

ミオグロビン変異体によるヘム酵素の機能解明

加 藤 茂

博士論文

総合研究大学院大学
数物科学研究科 構造分子科学専攻

平成十五年度

(2003)

目次

第一章 序論	3
第二章 ミオグロビン変異体によるカタラーゼ反応の分子機構の解明	26
第三章 ミオグロビン変異体を用いた軸配位子に対する水素結合の役割の解明	50
第四章 α -メチルベンジルアミンを用いたミオグロビン変異体によるチオアニソール不斉酸化反応の機構解明	72
第五章 まとめ	90
謝辞	94
発表論文	95

第一章

序論

生体反応では、タンパク質は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。活性中心にヘム（プロトポルフィリン IX）と呼ばれる補欠分子族を持つヘムタンパク質も活性中心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、O₂ 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¹²。その中でもヘムタンパク質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。

ヘムタンパク質を用いて、我々が希望する性質や反応活性を賦与する研究が精力的に進められている。例えば、ヘムタンパク質の反応制御のために、大きく分けて 4 つのアプローチが取られている³。それは、(1) 合理的なデザインをタンパク質自身に行う方法⁴⁻¹⁶、(2) タンパク質にランダムに変異が挿入されるような実験系内の条件下で大腸菌を培養することで指向進化させる方法¹⁷⁻²⁵、(3) キメラタンパク質や複合タンパク質を作る方法²⁶⁻³¹、(4) ヘムを化学修飾する方法である³²⁻³⁵。(2) や (3) の方法では、反応を触媒している活性中心以外の部位に変異が起こりやすく、タンパク質の不安定な構造が多く見られ、また、高い活性を示すタンパク質のスクリーニングに多大な時間と労力が必要であるという問題がある。一方、(4) の方法では補欠分子族を修飾するために多段階の有機合成を行わなくてはならないという欠点がある。それに対し、(1) の方法ではタンパク質環境を部位特異的アミノ酸置換により変化させ、活性中心に目的とする機能を自由に付加できる潜在的な可能性を秘めている。従って、方法 (1) は、ヘムタンパク質の酸化反応機構の解明やそれに基づいた人工酵素の構築を行うためには優れた方法だと考えられる。この手法を用いた例として、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) に対し、本来の酵素機能である一電子酸化酵素から二電子酸化酵素へと機能変換を試みた研究がある³⁶。HRP (図 1-1A) のヘム遠位側に存在する 41 位の Phe を Leu と Thr に置換した変異体 Phe41Leu HRP (F41L HRP) (図 1-1B) と Phe41Thr HRP (F41T HRP) (図 1-1C) では、2,2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (ABTS) やグアイアコールの一電子酸化反応で、HRP とその変異体の V_{\max} にほとんど差が見られなかった。しかし、4 種類のアルキルフェニルスルフィドのスルホキシ化では 2.3~18.3 倍の V_{\max} の向上が見られ、特に F41L HRP はメチルフェニルスルフィドを 97% ee(S) という高いエナンチオ選択性で酸化することが見出された。この成功から、ヘム環境を自在に変えることにより様々な酵素機能賦与の可能

