

氏 名 松 井 敏 高

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第313号

学位授与の日付 平成10年3月24日

学位授与の要件 数物科学研究科 構造分子科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Roles of Distal Residues in Catalytic

Oxidation by Heme Enzymes

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 塩谷 光彦  
教 授 北川 禎三  
教 授 田中 晃二  
教 授 渡辺 芳人  
助 教 授 島田 秀夫（慶應義塾大学）

論文内容の要旨

「序論」 ヘム（鉄 - ポルフィリン錯体）を共通の活性中心に持つヘムタンパクは、生体内で様々な役割を担っており、その多様な機能とそれを制御する蛋白質の構造との相関を明らかにするために様々な研究がなされている。例えばペルオキシダーゼ類（ $H_2O_2$ を用いて1電子酸化反応を触媒）が2電子酸化当量を持つ酸化活性種、compound I（オキソ鉄4価ポルフィリンカチオンラジカル）を生成する過程に最も重要な残基は、ヘム遠位側のHis（遠位His、図1）であることが明らかにされている。遠位Hisは、 $H_2O_2$ の鉄への結合、O-O結合のイオニック開裂を一般酸塩基触媒として促進すると考えられている（図2）。

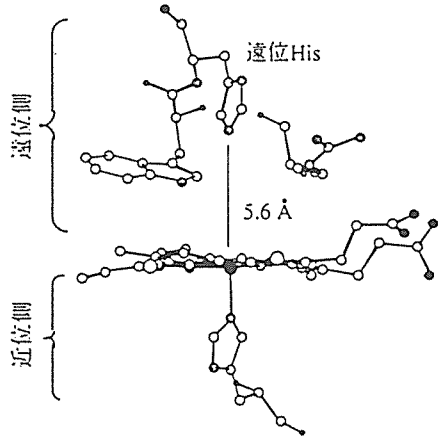


図1 cytochrome c peroxidase のヘム近傍構造

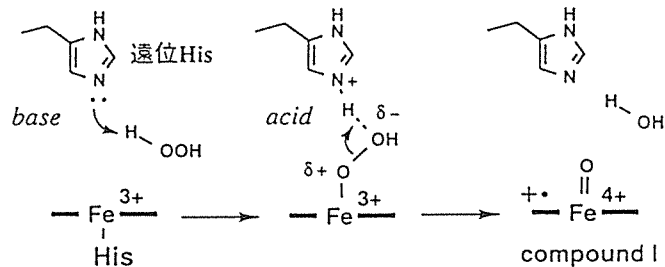


図2 ペルオキシダーゼにおける compound I 生成機構

ところが、ミオグロビン（Mb：分子状酸素の運搬）はペルオキシダーゼと同様に遠位Hisを活性中心に持つが（His64、図3）、Mbの遠位Hisには一般酸塩基としての機能が乏しく、 $H_2O_2$ との反応性は低い。さらに、Mbのcompound Iは極めて不安定と考えられており、1電子酸化当量を失ったcompound IIのみが観測される（図4）。従って、Mbが酸化酵素として機能しない理由を明らかにすることは、とりもなおさず酸化酵素に必要な構造因子を明らかにする事につながると考えられる。

そこで本論文では、主にペルオキシダーゼを規範としてMbのヘム近傍構造を改変し、Mbが酸化酵素として機能し得るか否かを検討した。また、これらの過程において高い酸化活性を示す変異型Mbが得られ、分子工学的側面からも興味深い結果が得られた。なお、ヘム近傍構造の改変は全て遺伝子工学的的手法による部位特異的アミノ酸置換法により行った。

