

氏名・(本籍)	アブ ジャファール エムデイ サ デ ッ ク Abu Jafar Md. Sadeque
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理博第 1161 号
学位授与年月日	平成 2 年 3 月 28 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院理学研究科 (博士課程) 化学第二専攻
学位論文題目	Spectroscopic Studies of Cytochrome P-450 <sub>d</sub> and Related Heme Proteins (チトクローム P-450 <sub>d</sub> および関連ヘムタンパク質の分光学的 研究)
論文審査委員	(主査) 教 授 旗 野 昌 弘      教 授 藤 井 義 明 教 授 岩 泉 正 基 助 教 授 清 水      透

## 論 文 目 次

Chapter I : Introduction

Chapter II : Comparative Ligand Binding Study of Cyrochtomes P-450<sub>d</sub>, P-450<sub>sc</sub> and  
Metmyoglobin

Chapter III : Ligand Binding Study of Microsomal Cytochrome P-450<sub>d</sub> Mutants

Chapter IV : Ligand Binding Study of Purified Cytochrome P-450<sub>d</sub> Mutants

Chapter V : Ligand Binding Study of Cytochrome *c* and Heme Octapeptide of Cyto-  
chrome C : Absorption and MCD Studies

Chapter VI : Binding of Fluoroaniline to Heme Octapeptide of Cytochrome *c* : <sup>19</sup>F NMR  
Study

Chapter VII : Summary and Concluding Remarks

# 論文内容要旨

## Chapter I : Introduction

チトクローム P-450 (以下 P-450 と略す) は自然界に広く分布し様々な有機化合物の一酸素添加を司る分子量約 5 万のヘムタンパク質である。この P-450 はミオグロビンやヘモグロビンなどの一般に良く知られた他のヘムタンパク質と異なり内部 (第 5) 配位子としてシステインのチオールを含んでいる。その結果として CO 結合還元型錯体の最大吸収位置が 450nm 付近に存在し他のヘムタンパク質のそれが 420nm 付近に存在するのと異なっている。この酵素のヘムタンパク質としてのスペクトル的異常さがこの酵素の反応と密接な関係があると思われる。故に、この酵素の司る一酸素添加反応の構造・機能相関関係を理解するためにはこの酵素の活性部位であるヘム周辺構造を良く知ることが重要である。

本論文ではまず P-450 のヘム周辺構造がミオグロビンのような他のヘムタンパク質とどのように異なるかを調べるためにラット肝臓由来 P-450<sub>d</sub>, ウシ副腎由来 P-450<sub>scc</sub> およびウマ心臓由来ミオグロビンと各種配位子との相互作用を吸収スペクトルを用いて調べる。さらに、ラット肝臓由来の膜結合性 P-450<sub>d</sub> の構造・機能相関関係を調べることを目的として、P-450<sub>d</sub> のヘム周辺に存在すると推定される各種アミノ酸を他のアミノ酸に変化させ、各種外部配位子および基質のヘム周辺構造へ及ぼす効果を主に吸収スペクトルを用いて調べる。この目的のためにバクテリア由来水溶性 P-450<sub>com</sub> の結晶構造を参考にして P-450<sub>d</sub> のヘム周辺構造を議論する。変異 P-450<sub>d</sub> としては、マイクロゾーム溶液中および精製されたものを用いる。さらに、電子伝達を司るヘムタンパク質であるチトクローム *c* が P-450 の良いモデル化合物になるかどうかを各種メルカプタン化合物を用いてスペクトル的に調べる。最後に、フッ素化配位子とヘムタンパク質の存在しない系においてどう相互作用するかを <sup>19</sup>FNMR を用いて調べる。

