

## 博士論文審査報告書

氏名	山際 来佳
学位の種類	博士（理学）
学位記番号	博理第114号
学位授与報告番号	甲第352号
学位授与年月日	平成31年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当
論文題目	Functional and Structural Characterization of Nitric Oxide Reductase with <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Overexpression System 「緑膿菌発現系を用いた一酸化窒素還元酵素の構造・機能に関する研究」

論文審査委員長	(主査) 教授 城 宜嗣
	(副査) 教授 西谷 秀男
	(副査) 教授 梅園 良彦
	(副査) 教授 鏑木 基成

(神戸大学大学院理学研究科)

### 1. 論文内容の要旨

脱窒は、嫌気性細菌の呼吸の一種であり、土中の硝酸塩 ( $\text{NO}_3^-$ ) や亜硝酸塩 ( $\text{NO}_2^-$ ) を逐次還元し、最終生成物として窒素 ( $\text{N}_2$ ) を大気中に放出する、地球上の窒素循環において重要なプロセスである。脱窒において中間生成物として産生される一酸化窒素 ( $\text{NO}$ ) は、細胞毒性が高いことから、脱窒菌は膜結合性の鉄含有酵素である一酸化窒素還元酵素 (nitric oxide reductase: NOR) を有し、 $\text{NO}$  を速やかに還元し消去している。NOR による  $\text{NO}$  消去反応生成物である亜酸化窒素 ( $\text{N}_2\text{O}$ ) は、温室効果ガスならびにオゾン層破壊ガスであること、さらに、NOR は好気呼吸酵素チトクロム酸化酵素の進化的な祖先であることも知られている。山際来佳氏は、脱窒菌 NOR のこのような基礎生物学・生化学ならびに環境科学的な重要性と、全体構造は解明されているが、構造を基盤にした機能解析が進んでいない事に着目し、その構造と機能の関連を分子・原子のレベルで明らかにすることを目的に研究を進めてきた。

山際氏は、NOR への変異導入による構造と機能の変化を物理化学的に調べることにより、本研究の目的達成をめざした。そのために、まず、NOR 遺伝子を欠損した緑膿菌に NOR をコードしたプラスミドを導入することにより、NOR 発現系を作成した。この系において、NOR 欠損あるいは不活性 NOR を発現する緑膿菌は脱窒条件下

では増殖できない性質を利用して、*in vivo* で NOR 変異体の活性を測定できるシステムを構築した。さらに、NOR 変異体を高純度に精製するプロトコルを確立し、スクリーニング結果と精製した変異酵素の活性との間に正の相関があることも見出した。

さらに、このスクリーニングシステムを用いて、NOR の機能上重要ないくつかのアミノ酸残基を明らかにした。まず、NOR 酵素反応で用いられるプロトンの輸送経路を決定し、加えて、Val206 が重要な機能を果たしていることを発見した。さらに、いくつかの Val206 変異 NOR を精製し、その分光解析、結晶構造解析、反応速度解析の結果を基に、NOR 反応の基質である NO が酵素外部から活性中心に移動する際に、その経路の動的な構造を制御しているという事を見いだした。NOR の酵素機能における Val206 の役割は、世界で初めての提案である。本論文の主要部分は、*Biochim. Biophys. Acta Bioenergetic* **1859**, 333-341 (2018) (DOI: 10.1016/j.bbabi.2018.02.009)に掲載された。

## 2. 論文審査結果

本論文において山際氏は、脱窒菌が生体エネルギーを獲得する際の鍵酵素である NOR の構造と機能の関連性を明らかにする為に、分子生物学・構造生物学・生化学・分子分光学・反応動力学などの手法を組み合わせることにより、詳細で丁寧に研究した。酵素活性を簡便にスクリーニングできるシステムの構築と、それを用いた NO 輸送に重要なアミノ酸残基 Val206 の発見は、NOR 酵素反応機構を明らかにする上で重要な成果である。山際氏の構築したシステムは、酵素反応のさらなる理解だけでなく、呼吸酵素が嫌気呼吸から好気呼吸へと適応した分子進化の理解や、地球温暖化・オゾン層破壊などの環境保全にも寄与できる。将来的に、基礎生物学と環境科学の発展に貢献しうる成果であると評価できる。

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、2019年1月15日、論文内容およびこれに関連する事項について諮問を行った結果、合格と判定した。