

氏 名 高橋 昭博

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1222 号

学位授与の日付 平成 21 年 3 月 24 日

学位授与の要件 物理科学研究科 機能分子科学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 ROLES OF AXIAL LIGANDS IN CATALYTIC
OXIDATIONS BY HEME ENZYMES

論文審査委員 主 査 教授 田中 晃二
准教授 藤井 浩
教授 青野 重利
教授 江原 正博
部門長 城 宜嗣（理化学研究所）

金属元素は生体にとって必須微量元素の一つであり、鉄、銅、亜鉛、コバルト等は生命活動を維持していく上で重要な役割を担っている。中でも鉄イオンは蛋白質と結合することで、酸素運搬や電子伝達といった多様な生理機能を発現する。鉄含有蛋白質としては、古くから補欠分子族として鉄ポルフィリン錯体をもつヘム蛋白質が代表的である。中でも、ペルオキシダーゼ（基質の一電子酸化酵素）やカタラーゼ（過酸化水素分解酵素）、シトクロム P450（一原子酸素添加酵素）は酸素を活性化するヘム酵素の代表例としてよく知られている。これらヘム酵素は酸素原子を活性化するために鉄イオンとポルフィリン環がそれぞれ一電子酸化された『鉄四価オキシポルフィリン π -カチオンラジカル』（通称、Compound I）中間体を生成する。このような酸素原子の還元的活性化は鉄イオン単独では難しく、蛋白質との共同作業が織りなす生体酸化反応といえる。しかし、これらヘム酵素の酸化活性メカニズムに関しては共通の Compound I 中間体を介していることを除いて不明な点が多く残されている。本学位論文では、鉄イオンを取り囲んでいる配位構造の違いに注目し、これらヘム酵素のもつ優れた酸化活性機構について研究した。

上記3つのヘム酵素の鉄イオン周りの配位構造に関しては、プロトポルフィリン IX と呼ばれる共通の配位子が結合している一方で、ある特徴的な違いが知られている。それは鉄ポルフィリン錯体と蛋白質をつなげているヘムからみて軸位に位置するアミノ酸配位子（以下、軸配位子）の存在である。ペルオキシダーゼではヒスチジン由来イミダゾール、カタラーゼではチロシン由来フェノレート、さらにシトクロム P450 ではシステイン由来チオレート配位子が X 線構造解析より確認されている。鉄イオンに直接結合しているこれら軸配位子の存在は、Compound I 中間体の酸化活性とも関連してこれまでその役割が注目されてきた。しかし、鉄ポルフィリンを取り囲む蛋白質環境の違いや、酵素内での Compound I 中間体が極めて不安定であることから、これまでアミノ酸軸配位子の役割について評価することは困難とされてきた。著者は蛋白質周りを取り除いた低温下で安定な Compound I 中間体のモデル錯体を合成することで、軸配位子の機能的役割を評価できると考えた。

アミノ酸由来の軸配位子をもつ Compound I モデル錯体の合成にあたって、著者は主に2つの工夫を行った。まず酸化方法において従来のような化学酸化剤でなくオゾンガスを用いることで、目的の軸配位子だけを選択的に Compound I モデル錯体に導入することを可能とした。さらに Compound I モデル錯体に対するイミダゾールやフェノレート配位子の高い還元性に対しては、配位子自身を電子吸引性基で置換することで安定なペルオキシダーゼおよびカタラーゼの Compound I モデル錯体の合成にはじめて成功した。合成したこれら Compound I モデル錯体に関しては各種分光測定（UV-vis, 多核種 NMR, 電子スピン共鳴, ESI-MS, 共鳴ラマン分光）より確認した。

イミダゾールおよびフェノレート配位子の酸化反応性への影響について、シクロオクテン（エポキシ化反応）、*N,N*-ジメチルアニリン（脱メチル化反応）、1,4-シクロヘキサジエン（水素引き抜き反応）を基質に用いて評価した。イミダゾールやフェノレート配位子は従来から知られている塩素イオンや硝酸イオンと比較して、反応速度が 100 倍から 400 倍に増加していることを明らかにした。ヘム酵素におけるこれらアミノ酸由来の軸配位子が

Compound I 中間体の酸化活性を高める上で重要な役割を担っていることが示唆される。一連の結果は、酵素内での Compound I 中間体の触媒サイクルにおける律速段階が Compound I 中間体の生成ステップであることも良く一致している。

さらに著者は、これら軸配位子による Compound I の反応速度の違いについて熱力学的視点から研究した。四級アンモニウム塩を用いた鉄ポルフィリン錯体との配位子交換反応から、軸配位子による錯体の熱力学的安定性への影響について評価した。その結果、フェノレート配位子をはじめとするアニオン性軸配位子は反応始状態である Compound I 状態よりも反応終状態である鉄三価ポルフィリン状態の安定性を大きく変化させていることを明らかとした。このことは、反応速度 k_2 を決定している反応自由エネルギー ΔG が主に鉄三価状態の安定性に大きく依存していることを示している。カタラーゼモデルであるフェノレート配位子の高い酸化活性は、反応終状態である鉄三価状態の大きな安定性に由来していることを明らかにした。これに対し、イミダゾールのような中性配位子に関しては種々のアニオン性配位子が示した直線自由エネルギー相関 ($\log k_2 \propto \Delta G$) からの予測よりも高い反応速度が観測された。鉄四価オキソポルフィリン錯体とイミダゾール配位子の分光滴定から、中性配位子の示す高い反応速度は中性電荷である遷移状態への高い親和性に由来していることが示唆された。