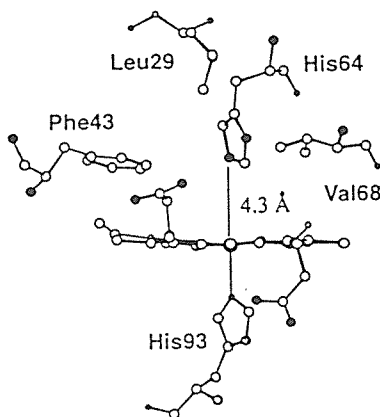


図3 ミオグロビンのヘム近傍構造

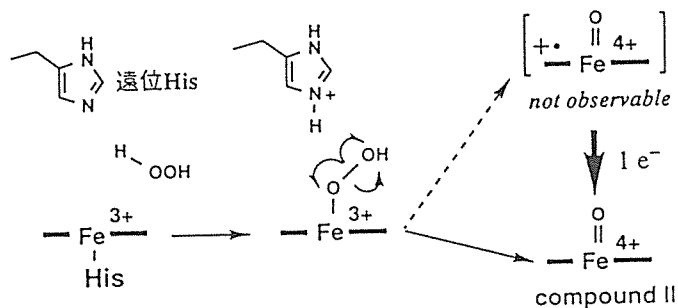


図4 ミオグロビンと  $H_2O_2$  の反応様式

「第一部」 図1、3に示したように、Mbの遠位Hisはペルオキシダーゼより1Å以上へ

ムに近い。この遠位Hisの位置の違いが、 $\text{H}_2\text{O}_2$ との反応性、酸化活性、反応メカニズムなどに与える影響を検討するために、遠位Hisをへムから遠ざけた変異型Mb、F43H/H64LおよびL29H/H64Lを合成した(図5)。F43H/H64Lの場合、へム鉄からHisまでの距離はペルオキシダーゼの場合とほぼ同じ(5.6Å)になると期待される。L29H/H64Lに関しては結晶構造が解かれており、Hisは図5に示したように酵素のものよりさらに1Å遠くに位置する。

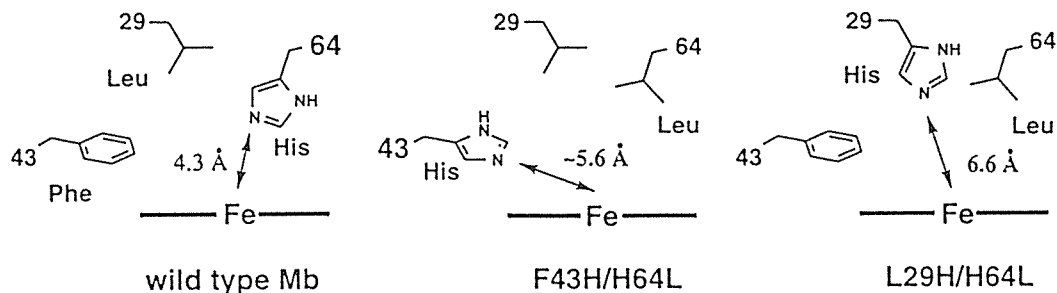


図5 野生型および変異型ミオグロビン

**第一章** F43H/H64L変異体は $\text{H}_2\text{O}_2$ との反応により、野生型と同様にcompound IIを与え、その速度( $\kappa(\text{H}_2\text{O}_2)$ )は野生型の1.1倍に向上した(表1)。一方、L29H/H64Lでは酸化活性種の生成は見られなかったが、 $\kappa(\text{H}_2\text{O}_2)$ は野生型の約1/3であることが示唆された。グアヤコールおよびABTSの1電子酸化活性は $\kappa(\text{H}_2\text{O}_2)$ にほぼ対応して変化し、F43H/H64Lの活性は野生型の約6倍に向上した(表1)。これら1電子酸化の律速段階は、 $\text{H}_2\text{O}_2$ との反応であることも明らかにした。クミルパーオキシドと各Mbの反応から、O-O結合の開裂様式を検討したところ、His43のみが酸触媒としてイオニック開裂を促進することが示唆された(図6)。一方、野生型Mbの遠位Hisはへムに近すぎるために両酸素原子と相互作用し、この結果O-O結合の開裂、つまり酸化活性種の生成を促進しないのではないかと考えられる。

表1  $\text{H}_2\text{O}_2$ との反応性および1電子酸化活性

	$k(\text{H}_2\text{O}_2)$ $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$	guaiacol $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}$	ABTS $\text{nmol}^{-1}$
wild type	$5.1 \times 10^2$	0.96	26
H64L	-	-	-
L29H/H64L	-	0.27	3.1
F43H/H64L	$5.6 \times 10^3$	6.2	150

