1P033

ブルー銅タンパク質シュウドアズリンの電子移動反応における水素結合の役割

○青野 智子、内田 喜子、井島 史博、高妻 孝光（茨城大院・応用粒子線）

シュウドアズリンは、脱窒過程において亜硝酸イオンを一酸化窒素に還元する亜硝酸還元酵素への電子供与体として機能する。タンパク質表面には、銅イオンへの配位に関与しない His6 があり、Glu4 および Thr36 と水素結合を形成し、酸化状態に依存して、His6 のイミダゾール環と Glu4 のカルボキシル基および Thr36 のヒドロキシル基との水素結合が変化することが知られている。本研究では、Glu4、His6、Thr36 を異なるアミノ酸に置換し、His6 との水素結合の変化に伴う構造と電子伝達機能との相関について検討を行った。Thr36 をリシンに置換した T36K の吸収スペクトルは吸収極大を長波長側 $\lambda = 597 \text{ nm}$ (WTPAz = 594 nm) に与え、電子常磁性共鳴スペクトル (ESR) において A_{//} 領域の 4 番目のシグナルの強度が強くなることを見出された。A_{//} 領域の 4 番目の ESR シグナルを示さず、rhombic な ESR シグナルのみを与える M16V との差スペクトルを検討したところ、rhombic と axial の二つの異なる構造から成っており、T36K では axial 成分が WTPAz よりも多くなっていることが明らかとなった。サイクリックボルタンメトリー法によって求められた T36K の酸化還元電位は 293 mV vs. NHE であり、WTPAz よりも約 30 mV 高い酸化還元電位を示した。これは、導入された正電荷の効果によるものと考えられる。電気化学的に求められた亜硝酸還元酵素との電子移動反応速度定数 (pH 6) は、それぞれ、 $6.66 \times 10^5 \text{ (WT)}$ 、 $3.95 \times 10^5 \text{ (T36K)}$ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった。このことは、T36K の酸化還元電位が高くなったことにより、電子移動反応が抑制されたことを示唆している。

T. Aono, Y. Uchida, H. Ijima, and T. Kohzuma : Functional Role of Hydrogen Bonding at the Remote Site His6 in the Electron Transfer Reaction of Pseudoazurin

1P035

大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素の β C- β D ループ部位欠失変異体の構造・安定性・機能

○堀内 裕司、大前 英司、月向 邦彦（広島大・院理）

本研究室では、これまで大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) の構造と機能に対するループ領域の役割を調べるために、フレキシブル・ループ上に存在する 67 位を部位特異的に置換した変異体を作製し、その構造・安定性・機能について調べてきた。本研究では、ループ領域の更なる理解のために 67 位および前後 3 残基を 1 個ずつ欠失した変異体を作成し、各種分光法を用いて欠失変異体の構造・安定性・機能について調べた。

$\Delta 64$ から $\Delta 67$ 変異体の CD スペクトルでは、 230nm 付近で負の楕円率の増加が見られた。この結果は、 64 から 67 位での欠失が Trp47 と Trp74 のコンフォメーションに影響を与えていることを示唆している。また $\Delta 64$ から $\Delta 67$ 変異体の蛍光強度は Wild-type に比べて約 80% 程度であり、 $\Delta 68$ 変異体の蛍光強度は Wild-type の約 40% と大きく減少していた。これらの結果から、ループ上の 1 アミノ酸の欠失は DHFR の三次構造に影響を及ぼしていると考えられる。

尿素に対する安定性では、 64 から 68 位のいずれの欠失変異体も Wild-type より約 1 M 程度 C_m の値が低下していたが、各変異体間の安定性の差は小さかった。このことから、各部位の側鎖よりも主としてループの長さが安定性に寄与していると考えられる。また $\Delta 65$ 変異体は Wild-type とほぼ同じ酵素活性であったが、 $\Delta 64$ 、 $\Delta 66$ 、 $\Delta 67$ 変異体は Wild-type よりも酵素活性が低下していた。一方で、 $\Delta 68$ 変異体は Wild-type より 1.5 倍ほど酵素活性が高かった。この結果から、DHFR の酵素機能にはループの長さよりも、むしろアミノ酸側鎖の方が重要であることが示唆された。

ポスターでは、 69 から 71 位の欠失変異体の結果についても発表する予定である。

Yuji Horiuchi, Eiji Ohmae, Kunihiko Gekko (Grad. Sch. of Sci., Hiroshima Univ.) : Structure, Stability, and Function of Deletion Mutants at β C- β D Loop of Dihydrofolate Reductase from *Escherichia coli*