## Chapter II : Comparative Ligand Binding Study of Cytochromes

### P-450<sub>d</sub>, P-450<sub>scc</sub> and Metmyoglobin.

P-450 とメトミオグロビンは共にヘムタンパク質であるが両者の内部 (第 5) 配位子は異なり両者のヘム周辺構造も異なる。又、機能においても、P-450 は一酸素添加酵素で酸素を活性化するが、ミオグロビンは酸素の貯蔵を司る。本章ではラット肝臓 P-450<sub>d</sub>, ウシ副腎 P-450<sub>scc</sub> およびウマ心臓メトミオグロビンのヘム周辺構造をフッ素化アニリンの結合を用いて調べた。

フッ素化アニリンは P-450<sub>scc</sub> やメトミオグロビンに対してよりも P-450<sub>d</sub> に対してより強く結合した。その結合力は P-450<sub>d</sub> > P-450<sub>scc</sub> > メトミオグロビンの順であった。このことから、P-450<sub>d</sub> は疎水性配位子に対して他の 2 者よりもより強い結合能力があることが示唆された。この結果は P-450<sub>d</sub> の広い基質特異性と関係をつけることができた。

フッ素化アニリンとこれらヘムタンパク質への結合過程を温度を変化させて検討した。温度を 20°C から 37°C へ上昇させることによりフッ素化アニリンのこれらヘムタンパク質への結合力

は低下したがその程度は P-450<sub>d</sub> の場合最も著しかった。その程度は P-450<sub>d</sub> > P-450<sub>acc</sub> > メトミオグロビンの順であった。この結果より P-450<sub>d</sub> のヘム周辺構造はこれら 3 者の中で最も柔軟であることが示唆された。この知見も又 P-450<sub>d</sub> の広い基質特異性とも関係をつけることができた。

### Chapter III: Ligand Binding Study of Microsomal Cytochrome P-450<sub>d</sub> Mutants.

P-450 のヘム平面上 (遠位) に位置するアミノ酸は基質結合部位の一部を形成しておりこの酵素の基質特異性の決定に重要な働きをしていると考えられる。膜結合性 P-450<sub>d</sub> の結晶構造は明らかではないが、部位特異的変異を用いてその膜中での構造を予想できるのではないかと考えた。P-450<sub>cam</sub> の X 線結晶構造を参考にして P-450<sub>d</sub> の遠位に存在すると推定されるアミノ酸のみならず内部 (第 5) 配位子である Cys456 周辺のアミノ酸を他のアミノ酸に変換し各種変異体を構築した。各種変異体に対するミクロゾーム溶液中での各種配位子の結合様式を調べた。

その結果、(1) Glu318Asp+Phe325Thr の二重変異体に対する配位子の結合は野生型および他の変異体に比べて著しく強く、配位子結合について二種アミノ酸の共同作用が認められた。(2) P-450<sub>cam</sub> の結晶構造よりヘムの遠位に存在すると推定した P-450<sub>d</sub> の Asn310 から Phe325 の領域のアミノ酸を変化させることにより配位子の結合力は確かに大きく変化し、P-450<sub>d</sub> 内のこの領域はヘムの遠位に位置していることが示唆された。

以上の結果より、同様な配位子結合の研究を精製された各種 P-450<sub>d</sub> 変異体に適用することにより、より正確な知見を得る必要があると思われた。

### Chapter IV: Ligand Binding Study of Purified Cytochrome P-450<sub>d</sub> Mutants.

P-450 がその酵素反応を遂行するために特にどのアミノ酸が(1)基質である有機化合物と相互作用するか、(2)もう一方の基質である分子状酸素を活性化するか、又、(3)外部配位子との結合に寄与しているかを調べることは重要である。ラット肝臓 P-450<sub>d</sub> のヘム周辺構造を調べるために、P-450<sub>d</sub> の内部 (第 5) 配位子であるシステインの周辺 (近位) に位置するいくつかのアミノ酸を他のアミノ酸へ変化させると共に第 6 配位子側 (遠位) に存在すると推定されるいくつかのアミノ酸を他のアミノ酸に変換させた。これら P-450<sub>d</sub> 各種変異体に対する外部配位子の結合過程を吸収スペクトルを用いて調べ、P-450<sub>d</sub> のヘム周辺構造を議論した。