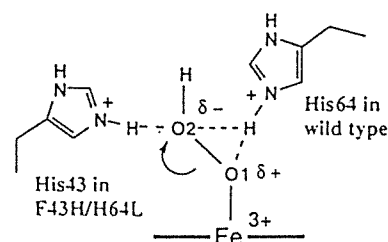


図6 遠位Hisと酸化剤との相互作用

**第二・三章** L29H/H64L、F43H/H64L変異型Mbは、スチレンのエポキシ化などの酸素添加反応において野生型の約10倍、300倍の活性を示し、かつ高いエナンチオ選択性を示した(表2)。 $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ を用いた研究から、これらの変異体は $\text{H}_2\text{O}_2$ 由来の酸素をエポキシドに添加することが示され、compound Iによる酸化が示唆された(図7)。一方、野生型では主に分子状酸素由来の酸素がエポキシドに取り込まれ、compound Iが速やかにcompound IIとアミノ酸ラジカルに壊れるためとされている(図7)。このことから、変異体のcompound Iは比較的安定なために効率的に外来基質の酸化を行うことができ、変異体の酸素添加活性を飛躍的に向上させていると考えられる。

表2 各 Mb によるスチレンのエポキシ化

myoglobin	rate turnover/min <sup>-1</sup>	ee (R%)	<sup>18</sup> O from H <sub>2</sub> <sup>18</sup> O <sub>2</sub> (%)
wild type	0.015	9	20
H64L	0.020	34	73
L29H/H64L	0.14	80	94
F43H/H64L	4.5	68	94

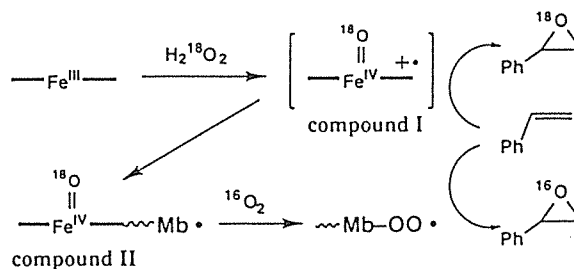


図7 ミオグロビンによるエポキシ化機構

実際F43H/H64Lでは、compound I 類似の吸収スペクトルを示す中間体が、*m*-chloroperbenzoic acid (*m*CPBA)との反応で観測された(図8)。さらに、この中間体が2電子酸化当量を持つことからcompound I であることが支持され、Mbのcompound I を観測した初めての例となる。野生型におけるcompound I の不安定化の要因として、ヘムに近すぎる遠位His(His64)がcompound I に速やかに酸化されることが考えられる(図9)。

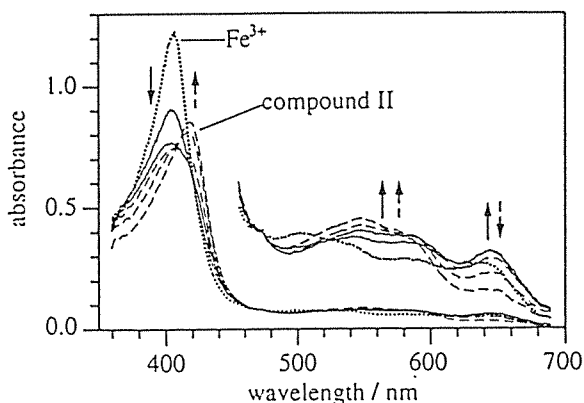


図8 F43H/H64L Mb と *m*CPBA の反応

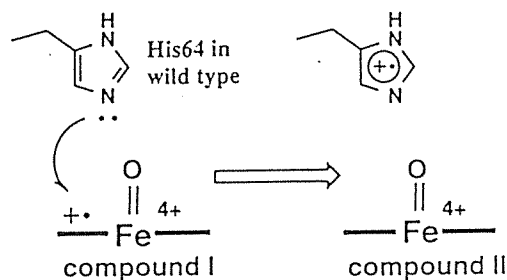


図9 野生型 Mb における compound I の不安定化機構

以上第一部の研究から、遠位Hisの位置がMbのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>との反応性、compound I の安定性などに大きな影響を持つことが示された。ペルオキシダーゼなどのヘム酵素が遠位HisをMbよりも遠くに持つということは、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>との反応のために位置を最適化した結果であると同時に、compound I による遠位Hisの酸化を防ぐための不可欠な要素ではないかと考えられる。

「第二部」 第一部の研究から、His64によるMbのcompound I の不安定化が示唆された(図9)。さらに、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>との反応ではcompound I は観測されず、触媒反応における活性種であるのか、その酸化活性への影響、また基質との反応性などは明らかでない。そこで第二部では、His64のみを酸化されにくいアミノ酸に置換した変異型Mbを合成し(図10)、これらの点を検討した。

