

氏 名 後 藤 義 夫

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第375号

学位授与の日付 平成11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 Reactive Intermediates in Catalyses by Heme
Enzymes

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 田中 晃二
教 授 渡辺 芳人
助 教 授 井上 克也
助 教 授 宮島 清一
教 授 福住 俊一（大阪大学）

論文内容の要旨

【序論】ヘム（ポルフィリン鉄錯体、図1）を反応中心に持つヘム蛋白質は生体内に多種存在し、その多様な機能と高い触媒活性のメカニズムに関する様々な研究が行われている。これらヘム蛋白質の中でも、シトクローム P450 は酸素分子を還元的に活性化し、通常困難とされる有機分子（薬物、ステロイドホルモン等）の水酸化を行うことから、その分子レベルでの反応機構に注目が集まっている。P450 の触媒サイクルは図2のように考えられている。すなわち、休止状態の鉄(III)に基質を取り込むことによりこの触媒サイクルはスタートし、1電子還元、酸素分子結合、さらに1電子還元を経てパーオキシ鉄(III)を与える。次いで、酸素-酸素結合がイオニックに解裂し、水1分子を遊離してオキシ鉄(IV)ポルフィリン π -カチオンラジカル（compound I）を生成する。酵素系ではパーオキシ鉄(III)状態以降は観測されていないが、前述のペルオキシダーゼやカタラーゼの場合には compound I が観測可能であることから、P450 においてもこの compound I が反応活性種であると考えられている。

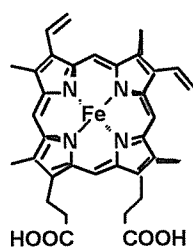


図1

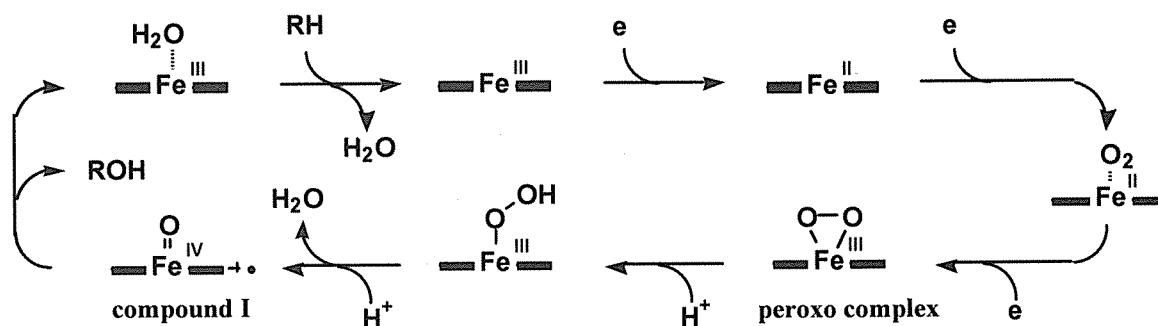


図2

こうした生化学的重要性から compound I には興味を持たれ、その構造に関する研究がペルオキシダーゼの compound I や合成モデル錯体を用いて行われてきたが、compound I の反応性に関する定量的な議論は立ち後れている。本研究ではこうした問題点を踏まえ、compound I と各種基質との反応過程を直接観察することによって定量的に評価することを試みた。そのために、過酸化水素や有機過酸との反応により比較的安定な compound I を生成させる以下の3つの系を用いて、compound I と基質との反応を直接観察し、その反応機構についての詳細な検討を行った。すなわち（1）西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）、（2）合成鉄ポルフィリン錯体、そして、（3）ミオグロビン（Mb）変異体 H64S である。

一方、シトクローム P450 の一般の反応の活性種は前述のように compound I による1酸素原子添加反応であると考えられているが、P450 反応の中には compound I を活性種とすると説明の付かない反応もいくつか存在する。胎盤中に存在するシトクローム P450 アロマトラーゼはその代表例であり、図4に示すように 男性ホルモンである androgen のメチル基を3段階の反応で脱離させ、女性ホルモンの estrogen に変換する。第3段階目でアルデヒドの脱ホルミル反応を行っているが、

