -ヘリックスへの立体構造変化を見出した。補酵素との相互作用様式と水分子を介した水素結合ネットワークの解析から  $\alpha$ -ヘリックスが誘起される機構を明らかにし、溶液中での構造変化の結果と併せて基質選択性と反応機構に関するモデルを提出した。

このような機構の解明は蛋白質医薬品の開発に関して有由な知見を与えるものと考えられ博士 (薬学) の学位論文として相応しいものと認める。