一連の研究結果から、ヘム酵素におけるアミノ酸軸配位子は Compound I 中間体の酸化活性を高める上で重要な役割を果たしており、目的の基質と素早く反応させることで余分な副反応を未然に防いでいることが予測される。また軸配位子による酸化反応速度は活性種である Compound I 状態よりも、反応終状態である鉄三価ポルフィリン錯体の安定性に大きく依存していた。酵素は、休止状態である鉄三価状態のエネルギーを大きく安定化することで高い反応自由エネルギーを獲得していることが示唆された。金属オキソ種は酵素蛋白質の反応中間体としてだけでなく、実際の有機反応で利用されている触媒の活性種としても注目されている。本研究のように、配位構造と酸化活性との相関性を研究することは酵素機能の解明に限らず、将来的に優れた分子触媒の開発にもつながると考えられる。

論文の審査結果の要旨

ペルオキシダーゼ、カタラーゼ、チトクローム P450 など多くの酸化反応に関わるヘム酵素は、共通して鉄 4 価オキソポルフィリン π カチオンラジカル種(compound I)を活性反応中間体として生成する。この compound I が行う反応は酵素ごとに異なり、その反応性は酵素の環境により多様に変化する。compound I の反応性がどのように制御されているのかは、古くからある未だ未解明の問題である。高橋氏は、この問題に対して、これら酵素の軸位に配位するアミノ酸残基(軸配位子)が酵素ごとに異なることに着目し、軸配位子と compound I の電子構造、反応性の関わりを compound I モデル錯体から研究を行った。

本学位論文は、4 章から構成されている。第 1 章では、金属酵素やヘム酵素についての説明や compound I の研究の背景がまとめられている。第 2 章では、ヘムに結合するアミノ酸由来の軸配位子が compound I の電子構造や反応性をどのように制御するかを研究している。第 1 節では、アミノ酸由来の軸配位子を持つ compound I モデル錯体の合成とその同定、さらにそれら錯体の反応性について研究されている。アミノ酸由来の軸配位子は、配位子としての結合力が弱く、また強い還元性をもつため、これまで compound I の軸配位子として用いることができなかった。高橋氏は、これまでの酸化剤とは異なるオゾン酸化剤として用いること、対アニオンを配位力の弱い過塩素酸イオンなどを用いることでこれら問題の解決に成功し、ペルオキシダーゼやカタラーゼの compound I のモデル錯体の合成を可能にした。これらモデル錯体を用いて反応性を研究した結果、compound I の活性がアミノ酸由来の軸配位子により劇的に増加することを明らかにしている。これは、酵素内でも軸配位子が compound I の高い活性を維持する上で必須の役割をもつことを初めて証明した成果である。第 2 節では、第 1 節の結果に基づき、軸配位子が compound I の反応性を変化させる機構について研究している。種々のアニオン性の軸配位子をもつ compound I モデル錯体を合成し、電子構造と反応性の相関を研究した結果、鉄 3 価ヘムの酸化還元電位が compound I の活性と相関することを見出している。この発見から、compound I の活性は compound I 自身により決定されるのではなく、酸化反応が起こった後に生成する鉄 3 価ヘムの安定性により決定されているという新しい考えを示している。さらにこの考えを検証するため、compound I モデル錯体と鉄 3 価ヘムに対する軸配位子による安定性の変化を配位子交換反応から調べている。その結果、軸配位子に対する反応自由エネルギー変化が鉄 3 価ヘムの安定性により決定されていることを明らかにしている。これらの実験結果は、compound I の活性が酵素の休止状態(鉄 3 価ヘム錯体)の安定性によって制御されていることを初めて明らかにしたものである。これは、休止状態の安定性が反応遷移状態の安定性を変化させた結果として解釈される。さらに第 3 節では、第 2 節で提案した考えが第 1 節で研究したアミノ酸由来の軸配位子においても適応できるかを研究している。アミノ酸由来の軸配位子が compound I と鉄 3 価ヘム錯体の安定性をどのように変化させるかを測定した結果、フェノレートのようなアニオン性の軸配位子は、第 2 節で研究した他の無機アニオン性配位子と同様に、鉄 3 価ヘム錯体を大きく安定化させるため高い反応性が獲得できることを明らかにしている。一方、イミダゾールのような中性の軸配位子では、アニオン性配位子とは異なった遷移状態をとることを提案している。

第 3 章では、compound I の反応選択性や ENDOR を用いた電子構造の研究がまとめら

れている。第 1 節では、compound I モデル錯体とシクロヘキセンの反応を速度論的手法により研究を行っている。シクロヘキセンのエポキシ化反応とアリル位水酸化反応の活性化パラメーターを測定し、エポキシ化反応がエンタルピー制御の反応であるのに対して、水酸化反応がエントロピー制御の反応であることを明らかにしている。第 2 節では、compound I の電子構造を ENDOR 測定により研究を行っている。モデル錯体から得られた結果と compound I の結果を比較することにより、compound I の電子構造がこれまで提唱されている電子状態とは異なることを提案している。

第 4 章では、第 2 章、3 章の結論を総括し、本論文から得られた成果を基に compound I の反応性制御機構や酵素における軸配位子の役割について簡潔に議論されている。

以上のように、高橋氏は本論文の中で compound I のモデル錯体を用いて酵素反応における軸配位子の機能を解明し、新しい機能制御機構を提唱している。本研究の成果は、ヘム酵素の機能発現機構の分子レベルでの理解を深めるだけでなく、人工酵素や機能触媒の開発の基盤となるものである。本論文の内容は、既に国際的な英文雑誌に 2 報発表されている。これらのことを総合し審査委員会は、提出論文が博士（理学）の博士論文として十分であると全員一致で判断した。