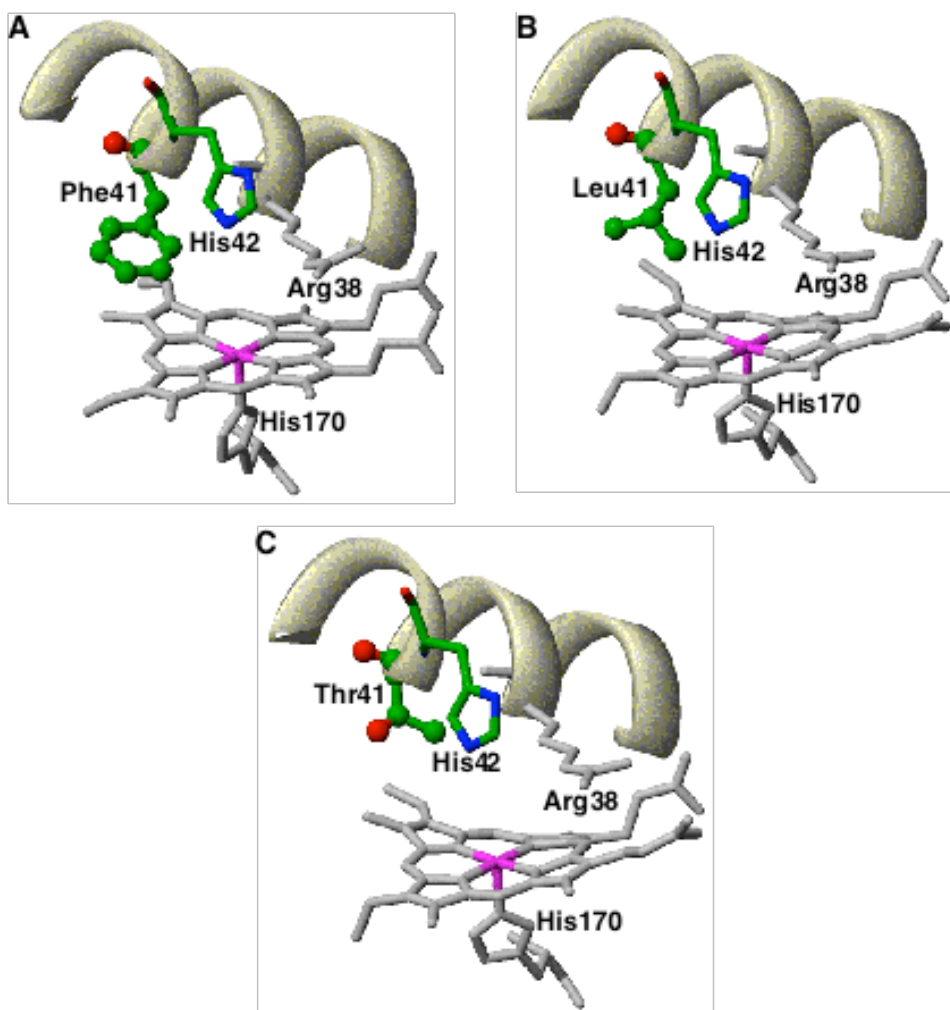


図 1-1. HRP の結晶構造 (A)と F41L HRP (B), F41T HRP (C)の推定構造。

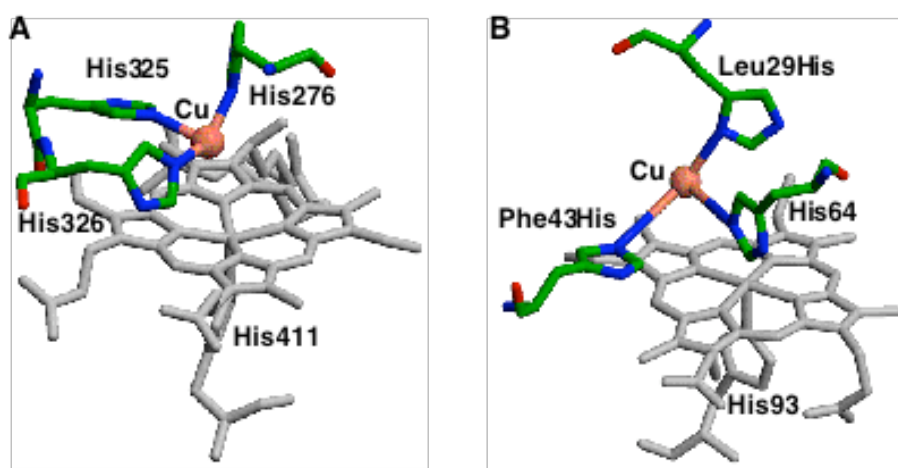


図 1-2. CcO の結晶構造(A)と L29H/F43H Mb の推定構造(B)。

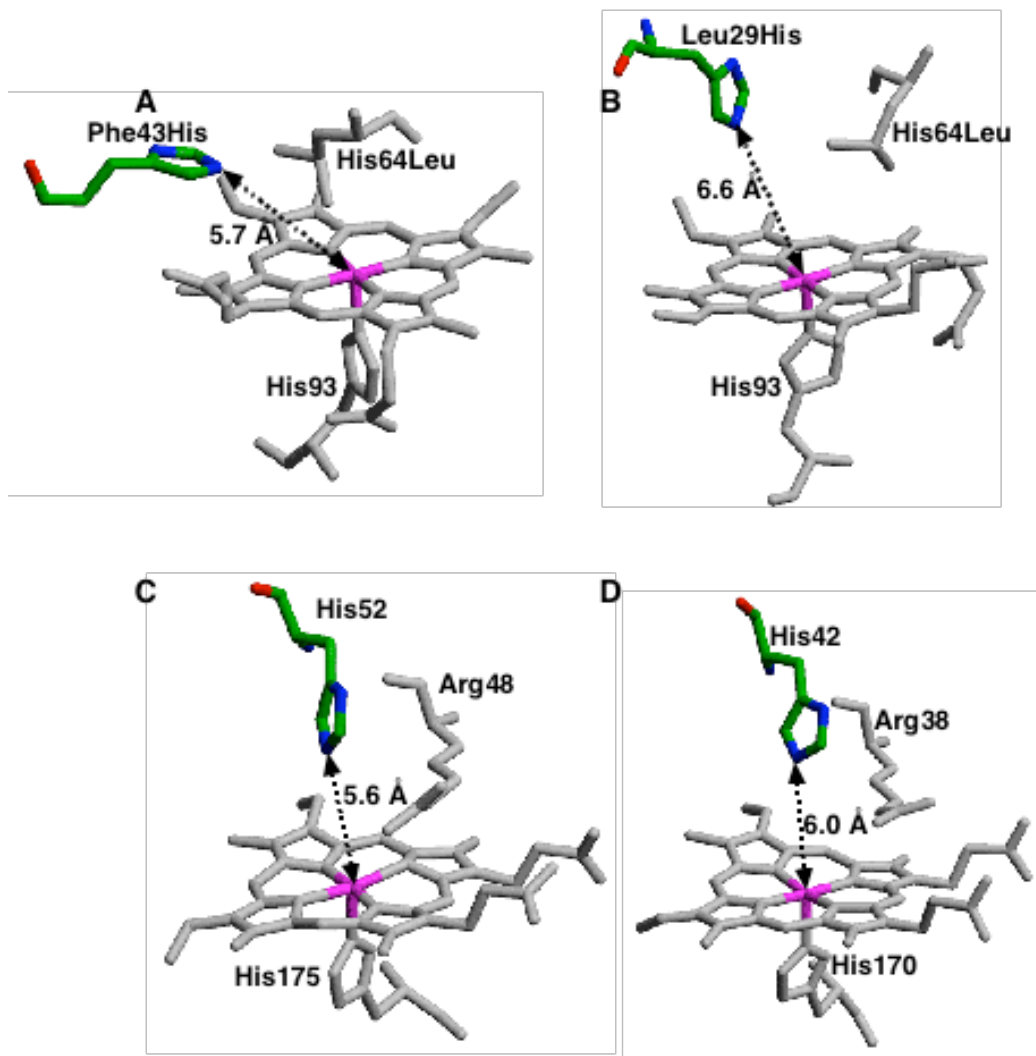


図 1-3. F43H/H64L Mb (A)、L29H/H64L Mb (B)、CcP (C)、HRP (D)の Fe—His 間距離。

性が示唆された。また、新しい反応場をヘム近傍に構築した例として、酸素貯蔵体であるミオグロビン (Mb) を用い、シトクロム *c* オキシダーゼ (CcO) (図 1-2A) のヘム-銅中心を構築した例がある¹³。CcO ではヘムの遠位側に存在する 3 個の His が銅と結合していることから、Mb に存在する His64 以外に Leu29 と Phe43 を His に置換した Leu29His/Phe43His Mb (L29H/F43H Mb) (図 1-2B) は、銅イオンと結合することによって、野生型の Mb に比べ酸素とシアンに対する親和性が向上した。この Mb に対するヘム-銅中心の導入は、CcO の Cu の役割を検証する構造および機能モデルとして有効であると考えられる。また、ペルオキシダーゼの機能モデルとして設計された Phe43His/His64Leu Mb (F43H/H64L Mb) (図 1-3A)、Leu29His/His64Leu Mb (L29H/H64L Mb) (図 1-3B) の例もあ