通常 compound I はアルデヒドを2電子酸化によってカルボン酸に変換することがわかっており、この反応は compound I を活性種としたのでは説明が付かない。そこで本研究では、パーオキシ鉄錯体の反応性に着目し、パーオキシ鉄錯体のモデル錯体を合成し、アルデヒド化合物との反応を比較検討した。

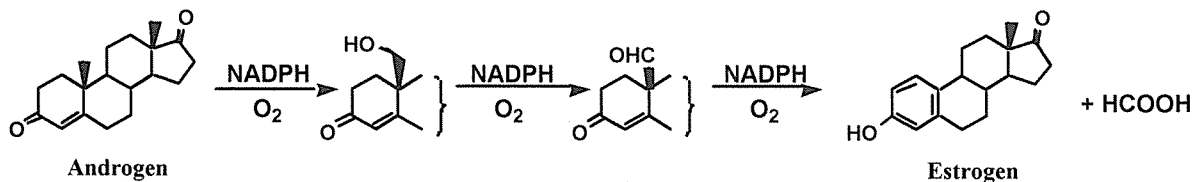


図3

【第1部】ヘムを有する酵素における高原子価中間体の反応性

シトクローム P450 の触媒する3級アミンの脱アルキル化反応及びスルフィドの酸化反応については生化学的見地からも興味を持たれている反応である。第1部では、上述の3つの compound I を用いて、3級アミン及びスルフィドとの反応を検討し、反応機構について考察する。

[第1章] 3級アミンの脱メチル化機構について

P450 による3級アミンの脱アルキル反応は、compound I によりメチル基が水酸化され、引き続き加水分解による脱メチル化反応によって完結するが、この水酸化反応のメカニズムが未だに議論の対象となっている。提案されている反応メカニズムは、アミンからの1電子移動/プロトン引き抜き、及びアミンからの直接水素原子引き抜きという2つの説である(図4 path A および B)。そこで本研究では、合成モデル錯体の compound I とジメチルアニリン(DMA)を用いた反応を直接観察した。さらに、反応速度の基質の酸化電位に対する依存性、および2) 速度論的重水素効果を検討した。その結果、compound I によるアミンの脱メチル化のメカニズムは、上述のいずれでもないことを明らかとした。すなわち、アミンからの1電子移動/水素原子の引き抜きである(図4 path C)。

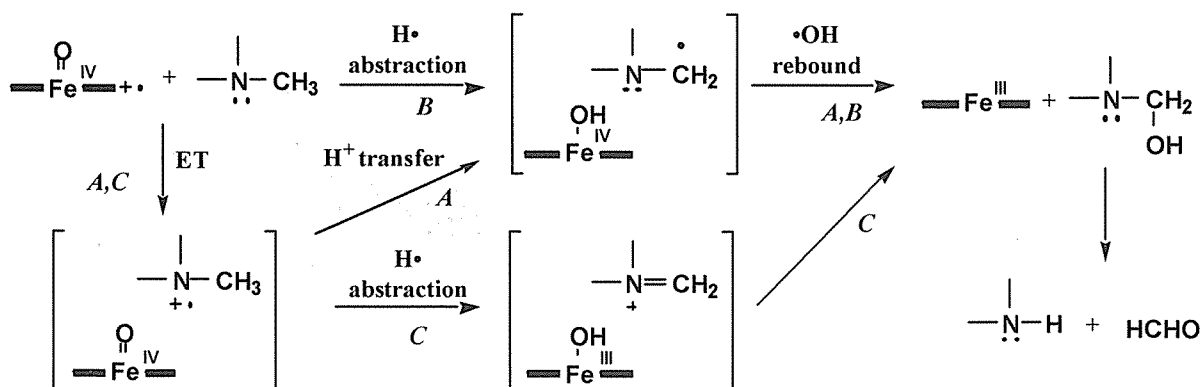


図4

[第2章] スルフィドの酸素添加反応機構について

compound I によるスルフィドのスルホキシ化反応のメカニズムは、1) 協奏的な硫黄原子上への酸素原子の移動反応、および、2) スルフィドからの電子移動/酸素のカップリングという2つの考え方がある(図5)が、明らかにされていない。本研究では、Mb 変異体の compound I とチオアニソール誘導体の反応を直接観察によって検討した。Mb 変異体の compound I はチオア

