

氏 名 加 藤 茂

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第718号

学位授与の日付 平成15年9月30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 ミオグロビン変異体によるヘム酵素の機能解明

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 木下 一彦
教授 青野 重利
教授 横山 利彦
教授 魚住 泰広
教授 渡辺 芳人（名古屋大学）
教授 長谷 俊治（大阪大学）

論文内容の要旨

生体内では、タンパク質が三次構造を巧みに利用することにより反応制御を行っている。ヘムタンパク質・酵素も活性中心近傍のアミノ酸残基による反応制御によって、一電子酸化反応、水酸化反応、電子伝達、 O_2 センサー、CO センサー等様々な機能発現を可能にしている。その中でもヘム酵素による酸化反応とその機構解明は、近年の環境問題から非常に注目されている研究分野の一つである。

最近、酸素貯蔵タンパク質であるミオグロビン (Mb) の変異体が多く酸化反応を触媒することが報告されている。例えば、ヘム鉄-遠位ヒスチジン間の距離がシトクロム *c* ペルオキシダーゼや西洋ワサビペルオキシダーゼの活性中心の構造に近くなるように設計された F43H/H64L Mb および L29H/H64L Mb は、過酸化水素を酸化剤として用いることでスルフィドやオレフィンの不斉酸化を触媒することが知られている。また、高難度な酸化反応を触媒する例として、F43W/H64L Mb では、43 位の Phe を Trp に置換、固定することで Trp の芳香環の位置選択的酸化に成功している。このように、多くの酸化反応を触媒する Mb 変異体を用いて、ヘム酵素による酸化反応機構の解明が可能であると考えられる。

以上のことから、Mb 変異体を用いてヘム酵素による酸化反応に重要な役割を果たしていると考えられている (1) 一般酸塩基触媒の作用、(2) 軸配位子に対する水素結合の存在、(3) 基質の結合様式の 3 点に注目した研究を行った。具体的には、第二章ではヘム酵素の一般酸塩基触媒の作用を検討するために、特に一般酸塩基触媒を用い触媒反応を効率的に行なっていると考えられるカタラーゼの反応に注目し、カタラーゼおよび Mb 変異体を用い反応機構の解明を試みた。第三章では軸配位子に対する水素結合の影響を検討するために、Mb の軸配位子を Tyr に置換し、軸配位子に水素結合を導入することでカタラーゼ反応における軸配位子への水素結合の役割を検討した。第四章では、Mb 変異体が行なう酸化反応におけるエナンチオ選択性の違いが基質の結合様式によるものか、を検討するため Mb によるチオアニソールの酸化反応の遷移状態モデルとしてメチルベンジルアミンを用い、速度論的解析を試みた。以後、各章に分けて記述する。

第二章

カタラーゼの反応サイクルの第二段階目の反応、すなわち過酸化水素を酸化的に分解し、酸素分子と水に変換する過程で、一般酸塩基触媒による過酸化水素からのプロトンの引き抜きが重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、一般酸塩基触媒を持たない Mb 変異体もカタラーゼ活性を示す。そこで、一般酸塩基触媒を持つ F43H/H64L Mb や触媒を持たない H64X (X = A,S,D) Mb、さらにカタラーゼ自身も用い、活性中心環境の影響を調べるために 3H でラベルされた過酸化水素を用い、速度論による反応素過程の解析を行った。

その結果、一般酸塩基触媒を持つ変異体 (F43H/H64L Mb) およびカタラーゼでは k_{H1}/k_D がそれぞれ 2.1、4.0 という小さな値を示し、一般酸塩基触媒を持たない変異体 (H64X (X = A,S,D) Mb) では k_{H1}/k_D が 10 以上の大きな値で、後者は、温度依存性の実験からトンネル効果によるものであることを示した。このことから、2 種類の反応機構、すなわち、i) 一般酸塩基触媒が存在する場合、His が塩基触媒として働き、最初に過酸化水素からプロトンを引き抜くことで小さな同位体効果を示すイオン的な反応機構と、ii) 一般酸塩基触媒がない場合、酸化活性種である compound I (cpd I) による過酸化水素からの水素原子の引き抜きにより反応が始まるラジカル的な反応が存在する事を確認した。

第三章

カタラーゼは、ヘム鉄に配位した Tyr の酸素と近傍の Arg との間で水素結合を形成していることがわかっているが、この水素結合とカタラーゼ活性の関係は不明である。そこで軸配位子への水素結合の影響を検討するた

めに、Mbの軸配位子である93位HisをTyrに換え、Tyrのフェノレート酸素に対して水素結合を導入していない変異体(H64A/H93Y Mb)、水素結合を導入した変異体(H64A/L89Q/H93Y および H64A/L89R/H93Y Mb)を作成し、Mb変異体と過酸化水素の反応による酸素発生、ABTSの酸化、およびMb変異体と*m*CPBAの反応によるスペクトル変化の測定から反応性を検討した。

その結果、過酸化水素との反応による酸素の生成では、水素結合を有している H64A/L89Q/H93Y および H64A/L89R/H93Y Mb は、水素結合を持たない H64A/H93Y Mb に比べ、3-4 倍の酸素の生成能を示した。一方、酸化活性種である cpd I の生成速度を見積もるために、Mb 変異体と過酸化水素の反応による ABTS の酸化反応速度を求めたが、ほとんど差が見られなかった。また、*m*CPBA と変異体の反応では水素結合を導入した変異体ではスペクトルの変化が観測されたものの、水素結合を導入しなかった H64A/H93Y Mb ではスペクトルの変化は全く見られなかった。このことから、Mb 変異体と過酸化水素の反応の触媒サイクルにおいて、cpd I と過酸化水素の反応および過酸化水素のへム鉄への配位の過程で軸配位子に対する水素結合の効果が現われると結論した。