その結果、以下の事が示唆された。(1) Thr319 と Ala315 は P-450<sub>cam</sub> と同様に水素結合で基質結合部位を安定化しており Thr319Ala 変異体においてこの結合が破壊され大きな配位子の結合部位又はその入口が変化して結合が妨げられる。(2)変異体 Glu318Asp に対して配位子の結合力は増加し特に野生型に対して直接配位しない配位子でさえも配位するようになる。このことにより、Glu318 が P-450<sub>cam</sub> と同様にヘムの遠位側に存在していることが示唆された。(3)二重変異体 Glu318Asp+Phe325Thr に対して疎水性な配位子は強く配位する。(4)配位子が結合する部

位の逆側（近位）の変異によっても配位子の結合は影響される。

以上のように得られた結果より P-450<sub>d</sub> のヘム周辺構造は既に構造の既知の P-450<sub>cam</sub> と類似していることが示唆された。

## Chapter V: Ligand Binding Study of Cytochrome *c* and Heme Octapeptide of Cytochrome *c* : Absorption and MCD Studies

チトクローム *c* は P-450 と同様にヘムタンパク質であるがチトクローム *c* のヘムはタンパクに共有結合しており P-450 のヘムが内部（第 5）配位子のみでタンパクと結合しているのと異なる。又チトクローム *c* の機能は電子伝達であり P-450 の機能とは異なる。P-450 の内部（第 5）配位子がチオールであることからチトクローム *c* およびそのヘム-オクタペプチド錯体に各種メルカプタン類を添加することによりスペクトル的に P-450 のモデル化が可能かどうか調べた。

その結果以下のことが示唆された。(1)メルカプタンはチトクローム *c* およびそのヘム-オクタペプチド体とは単純な 1 : 1 結合体を形成せず必ず中間体を経てチオール付加化合物を形成する。(2) Fe<sup>3+</sup> 低スピン型ヘム-オクタペプチド-チオール錯体の MCD スペクトルは P-450 のそれと類似している。(3)メルカプタンはチトクローム *c* のヘムに直接反応してヘム環の構造を変化させるがメトミオグロビンに対してはそれ程反応しない。

以上よりヘムタンパク質に対するチオールの極めて特殊な働きが示された。

## Chapter VI: Binding of Fluoroaniline to Heme Octapeptide of Cytochrome *c*: <sup>19</sup>F NMR Study.

第 2 章においてフッ素化アニリンと P-450<sub>d</sub>, P-450<sub>sec</sub> およびメトミオグロビンとの相互作用を研究し、このフッ素化アニリンがヘムタンパク質のヘム周辺構造を調べるのに良いプローブになることが示された。本章ではタンパク質の存在しないヘム系にこの配位子がどの様に結合するかを <sup>19</sup>FNMR を用いて調べることにより純粋な配位子-ヘム相互作用を抽出し、フッ素化配位子および <sup>19</sup>FNMR のヘムタンパク質への応用の可能性を探る。

以下の結果を得た。(1)フッ素化アニリンの <sup>19</sup>FNMR の化学シフトおよび半値幅はチトクローム *c* のヘム-オクタペプチドへの結合に対応して変化し、別に吸収スペクトルから得た結果と良い一致を見た。(2)パラ-フッ素化アニリンはオルソ-およびメタ-フッ素化アニリンよりもヘム-オクタペプチドへ強く結合した。これはパラ-フッ素化アニリンのより強い塩基性のためと思われた。(3)パラ-フッ素化アニリンはヘム-オクタペプチドと速い交換をしておりその交換速度は  $5.3 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$  と推定された。

これらのことにより、フッ素化配位子は <sup>19</sup>FNMR を用いることによりヘムタンパク質のヘムとの相互作用を調べるのに極めて有効であることが示された。