ニソールとの反応によって FeIII の状態へと変化したが、スルフィドの酸化電位に対する反応速度の依存性がみられた。さら Mb 変異体の compound I と 1,8-Dithiacyclooctane (DTCO) との反応過程で compound I から 1 電子還元を受けた compound II ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) が中間体として観測されたことから、compound I によるスルフィドへの酸素添加反応が上述の電子移動/酸素のカップリングにより進行することが示された。

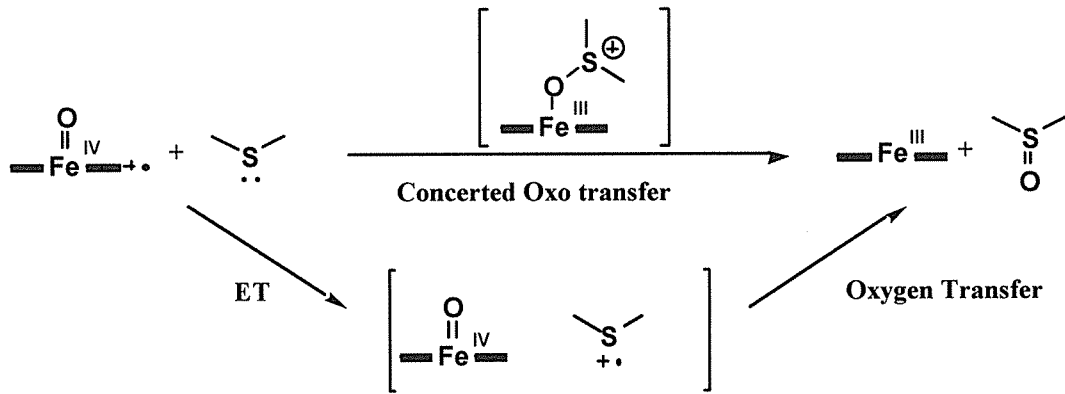


図5

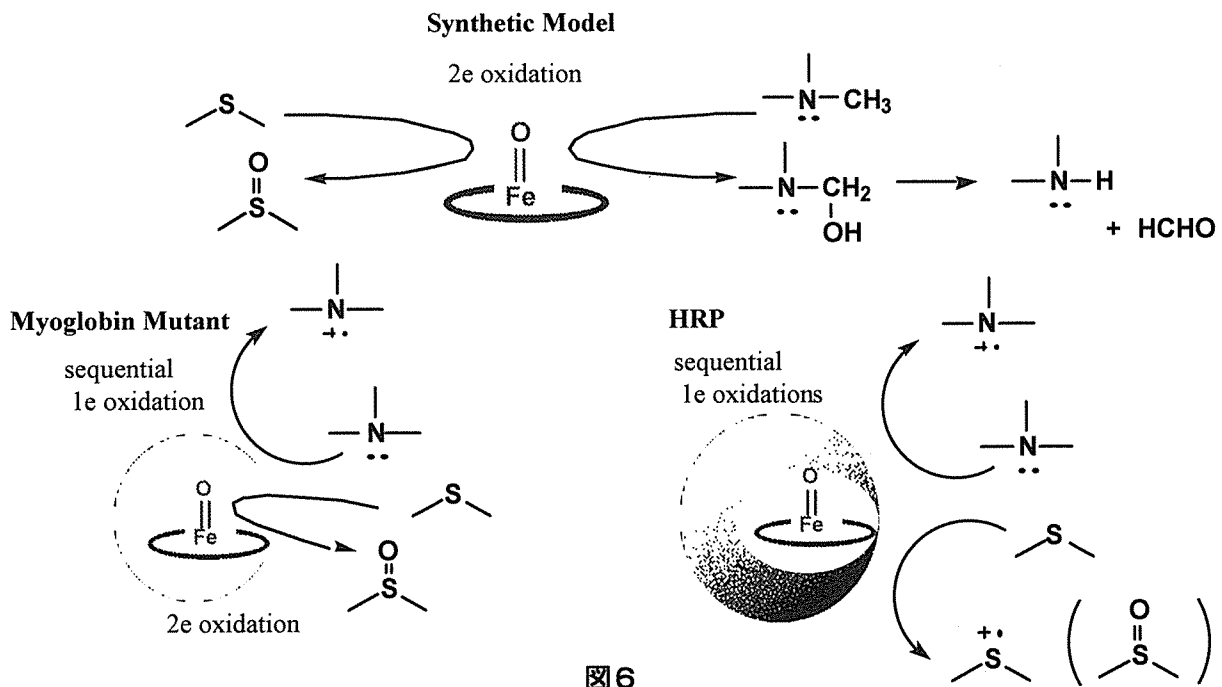


図6

[第3章] 反応性に基づいた酵素の機能-構造相関

前2章で明らかにされた、各 compound I の反応性から酵素機能の構造との相関について考察した。HRP の compound I はアミン脱メチル化においてもスルフォキシ化においても、本来の機能である 1 電子酸化の反応性を基本的を示したのに対し、合成モデルの compound I はいずれの反応においても 2 電子酸化プロセス (酸素原子移動) を示した (図6)。最近報告された HRP の X 線構造解析によれば、HRP のヘムは芳香族性のアミノ酸残基によって囲まれており、基質のオキシ酸素へのアクセスが困難になっている。この基質のアクセサビリティの差が、HRP と合成モ

デル系の compound I の反応性の差異をよく説明していると考えられる。一方、Mb 変異体の compound I は酸化電位の低い DMA や DTCCO との反応では HRP のような 1 電子酸化の反応を示したが、酸化電位のより高いチオアニソールとの反応では、合成モデル系のような 2 電子酸化プロセスを示した (図 6)。したがって、ミオグロビン変異体の活性中心は、HRP と比較するとかなりアクセスしやすくなっており、酸素添加反応を行うことが可能であるが、合成モデル錯体ほどアクセスしやすくないので、1 電子酸化電位の低い基質に対しては電子移動による 1 電子酸化を行うものと考察される。これに対し、合成モデル系では、中間に生成していると考えられる [基質カチオンラジカル・Fe^{IV}=O] 複合体の再結合が早いため、何ら中間体が観測されなかったと結論された。

