2P077

ペルオキシダーゼ反応中間体におけるラジカル部位の設計による反応制御

○市村 想生¹、当舎 武彦^{1,3}、杉原 洋輔²、北川 禎三³、石森 浩一郎¹、森島 績¹ (¹京大院工、²京大工、³岡崎統合バイオサイエンスセンター)

酸化酵素であるペルオキシダーゼの基質特異性は、その反応中間体である Compound I のラジカル部位と密接に関係があり、このラジカル部位を人工的に設計できれば、ペルオキシダーゼの基質特異性を改変できると考えられる。我々は過去に、ポルフィリンラジカル (por+*) を生成する西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) において、その蛋白質表面に位置する Phe179 に Tyr を導入した変異体 F179Y が、pH10 で Tyr ラジカル (Tyr*) を生成することを見出した。本研究では、HRP の一般的な基質で比較的小さな guaiacol とかさ高い TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) を基質とした酵素活性の測定から、この F179Y の基質特異性について検討した。pH7 では、いずれの基質に対しても F179Y は野生型と同程度の活性を示したが、pH10 では、その guaiacol 活性の Vmax は野生型の 1.9 倍程度であったのに対し、TMB 活性の Vmax は野生型の 18.2 倍と大きな上昇を示した。この Vmax の大きな上昇は、F179Y の基質からの電子移動が野生型よりも容易であることを示している。電子移動反応は donor-acceptor 間の酸化還元電位と距離に依存するが、pH10 において Tyr* の還元電位 (0.65V) は、por+* の還元電位 (0.84V) よりも低いため、酸化還元電位では F179Y の Vmax の上昇を説明できない。むしろ F179Y の蛋白質表面に Tyr* が生成することで基質とラジカル部位が接近した結果、Vmax が上昇したと考えられる。つまり、F179Y ではラジカル部位を Tyr* に移動させることにより、かさ高い TMB の選択的な酸化が可能になったと結論づけられた。本研究から、ペルオキシダーゼの反応部位の設計により基質特異性を制御できることが示され、この結果は今後の人工酵素設計の研究につながると期待される。

S. Ichimura, T. Tosha, Y. Sugihara, T. Kitagawa, K. Ishimori and I. Morishima : Regulation of Heme Peroxidase Reactions by Controlling the Position of the Radical Center

2P079

プチダレドキシン・P450cam 複合体における ¹H-ENDOR 信号の D₂O 効果

○石川 格将、近藤 昌幸、堀 洋 (阪大院・基礎工)

目的 シトクロム P450cam は基質 camphor を水酸化する過程でその電子供与体であるプチダレドキシン (Pdx) と複合体を形成する。複合体形成に伴って各々の活性中心であるヘム、鉄-イオウ複核中心周りの構造変化が起こる事が EPR スペクトル変化として捉えられている。本研究では、鉄-イオウ複核中心の電子状態に近傍のアミノ酸残基の解離性プロトンが関与しているか調べる為、電子・核二重共鳴 (ENDOR) スペクトルに対する D₂O の効果を解析した。

実験・結果 還元型 還元型 Pdx の ¹H-ENDOR スペクトル

Pdx 単体、Pdx・P450cam 複合体、Pdx・P450cam・CO 複合体を軽水及び重水中で精製した標品を用いて EPR と ¹H-ENDOR スペクトルを測定した。還元型 Pdx 単体の EPR は D₂O 中で g_⊥ 信号の線幅減少がみられ、ENDOR では、カップリング A=2.49MHz の信号が消滅した (図矢印)。この変化は Pdx・P450cam 複合体においても観測された。

考察 ¹H-ENDOR スペクトル変化から Pdx の鉄-イオウ複核中心の電子状態には、その近傍に存在する溶媒中の重水素イオンと交換可能な解離性プロトンが影響を与えていることが確認された。変化を示す信号がどのアミノ酸残基の解離性プロトンによるのか検討中である。