1P034

シュウドアズリン M16X 変異体の分光学的、電気化学的研究

○小原 裕二¹、Rehab F Abdelhamid¹、Doreen E Brown²、Gregory A Juda²、Erick M Shepard²、David M Dooley²、堀 洋³、高妻 孝光¹（¹茨城大院・応用粒子線、²モンタナ州立大学・化学、³阪大院・基礎工）

シュウドアズリンは、亜硝酸還元酵素への電子供与体として機能する。X 線結晶構造において、銅イオンに配位し溶媒側に露出している His81 近傍には、Met16 残基が存在し、His81 イミダゾール基と相互作用している。Met16 残基をフェニルアラニンに置換した M16F 変異体では、フェニルアラニンのベンゼン環と His81 のイミダゾール環との間に芳香環相互作用が生じ、タンパク質の物性が変化することが、近年明らかになっている。

本研究では、芳香環相互作用の影響についてさらに詳細に検討するため、Met16 を芳香族アミノ酸であるトリプトファン、及び、チロシンに置換した M16W、M16Y と、脂肪族アミノ酸であるバリンに置換した M16V を作製し、分光学的性質、及び電気化学的性質を比較、検討した。

電子吸収スペクトルにおいて、ワイルドタイプでは銅イオンまわりの構造の指標となる 460 nm と 600 nm の吸収帯の強度比 A_{460} / A_{600} が 0.4 であるのに対し、M16W、M16Y では 0.3 、M16V では 0.5 であり、M16W、M16Y では axial な構造の寄与が大きくなっていることが示唆された。また、EPR スペクトルにおいて、M16W、M16Y、M16V では二つの異なるコンフォメーションの存在が明らかとなり、芳香環を導入した M16W、M16Y では、axial 対称なシグナルの寄与が大きくなることが判明し、吸収スペクトルの結果を支持する。M16W、M16Y の酸化還元電位は、 283 mV 、 300 mV であり、芳香環の導入によってワイルドタイプよりも高い電位を有することが明らかになった。

Y. Obara, R. F. Abdelhamid, D. E. Brown, G. A. Juda, E. M. Shepard, D. M. Dooley, H. Hori and T. Kohzuma. : Spectroscopic and Electrochemical Studies of Pseudoazurin M16X Variants.

1P036

結晶構造と量子化学計算に基づく細菌 NAD 依存型イソクエン酸脱水素酵素の反応機構

○今田 勝巳^{1,2}、田村 隆³、竹中 涼³、小林 一聖³、稲垣 賢二³、難波 啓一^{1,2}（¹阪大院・生命機能、²ICORP・JST、³岡山山大・農）

イソクエン酸脱水素酵素 (ICDH) とイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH) は、NAD または NADP を補酵素とし、リンゴ酸骨格を持つ各々の基質の脱水素脱炭酸反応を触媒する。立体構造等の類似性にも関わらず両者の基質・補酵素認識は厳密である。IPMDH は NAD を利用するのにに対し、細菌由来 ICDH は NADP 依存である。ところが最近、Acidithiobacillus thiooxidans 由来 ICDH (At-ICDH) が NAD 依存型であることがわかった。我々は、補酵素認識機構の詳細を明らかにするため、At-ICDH-NAD 複合体の結晶構造解析を行った。At-ICDH は活性部位のドメイン間の溝が最も閉じた構造を持ち、dimer 形成する相手分子と NAD の間に相互作用がみつかった。従来、補酵素結合は一方の分子との結合のみが注目されていたが、相手方分子との接触で補酵素が適切な位置に固定されることが示唆された。また、今回の解析ではニコチンアミドの構造を厳密に決定することができ、ニコチンアミド窒素と C4 炭素が cis 配座で基質側に 21° 傾いていることがわかった。そこで、半経験的分子軌道計算により、アミド回転によるニコチン環上の水素の電荷変化を調べたところ、cis 配座から 23° の傾きで 4 位の ProR 水素が負電荷を帯びハイドライドを形成することがわかった。従って解析した構造は脱水素反応を行う上で極めて有利であり、ICDH が反応経路上で補酵素構造を調節していることを示唆している。

K.Imada, T.Tamura, R.Takenaka, I.Kobayashi, K.Inagaki and K.Namba : Implication for reaction mechanism of bacterial NAD dependent isocitrate dehydrogenase based on crystal structure and quantum chemistry