【第 2 部】パーオキシ鉄(III)ポルフィリン錯体の反応性

序論で記したように、パーオキシ鉄(III)ポルフィリン錯体はいくつかの P450 反応で活性種と考えられており、その反応性に興味を持たれている。アロマトラーゼの反応に関して言えば、compound I が求電子性のキャラクターを持つのに対し、パーオキシ錯体は求核性を有することが予測されることから、アルデヒド炭素への求核攻撃が可能となり、脱ホルミル反応という特異な反応を起こすことが可能になると考えられる。もしそうであれば、図 2 に示した P450 の触媒サイクルにおいて、酸素-酸素結合の解裂に至る前にパーオキシ錯体と基質であるアルデヒドが反応するという筋書きがなりたつ。しかしながら、この中間体を酵素系で観測した例はなく、したがって反応性は未知である。そこで本研究では、このパーオキシ(III)錯体のモデル錯体を合成し、アルデヒドとの反応性を検討し、compound I のモデル錯体とアルデヒドとの反応と比較検討を行った。パーオキシ錯体のモデル錯体の合成は Valentine らの報告にしたがって合成した。この錯体は水分に対して非常に敏感なため、反応等についてはすべて不活性ガス雰囲気下で行った。その結果、compound I のモデル錯体はアルデヒド類を対応するカルボン酸へと変換したのに対し、パーオキシ錯体はアルデヒド類を脱ホルミル化し、オキシ化合物を与えた (図 7)。この反応を吸収スペクトルや ESR スペクトルの変化により検討すると、パーオキシ錯体がアルデヒドを求核攻撃し、生じたパーオキシヘミアセタールアニオンを中間体とする複雑な反応であることが示唆された (図 8)。反応メカニズムの決定にはさらに詳細な検討を要するが、compound I では起こらない反応がパーオキシ錯体では起こりうるということ、また、パーオキシ錯体によるアルデヒドに対する求核攻撃が進行することを示す興味深い結果を得た。