## Chapter VII: Summary and Concluding Remarks

本研究で得られた結果を総括した。

## 論文審査の結果の要旨

チトクローム P-450 は二原子酸素分子を活性化し、一原子酸素を基質に添加する一群のヘムタンパク質の総称で、現在までに約100余の分子種のアミノ酸配列が明らかにされている。1985年に緑膿菌から単離された球状タンパク質であるチトクローム P-450<sub>cam</sub>の単結晶のX線結晶構造解析が成功し、その全原子座標が確定した。生理機能において興味深い哺乳類臓器のチトクローム P-450 は一般に膜結合性であり、それらの構造は未解明のままである。サデック、アブ ジャファル Md.は二原子酸素原子を活性化する活性中心となっているヘム周辺の構造がチトクローム P-450<sub>cam</sub>と哺乳類臓器のチトクローム P-450 とにおいて互いに酷似していると仮定し、アニリンおよびイミダゾールなどの化合物とそれらの誘導体を配位子として用い、哺乳類肝ミクロソーム P-450<sub>d</sub>の野生種、多くの変異種に対する上記配位子の配位特性を分光学的に詳細な解析を試みた。また、参考試料として数種のヘムタンパク質およびそれらのモデルへの上記配位子の配位特性をも分光学的に解析した。

第1章の序論において従来の研究の概要、研究の目的、本論文の構成を述べた後、第2章ではラット肝、ウシ副腎のチトクローム P-450 とウマ心臓メトミオグロビンへのフッ素化アニリンの配位特性を詳細に解析し、フッ素化アニリンがラット肝チトクローム P-450<sub>d</sub>に最も強く配位し、次にウシ副腎チトクローム P-450<sub>sc</sub>に配位しやすく、メトミオグロビンには最も配位しにくいことを明らかにした。チトクローム P-450<sub>d</sub>への高い配位性はチトクローム P-450<sub>d</sub>のヘム近傍の高い疎水性に起因するものと推論した。第3章ではさらに詳細な吟味を試みている。チトクローム P-450<sub>cam</sub>のX線結晶構造解析とアミノ酸配列上の相同性を根拠とし、チトクローム P-450<sub>d</sub>のN末端から310番のAsnから325番のPheの領域のアミノ酸配列が基質および二原子酸素分子の結合部位であると推定し、この領域のアミノ酸配列の中のアミノ酸を置換した多くの変異種をそれぞれ含むミクロソームに対するアニリン等の配位特性を測定し、Asn310からPhe325の領域のアミノ酸の置換により、配位子の結合特性が大きく変化することを見出した。第4章では第3章で得られた知見をふまえ、319番Thr、315番Alaがチトクローム P-450<sub>cam</sub>と同様に水素結合で基質結合部位を安定化しており、318番Gluが基質（配位子）として加えた4-フェニルイミダゾールのヘムへの配位を妨害するが、このGlu318をAspへ置換すると4-フェニルイミダゾールが容易にヘムへ配位しうることを見出した。これらの事実はラット肝ミクロソームチトクローム P-450<sub>d</sub>の基質結合部位の三次元的構造がチトクローム P-450<sub>cam</sub>の三次元的構造に酷似しているという仮定と矛盾していない。さらに、チトクローム P-450のモデル化合物を用い、ヘム周辺の構造を詳細に解析し、第5章では電子吸収スペクトル、磁気円偏光二色性スペクトル解析の結果をまとめ、第6章では基質の<sup>19</sup>FNMRスペクトル解析の結果をまとめ、本論文で用いた分光学的データの妥当性を検証している。以上、サデック、アブ ジャファル Md.提出の論文は哺乳類チトクローム P-450の構造について極めて重要かつ波及効果の大きい成果をもたらしたものであり、博士論文として適当である。また、本論

文は著者が自立して研究活動を行なうに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。よって、サデック、アブ ジャファル Md.提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。