る^{9,37,38}。これらの Mb 変異体は、シトクロム *c* ペルオキシダーゼ (CcP) (図 1-3C) と HRP (図 1-3D) の活性中心の Fe–His 間の距離がそれぞれ 5.6 Å³⁹と 6.0 Å⁴⁰ であることに注目し、His がこの距離と近くなるようにアミノ酸置換を行ったものである。実際、F43H/H64L Mb および L29H/H64L Mb では結晶構造から Fe–His が 5.7 Å と 6.6 Å となり、それぞれ CcP、HRP の距離と近い値が得られている。また、*m*-クロロ過安息香酸 (*m*CPBA) とこれらの変異体の反応では、酸化活性種である鉄(IV) オキシ π -カチオンラジカル (compound I と呼ばれ、以下 cpd I と略記) を生成し、特に F43H/H64L Mb は過酸化水素と反応することで ABTS やグアイアコールの酸化、スルホキシ化、エポキシ化などを高い効率で触媒することがわかった^{9,41}。より高難度な酸化反応を触媒する例としては、シトクロム P450cam (P450cam) があり、活性中心近傍に存在する Tyr96 との水素結合によって基質である *d*-カンファーが固定され、選択的な基質挿入が達成されている。基質をへム近傍に取り込むという P450cam の活性中心 (図 1-4A) を参考に設計された Phe43Trp/His64Leu Mb (F43W/H64L Mb) (図 1-4B) 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も成功している^{7,42}。従って、多くの酸化反応を触媒する Mb 変異体を用いて、へ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。

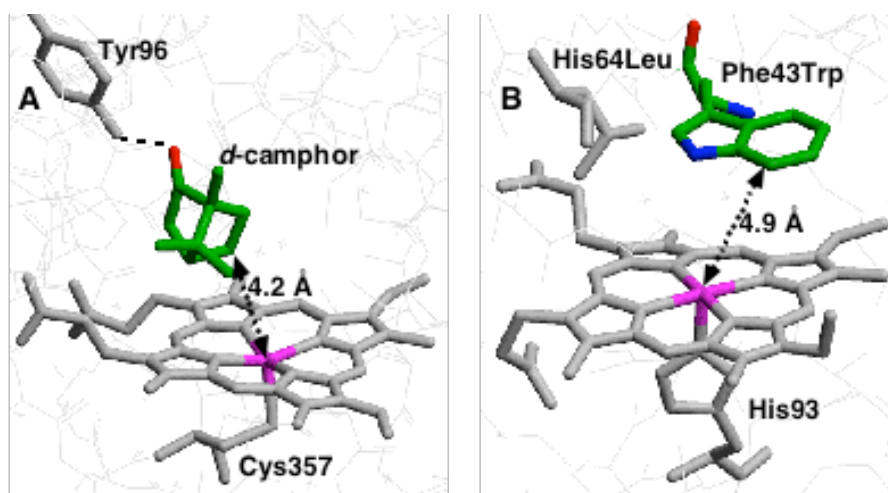
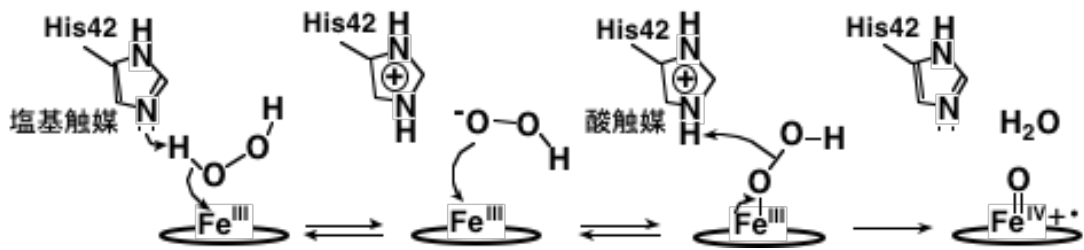
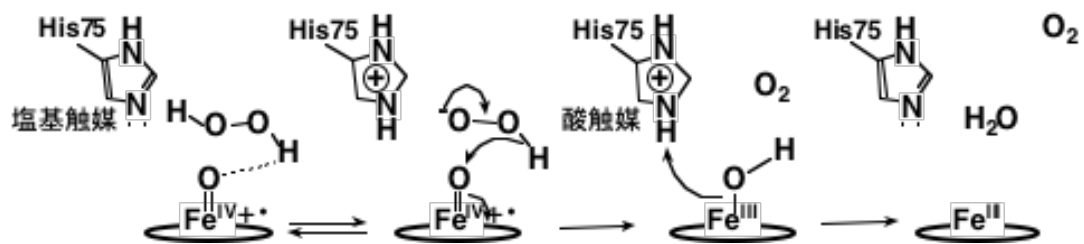