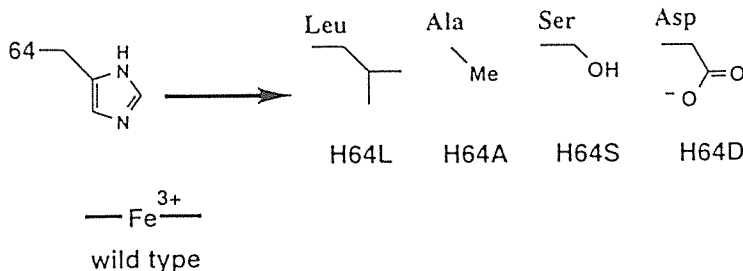


図10 野生型および変異型ミオグロビン



## 論文の審査結果の要旨

松井敏高君は、ヘム酵素の酸化活性発現におけるヘム遠位側残基の役割について研究を行った。本研究では、ヘムタンパク質一般のモデルとして、本来酸化酵素ではないミオグロビンおよびその部位特異的アミノ酸置換体を用いて、活性中心のアミノ酸残基の役割が検討されている。本研究の要点は次の2点にまとめられる。(1) 遠位ヒスチジンの位置が $H_2O_2$ の活性化過程、酸化活性種の安定性に与える影響、(2) ミオグロビンにおける2電子酸化当量を持つ酸化活性種 (compound I) の不安定化機構、およびその反応性などを明らかにした。

具体的には、まず(1)の観点から $H_2O_2$ の活性化を行う酸化酵素(ペルオキシダーゼ)との比較において、ミオグロビンの遠位ヒスチジンが約1 Åヘムに近いことに注目し、ヘム-遠位ヒスチジン間の距離が酵素の場合とほぼ同じになるF43H/H64L変異型ミオグロビン、および約1 Å遠いL29H/H64L変異体を合成し、野生型との比較を行った。 $H_2O_2$ との反応速度はF43H/H64L変異体において最大となり、His43のみが酸触媒としてO-O結合のイオニック開裂を促進することが示された。 $H_2O_2$ との反応性の変化は1電子酸化活性に反映され、実際に律速段階が $H_2O_2$ の活性化過程であることも明らかにした。一方で、遠位ヒスチジンを遠ざけることにより、ミオグロビンのcompound Iが安定化されることも見出した。この結果、上記の変異体においてミオグロビンのcompound Iの直接観測に初めて成功し、さらに、その酸素添加活性(2電子酸化)が飛躍的に向上することが示された。

また、(2)については、遠位ヒスチジンをLeu、Ala、Ser、Aspに置換した変異型ミオグロビンを用いて検討した。その結果、遠位ヒスチジンによるcompound Iの不安定化が直接示され、compound Iの反応性、酸化活性に与える影響などが明らかにされた。特に、Asp変異体は $H_2O_2$ との反応性は野生型の50倍以上に向上しており、1電子酸化、酸素添加活性の飛躍的向上が見られた。

さらに、酸素添加反応においては、高いエナンチオ選択性(最高97%)を示す変異体もあり、タンパク工学的な面からも非常に興味深い結果が得られている。

以上のように、本論文はヘムタンパク質の構造と機能の相関に関する有用な知見を得るとともに、高い酸化活性を示す変異型ミオグロビンが得ることに成功したものであり、学位論文としての十分な価値があると判断された。

また口述試験では、約1時間論文の内容について口頭で発表を行い、さらに1時間その内容について質疑応答および試問を行った。口頭発表は、研究の目的、内容、成果、今後の展望についてよく整理されたものであり、重要なポイントを押さえた大変分かりやすい発表であった。口頭発表後には、主に、(1) 反応活性中心のイミダゾール基の位置とpKa、(2) 各変異体のイミダゾール基-鉄間の距離や配向とイミダゾール基の酸としての働きの関係、(3) 不斉収率と反応速度の関係、(4) 反応中心の鉄上の水分子の有無と反応速度の関係についての質問や、今後の研究の展望などの幅広い質疑・試問がなされたが、松井君はそれらに対する的確な回答を行っており、本研究分野について十分に学習し理解していることがうかがえた。また、論文は英語で作成されているが、英語の能力についても高い評価を得た。

以上により、審査委員全員一致で、口述試験に合格であると判断した。