第四章

酸化反応におけるエナンチオ選択性は立体障害による基質の配向の制御によって達成されると考えられるが、反応サイクルのどの段階が制御されるのか不明であり、詳細な反応機構の解明は簡単ではない。そこで、Mb 変異体(H64D/V68A および H64D/V68S Mb)と過酸化水素によるチオアニソールの酸化反応の遷移状態に近い構造を有するメチルベンジルアミンの Mb 変異体への配位体を用い、へム鉄に対するアミンの結合速度と解離速度の速度論的解析による検討を行なうことにした。

その結果、Mb 変異体への *R*-および *S*-メチルベンジルアミンの結合速度にはほとんど差は見られなかったのに対し、解離速度に大きな差が見られた。スルフィドの酸化では *R*-スルフォキシドが選択的に生成する。一方、Mb 変異体-アミノ結合では *S*-アミンが *R*-アミンよりも小さな解離速度定数を示すということから、Mb 変異体と過酸化水素によるチオアニソールの酸化反応でも、遷移状態の Fe-O-S*(R')から Fe-O 結合の解裂速度は *S*-体が *R*-体よりも小さな値を示すと考えられる。すなわち *R*-スルフォキシドの優先的生成は Fe-O-S*(R')の Fe-O 結合の解裂速度が、*R*-体の方が *S*-体に比して圧倒的に速いことに起因すると結論された。

論文の審査結果の要旨

生体内では、タンパク質が三次構造を巧みに利用することにより反応制御を行っている。本論文では、酸素貯蔵タンパク質であるミオグロビン(Mb)の変異体を用いて、ヘム酵素による酸化反応に重要な役割を果たしていると考えられている(1)一般酸塩基触媒の作用(第二章)、(2)軸配位子に対する水素結合の存在(第三章)、(3)基質の結合様式(第四章)の3点に注目した研究を行っている。

カタラーゼは過酸化水素を酸化的に分解し、酸素分子と水に変換するヘム酵素である。過酸化水素を分解する過程で、ヘム近傍に存在するヒスチジン残基が一般酸塩基触媒として重要な役割を果たしていると考えられている。そこで第二章では、一般酸塩基触媒となるヒスチジン残基を適切に導入した Mb 変異体と一般酸塩基触媒を持たない Mb 変異体を用い、重水素効果を中心に速度論による反応素過程の解析を行った。その結果、一般酸塩基触媒を持つ変異体およびカタラーゼでは、軽水中と重水中の反応速度定数の比 k_H/k_D が 2-4 程度の小さな値を示し、一般酸塩基触媒を持たない変異体では k_H/k_D が 10 以上の大きな値を示した。これより、二種類の反応機構の存在が明らかとなった。すなわち、一般酸塩基触媒が存在する場合は、過酸化水素の分解がイオニックな反応機構で進行し、一般酸塩基触媒がない場合は、水素原子の引き抜きを伴うラジカル機構で反応が進行する。

カタラーゼの活性中心を構成するヘム鉄にはチロシンが配位し、チロシンのフェノレート酸素と近傍のアルギニンとの間で水素結合が形成されている。この軸配位子への水素結合がカタラーゼの機能発現にどのような影響を与えているのかを検討するために、第三章では、Mb の軸配位子であるヒスチジンをチロシンに置換し、チロシンのフェノレート酸素に対して水素結合を導入していない変異体および水素結合を導入した変異体を作成し、カタラーゼ活性に対する効果を検討した。水素結合の形成は EPR および共鳴ラマン測定等から示唆された。さらに、水素結合を導入した Mb 変異体は、非導入の変異体に比べて過酸化水素の分解反応が 3-4 倍加速されることを示した。この章で行った水素結合に関する研究結果には、今後さらに検討を加える必要があるが、軸配位子への水素結合導入というアプローチはこれまでにないものであり、申請者の創意工夫の跡が認められる。

第四章では、Mb 変異体によるスルフィド類の酸化反応におけるエナンチオ選択性が反応のどの段階で決められるのかを検討している。その際、R-体および S-体を生成する酸化反応の遷移状態の相対的な安定性を評価するために、遷移状態と類似するメチルベンジルアミン配位 Mb 変異体を作成し、ヘム鉄に対するアミンの結合速度と解離速度の速度論的解析による検討を行っている。その結果、エナンチオ選択性は生成物の酵素からの脱離の容易さで決められていることを明らかにした。

こうした一連の研究成果は、既に二報の論文(英文)としてまとめられており、本審査委員会では、加藤 茂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、論文内容全体について1時間半にわたって質疑応答を行った。本学位論文では「ミオグロビン変異体を用いたカタラーゼの作用機序の解明」と「ミオグロビン変異体による不斉酸化反応の機構解明」が主題とされており、質疑応答では、変異体の設計指針、速度論的取り扱い、酵素活性発現の機構等に関し活発な論議が展開された。いずれの質疑に対しても適確な応答があり、研究の展開力や考察力、さらには討論に関して十分な能力を持ち合わせていると判定

された。

本論文は日本語で書かれているが、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。

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。