

# 博士論文審査報告書

論文題目 : Structural study of detoxification system for reactive oxygen species  
in obligatory anaerobe

「偏性嫌気性細菌における活性酸素種解毒システムの構造学的研究」

申請者 : 西川 幸志

## 1. 論文内容の要旨

本研究では *Clostridium* 属に見出された過酸化水素解毒システムの構成タンパク質、NADH: rubredoxin oxidoreductase (NROR) および rubperoxin (Rpr) の3次元構造をX線結晶解析法によって明らかにし、これら分子の構造と酵素活性についての考察を行った。

偏性嫌気性細菌では superoxide reductase (SOR) や rubrerythrin (Rbr) といった酵素が酸素や活性酸素種の解毒を担う。最近、*Clostridium* 属において、NRORを電子供与体としたRprによる過酸化水素解毒経路が示された。NRORは分子量約42,000のタンパク質で、補酵素としてFADを持つ。一方、Rprは分子量約20,000で、N末端側にrubredoxin様ドメイン、C末端側にferritin様ドメインをもち、アミノ酸配列上ではRbrとはドメインの配置が逆転している。

本研究では、NROR分子を結晶化し、水銀誘導体を用いた多波長異常分散法によって原子分解能でX線結晶解析することに成功した (2.1 Å)。構造解析の結果、NRORは、rubredoxin還元酵素 (RdxR) などとその立体構造が似ていることがわかり、特にRdxRとは補因子のFADの配向や、電子授受にかかわるNADHやrubredoxinとの相互作用部位の立体構造が両方で保存されていることを見出した。Rprの結晶構造は、分子が有する亜鉛原子の異常分散を利用して解析した (2.7 Å)。本酵素は2量体で機能すると考えられていたが、結晶中ではC末端側のferritin様ドメインによる2量体が3つ会合した6量体を形成していた。N末端側のrubredoxin様ドメインの電子密度を同定することはできなかった。一方、Rprとはrubredoxin様ドメインとferritin様ドメインがアミノ酸配列上で入れ替わった構造をもつRbrの結晶構造は2量体で報告されている。本Rprの6量体構造では、rubredoxin様ドメインとferritin様ドメインがRbrと同様の相対配置をとることは不可能であった。これらの結果をもとに、6量体形成に亜鉛などの2価の原子が関与すること、また6量体の方が2量体よりも4倍程度酵素活性が強いこと、さらには酵素を見出した*Clostridium acetobutylicum*の菌体の細胞破碎溶液中には6量体酵素が主成分であることなどを突き止めた。現在精密化を進めているが、当初ははっきり同定できなかったrubredoxin様ドメインと思われる電子密度を、隣の2量体分子のferritin様ドメインの近くに見出し、6量体における両ドメインの相対配置と酵素活性について考察を行った。

## 2. 論文審査結果

本研究では *Clostridium* 属に新規に見出された過酸化水素解毒システムの構成タンパク質のうち、NROR および Rpr という 2 つの酵素の X 線結晶構造解析に成功し、これら分子の構造と酵素活性についての考察を行っている。

本研究の結果、本過酸化水素解毒システムに新たに見つかった NROR は、既に解析されていた rubredoxin 還元酵素 (RdxR) とその立体構造が似ており、補因子の FAD の配向および電子授受にかかわる NADH や rubredoxin との相互作用部位の立体構造が両者でよく保存されていること明らかになった。これにより、酵素機能は両者で異なるものの下流の触媒反応で利用される電子の分子内伝達システムはほぼ同じであることを見出した。

NROR から得た電子を用いて過酸化水素を水に還元する反応を触媒する Rpr は、結晶構造解析初期には電子密度中に rubredoxin 様ドメインを見出すことはできず、ferritin 様ドメインのみを同定した。構造解析の結果、分子はこれまでの生化学的なデータから類推されていたような 2 量体ではなく、6 量体構造をとっていた。結晶構造中に見出された Rpr の四次構造結果をもとに酵素の活性状態について再度酵素化学的な実験をやり直したところ、酵素の本来の活性型が 6 量体である可能性を突き止めた。一方、結晶構造の精密化を進める過程で、従来報告されている Rbr とは異なる配置で rubredoxin 様ドメインを同定し、6 量体構造によって形成される両ドメインの相対配置と酵素活性の関係について新しい機構を提案した。これらの四次構造—機能相関についての新しい研究結果は、Rpr の酵素化学的および物理化学的なデータの見直しを求めるもので、微生物における活性酸素種の解毒反応システムの研究に新たな展開をもたらし、当該研究分野の発展に大いに寄与するものと期待される。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。

また、平成 22 年 1 月 25 日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

主査：樋口芳樹 印

副査：小倉尚志 印

：阪口雅郎 印

：中川敦史 印

(大阪大学蛋白質研究所、教授)