N. Ishikawa, M. Kondou and H. Hori : D₂O effect on ¹H-ENDOR signals of putidaredoxin-P450cam complex

2P078

珊瑚由来アレンオキサイド合成酵素と基質の相互作用：共鳴ラマン分光法による研究

○当舎 武彦¹、内田 毅¹、Brash Alan R.²、北川 禎三¹ (¹岡崎統合バイオ、²ヴァンデビルト大学)

珊瑚由来アレンオキサイド合成酵素 (cAOS) は、プロスタノイドの合成に関与するヘム酵素で、脂肪酸誘導体を基質とし、アレンオキサイドを合成する。cAOS は、過酸化水素を分解するカタラーゼと似た構造であると考えられているが、その酵素活性は酸素添加酵素のシトクロム P450 (P450) に類似する。本研究では、cAOS が脂肪酸誘導体のようなかさ高い基質とどのように反応するのかを解明するため、ヘム近傍の構造変化に敏感な共鳴ラマン (RR) 分光法を用い、cAOS に基質が結合した際のヘム近傍構造について検討した。基質結合に伴う cAOS の構造変化を観測するため、cAOS に結合するが酵素反応が進行しない基質類似体を加え、RR スペクトルを測定した。ヘム鉄の配位構造やスピン状態を反映するポルフィリン骨格振動の値から、cAOS は基質類似体の有無にかかわらず、6 配位高スピン構造であることが示された。これは、基質類似体がヘム鉄に配位するなどの直接相互作用はないことを示している。さらに詳しく基質結合に関する知見を得るため、基質結合部位と考えられるヘム遠位空間の環境に敏感なシアン付加体の鉄-シアン伸縮振動を測定した。基質非結合型 cAOS の鉄-シアン伸縮振動は、350 と 437 cm⁻¹ に観測されるが、これらは、10 等量の基質類似体を添加しても有意な変化を示さなかった。このことから、基質類似体はヘム近傍に結合していないと推察された。cAOS 同様の酵素活性をもつ P450 では、基質はヘム近傍に結合し、ヘム鉄の配位構造やヘム鉄と配位子間の伸縮振動を変化させることが知られている。本研究で、cAOS に基質類似体を添加してもヘム近傍に構造変化が観測されなかったことは、cAOS の基質結合部位はヘム近傍ではなく、cAOS の酵素反応が P450 と異なる反応機構で進行する可能性を示している。

T. Tosha, T. Uchida, A. R. Brash and T. Kitagawa : Interactions between Coral Allene Oxide Synthase and Substrate: Resonance Raman Investigation

2P080

Reaction Mechanism of Nitric Oxide Reductase Cytochrome P450nor from *Fusarium oxysporum*

○塚本 弘毅¹、渡邊 寿雄²、長嶋 雲兵²、秋山 泰¹ (¹産総研・CBRC、²産総研・GTRC)

A unique enzyme mechanism named a bio-scale engine was proposed for a nitric oxide reductase, cytochrome P450nor (P450nor). P450nor has some structural similarities with a combustion engine: the heme pocket, the heme and NADH correspond to a combustion chamber, a piston head, and a spark plug, respectively. Each putative step of this reaction occurred in the heme pocket was characterized using Hartree-Fock calculations. The MO analysis revealed that the NO ligand dissociates from the heme iron immediately after one-electron reduction by NADH. Analysis of the molecular orbital energy revealed that NADH acts as a one-electron reducer, not as a two-electron reducer in the reaction mechanism of P450nor, and that NADH is involved with a pivotal role different from other one-electron reducers. Our calculation results divulged that all reactions occurred in the heme pocket are too fast to become rate-limiting. Therefore, the rate-limiting steps are the process of inhaling NO and NADH into the heme pocket and the process of exhaust a product generated in the heme pocket. Kinetics of these processes was discussed based on a large-amplitude vibration, which helps inhaling and exhaust processes in a wide-open heme pocket of P450nor. The reaction mechanism proposed can explain the published experimental data consistently.

K. Tsukamoto, T. Watanabe, U. Nagashima, Y. Akiyama : Reaction Mechanism of Nitric Oxide Reductase Cytochrome P450nor from *Fusarium oxysporum*