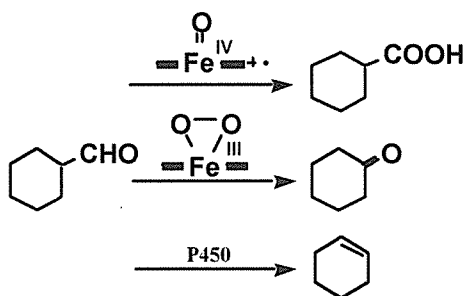


図 7

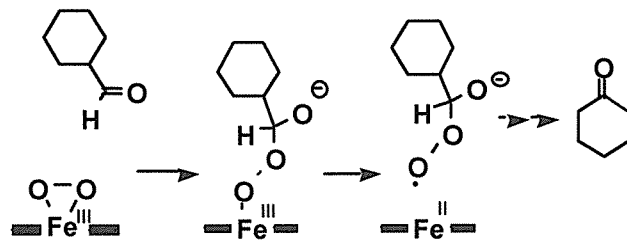


図 8

論文の審査結果の要旨

ヘムを反応中心に持つヘム蛋白質は生体内に多種存在し、その多様な機能と高い触媒活性のメカニズムに関する様々な研究が行われている。これらヘム蛋白質の中でも、シトクローム P450 は酸素分子を還元的に活性化し、通常困難とされる有機分子（薬物、ステロイドホルモン等）の水酸化を行うことから、その分子レベルでの反応機構に注目が集まっている。本研究では、こうした問題点を踏まえ、酵素の酸化活性種と各種基質との反応過程を直接観察することによって、定量的に評価することを試みている。

具体的には、西洋わさびペルオキシダーゼ、合成鉄ポルフィリン錯体、ミオグロビン変異体 H64S を用いて、酸化活性種を調整し、主にストップフローによる吸収スペクトル測定を用いて反応の直接観察を行っている。その結果、3級アミンの脱メチル化機構に関しては、アミンからの可逆な1電子移動/水素移動により反応が進行することを定量的に明らかとした。一方、スルフィドの酸素添加反応機構では、アミン類と同様な1電子移動を含む過程と、直接的な酸素添加反応の二種類の過程が存在し、どちらの機構で反応が進行するかは、1) 酵素の活性部位周辺の構造、2) 基質の酸化還元電位、3) 基質の立体構造に依存することが示された。

このように、本研究は酵素の反応機構解明に分子科学的な視点からのアプローチを行うことで、従来になかった定量的な機構解明の新たな手法を提供している。

こうした研究成果は、既に発表された2報の論文(英文)と、現在投稿中の1報の論文として発表されている。本審査委員会では、後藤義夫氏の提出論文は学位を与えるに相応しいものとなっていると判定した。

面接による試験は、出願者に学位論文の内容を約1時間で発表してもらい、その後、酵素およびモデル系における反応、測定結果の速度論的取り扱い、酸化活性種への電子移動過程の詳細を中心に1時間半にわたって質疑応答を行い、活発な論議が展開された。多面的な質問に対し、的確に答えると共に、今後の研究の方向・解決すべき課題に対しても確固とした考えを持っていると判断された。

本論文は英語で書かれており、既に発表されている2報の論文(英文)を中心に英語力を審査し、語学力に何等問題はないと判定された。

また、公開発表会における発表も良く整理されており、合格と認定した。