図 1-4. P450cam の結晶構造 (A) と F43W/H64L Mb (B) の推定構造。

そこで本研究では、Mb の変異体の反応素過程を調べることによって、酸化反応メカニズムの基礎的理解とへムタンパク質の機能変換の設計指針の確立を目指した。これまでの研究から、へム酵素が酸化反応をおこなう上で、いくつ



スキーム 1-1. HRP の cpd I 生成の推定機構。



スキーム 1-2. カタラーゼの cpd I と過酸化水素の反応の推定機構。

かの重要なポイントがあげられる。最初に、ヘムタンパク質が酸化反応を行うために、酸化活性種である cpd I を効率的に生成する必要がある。スキーム 1-1 に HRP における過酸化水素とヘムの反応によって cpd I が生成する反応機構を示すが、反応の第一段階は遠位側の His (His42) による過酸化水素のプロトンの引き抜きであり、ヒドロペロオキシアニオン (HOO⁻) の生成による過酸化水素の活性化のために、His が一般酸塩基触媒として存在している。HRP における cpd I の生成反応の速度論的重水素同位体効果が $k_H/k_D = 1.6$ と小さな値を示すことから⁴³、一般酸塩基触媒が cpd I 生成で重要な役割を果たしていることがわかる。同様にカタラーゼでも His をヘム近傍に配置しており (人由来カタラーゼでは 75 位⁴⁴) (図 1-5)、この His75 が一般酸塩基触媒として働き cpd I が生成し、引き続き His75 が再度、過酸化水素からプロトンを引き抜き、不安定化したヒドロペロオキシアニオンが cpd I によって酸化され、

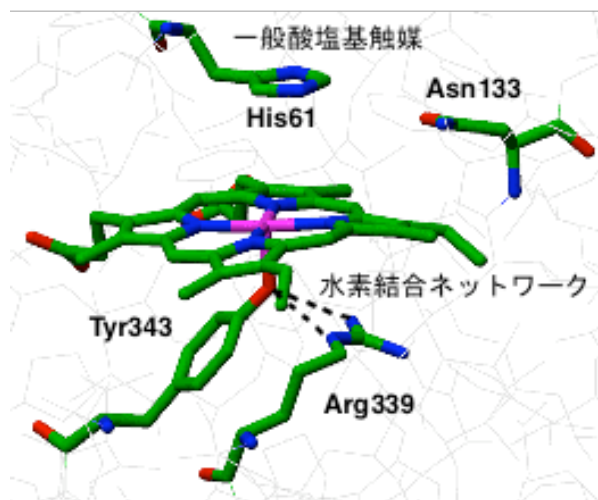


図 1-5. カタラーゼの活性中心構造。

酸素と水を生成すると考えられる (スキーム 1-2)⁴⁴。しかし、ヘム遠位側に His を持たない His64Asp Mb (H64D Mb) でも、cpd I を生成するという報告があり¹⁰、さらに 64 位の His を Asp や Ala、Ser などに変えた Mb 変異体で形成した cpd I でも直接過酸化水素と反応し、休止状態に戻るといことが知られている^{10,45}。こうした変異体における cpd I の生成機構を検討することによって、実際の酵素系における、一般酸塩基触媒の役割を深く理解することが可能と考えられる。また、カタラーゼの反応において、一般酸塩基触媒が過酸化水素のプロトンを引き抜き、cpd I の生成および cpd I による過酸化水素の分解反応を促進するという本来の反応機構とは異なるプロセスも存在すると考えられるが、その詳細についてはわかっていない。

ヘム酵素は、基質の酸化を円滑に進行させるために cpd I の反応制御を行っていると考えられる。例えば、カタラーゼの場合、軸配位子の Tyr と Arg の間に水素結合 (図 1-5) が存在する⁴⁶。カタラーