

氏 名 原 功

学位（専攻分野） 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第546号

学位授与の日付 平成13年9月28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 Molecular Design of Heme Enzyme Active Site

論文審査委員 主査 助教授 永田 央  
教授 北川 禎三  
教授 田中 晃二  
教授 渡辺 芳人  
助教授 藤井 浩  
教授 牧野 龍 (立教大学)

「第一部」ヘム(鉄-ポルフィリン錯体)を活性中心に持つヘムタンパク質は生体内に広く存在し、様々な役割を果たしている。個々のヘムタンパク・酵素の機能の違いはヘム近傍構造の違いに起因していると考えられる。

そこで本論文では、ヘム酵素に見られる構造因子をミオグロビン(Mb)内に再構築することにより、酵素活性やヘムの配位構造に与える影響を検討した。本研究の結果、Mb 変異体を用いて初めてシトクローム P450 型の芳香族分子の酸化反応が進行することを明らかにし、さらに、カタラーゼを規範として、安定なチロシン軸配位子を持つ5配位高スピン型構造を構築することに成功した。

「第二部」ペルオキシダーゼを規範として、本来酸素貯蔵機能しかないMbの遠位ヒスチジンをヘム鉄から遠ざけたF43H/H64L Mbは非常に高い酸素添加活性を示し、ヘム酵素に共通した活性中間体である、鉄4価ポルフィリンラジカルカチオン(compound I)の直接観測を初めて可能にした。そこで、ヒスチジンと類似の構造を持ち、酸化されやすいアミノ酸であるトリプトファンをPhe-43の位置に導入したF43W MbとF43W/H64L Mbを作成し、その酸化活性を測定した(図1)。また、F43W/H64L Mbと*m*-クロロ過安息香酸(*m*CPBA)との反応でcompound Iが生成する過程においてTrp-43が酸化的に修飾されていることが明らかとなり、その酸化修飾機構について検討した。

第1章 F43W MbとF43W/H64L Mbを用いると、ペルオキシダーゼの代表的な基質であるグアヤコールは、過酸化水素が過剰に存在する条件下で、それぞれ野生型(WT)やH64L Mbに比べて3-4倍の速度で酸化された(表1)。この1電子酸化反応の律速段階はcompound Iの生成過程にあることから、トリプトファンは過酸化水素との反応性を向上させていると考えられる。同様な傾向はチオアニソールのスルフォキシ化およびスチレンのエポキシ化反応(2電子酸化)でも観察された(F43W>WTかつF43W/H64L>H64L)(表2)。また、チオアニソールの酸化反応において、トリプトファンを導入した変異体はそれぞれトリプトファンを持たないWTやH64L Mbに対して20倍以上の活性を示した。これは、1電子酸化反応活性の向上率(3-4倍)よりも大きいことから、トリプトファン変異体では生成したcompound Iが効率良く基質を酸化しているのではないかと予想された。そこで、遠位ヒスチジンがロイシンに置換されているH64L、F43W/H64L Mbにおいて*m*CPBAを酸化剤として生成したcompound Iとチオアニソールとの反応の速度を比較した。F43W/H64L Mbのcompound Iと基質との反応速度はH64L Mbよりも2倍程度速く、2電子酸化活性が向上した要因の一つであると考えられる。

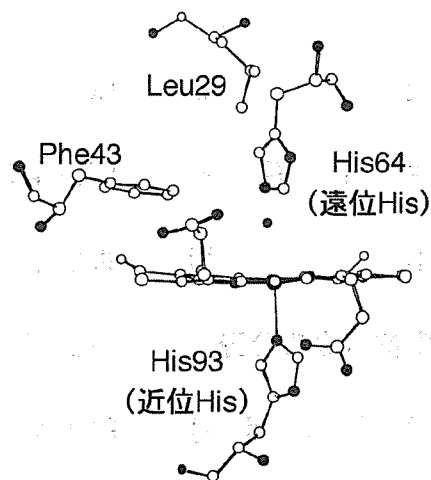


図1. ミオグロビンのヘム近傍構造

表1. グアヤコール酸化活性

Myoglobin	Guaiacol Oxidation ( $\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ )
Wild Type	32
F43W	140
H64L	0.24
F43W/H64L	0.75

表2. チオアニソールのスルフォキシ化活性とスチレンのエポキシ化活性

	Thioanisole		Styrene	
	rate ( $\text{min}^{-1}$ )	% ee	rate ( $\text{min}^{-1}$ )	% ee
Wild Type	0.64	24	0.011	15
F43W	13	30	0.16	48
F43W/H64L	1.9	24	0.11	50
H64L	0.072	27	0.020	34

ところが、F43W/H64L Mbと *m*CPBA との反応後のタンパクの分子量は 29-32Da 増加しており、タンパク質が修飾されていることが明らかとなった。この分子量の増加は導入したトリプトファン修飾によるものと推定された。そこで、F43W/H64L Mb の修飾部位を決定するためにリシルエンドペプチダーゼ(Lys-C)で分解し、FPLCによりペプチド断片を分離、分取した後、質量分析によりフラグメントの分子量を確認した。その結果、Trp-43のみ 30 Da 分子量が増加していることが判明した。この分子量の増加はトリプトファンに酸素原子が2つ挿入され、水素原子が2つ抜けたものと説明できる。

第2章 シトクローム P450 は様々な芳香族・脂肪族分子の一原子酸素添加反応を触媒するヘム酵素である。一つの例として、P450cam は基質である camphor をヘム近傍に水素結合に

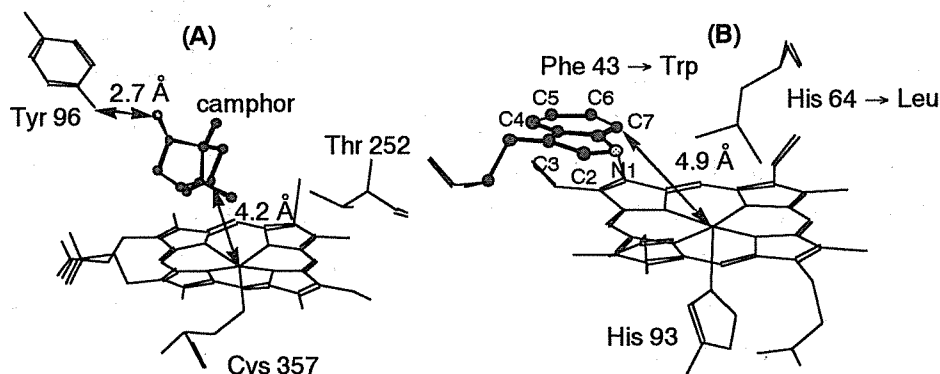
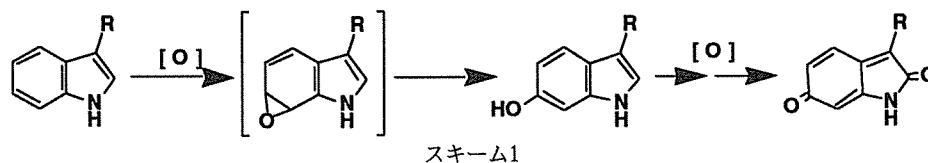


図3. (A) P450camの結晶構造、(B) F43W/H64L Mbの推定構造

より固定していることが結晶構造から明らかとなっている(図3A)。一方、これまでMb変異体を用いた系では芳香族・脂肪族分子の酸化反応は進行しなかったが、基質をヘム近傍に固定化することでP450に見られる基質の酸化反応が進行するのではないかと仮定した。トリプトファンをPhe-43の位置に導入したF43W/H64L Mbは、導入したトリプトファンがヘム近傍に固定されていることからこの仮定を検証するための良いモデルである(図3B)。

*m*CPBA との反応により得られた、修飾型トリプトファンを含むペプチドフラグメントを大量に精製し、NMRによりその構造を同定した。その結果、生成物はトリプトファンに酸素原子が2つ挿入され、水素原子が2つ引き抜かれた tryptophan-2,6-dione であることが判明した。F43W/H64L Mbと *m*CPBA の反応により compound I が生成することが確認されており、F43W/H64L Mb 推定構造からトリプトファンの7位がヘム鉄に最も近いことから、トリプトファンの酸化修飾機構の最初の段階は、一原子酸素添加反応による6,7位のエポキシ化であると考えられる。その後溶媒のH<sub>2</sub>Oにより加水分解され6-hydroxyindoleが生成した後、さらに4電子酸化され tryptophan-2,6-dione が生成したのではないかと推定した(スキーム1)。

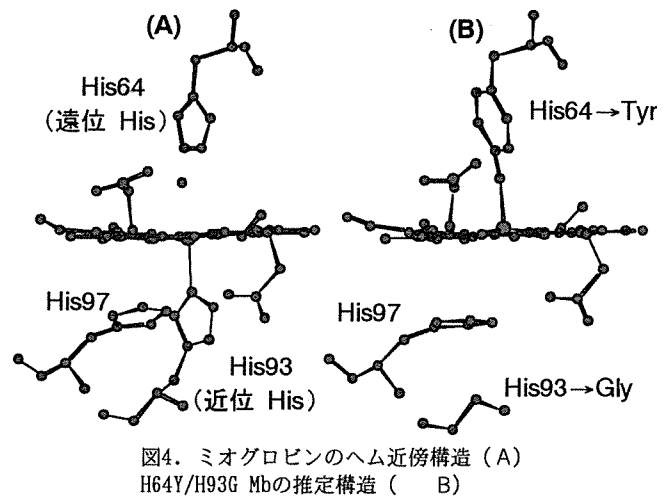


スキーム1

トリプトファンをヘム近傍に固定化したことにより、Mb変異体において芳香環への酸素原子添加反応が達成された。この結果は、ヘム近傍における基質の固定化が芳香環の酸化のために重要な要素であることを示している。

「第三部」カタラーゼはチロシンを軸配位子とした5配位高スピン型構造を持ち、過酸化水素の不均化反応を触媒するヘム酵素である。

本研究では、Mb の構造を保持したまま軸配位子としてチロシンを導入し、5 配位高スピン型構造を構築するために、遠位ヒスチジン (His64) をチロシンに変換し、さらに本来の軸配位子である近位ヒスチジン (His93) も同時にグリシンに変換した H64Y/H93G Mb 二重変異体を作成した (図 4)。近位ヒスチジンをグリシンに変換することにより基質がヘムキャビティーに入り込むための十分な空間を与えることができると考えられる。また、Mb の近位側にはカタラーゼの遠位ヒスチジンとほぼ同じ位置に 97 番目のヒスチジンが存在していることから、97 番目のヒスチジンが一般酸塩基触媒として機能することが期待される。チロシンの配位構造は、吸収スペクトル、電子スピン共鳴スペクトル、共鳴ラマンスペクトル測定により確認した。



その結果、Mb で初めて安定なチロシン軸配位子を持つ 5 配位高スピン型構造を構築することに成功した。また電子スピン共鳴スペクトルから、H64Y/H93G Mb は電子構造的に、カタラーゼに近い構造をしていることが確認された。残念ながら、H64Y/H93G Mb はカタラーゼ活性を全く示さなかった。従って、カタラーゼ活性の発現には軸配位子だけでなく別の要素が必要不可欠であると考えられる。

## 論文の審査結果の要旨

ヘムと呼ばれる鉄-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質は生体内に広く存在し、様々な役割を果たしている。個々のヘムタンパク・酵素の機能の違いはヘム近傍構造の違いに起因していると考えられる。酵素及び合成モデル系を用いて「ヘム酵素の構造-機能相関の解明」を目指す研究が進められている。従来の研究との最大の違いは、本研究では、「酸化酵素機能を持たないミオグロビンに対し、ターゲットとする酵素活性を付与するための分子設計を行っている点」であり、単に解釈・説明のためのミュレーションから一歩進んで、人工的に酵素を作りだそうという視点は極めてユニークであり、重要な視点と考えられる。本論文では、ヘム酵素の構造-機能相関を明らかにする事を目的として、ヘム酵素に見られる構造因子をミオグロビン内に再構築する事により、酵素活性やヘムの配位構造に与える影響が検討されている。本研究の結果、ミオグロビン変異体を用いて初めてシトクローム P-450 型の芳香環への一原子酸素添加反応、いわゆるモノオキシゲナーゼ反応が進行する事が明らかとなり、また、カタラーゼを規範として、安定なチロシン軸配位子を持つ 5 配位高スピン型構造を構築する事に成功している。

まず、第二部においては、これまでの研究から酸化活性種を生成する事が判っているミオグロビン変異体に対して、さらにヘム近傍に芳香環を固定化する変異を加える事により、ミオグロビン変異体において初めて芳香環への酸素原子添加反応を達成している。具体的には、ヘム近傍に存在しているフェニルアラニンをトリプトファンに変異させる事で、よりヘム鉄に近い位置にトリプトファンのインドール環を固定化した。これは、ヘム近傍に存在するアミノ酸を利用して、酵素の基質結合部位に固定化された基質をモデル化した、新規な手法である。これまで、最も強力な酸化酵素として知られるシトクローム P-450 の機能発現には、システインを軸配位子とする事が必須であると考えられてきたが、本研究の結果、ヘム近傍に基質を固定化する事が芳香環やアルカンの酸化反応には重要で、チオレート軸配位子は必須条件ではない事を初めて示した。

第三部においては、ミオグロビンの軸配位子であるヒスチジンを取り除き、ヘム面の反対の方向からチロシンを配位させる事で、カタラーゼの活性中心構造モデルをミオグロビン変異体を用いて構築する事に成功している。

このように原君の論文では、ミオグロビンのヘム近傍構造を巧みに利用し、天然に存在するヘム酵素の構造因子をミオグロビン内に再構築する事で、ヘム酵素の構造-機能相関に関する有用な知見を得る事に成功している。

以上の結果は、国際的な英文雑誌に 2 報の論文として発表され、博士論文として十分に高い価値を持つものであり、学位を与えるに相応しいと判定した。

原功君の博士論文に関する口述試験は 8 月 7 日に実施された。具体的な研究成果について約 1 時間の発表があり、それに続いて審査委員による質疑応答・討論が約 1 時間半にわたって行われた。その結果、論文内容と同君の専門的学力は十分であると認められた。

語学力については、論文が英文で書かれており、既発表の英語論文等からも十分な水準に達していると判断された。さらに、8 月 31 日の公開發表会では論文の主要部分についての的確にまとめた報告がなされた。この結果、審査員全員一致して合格とした。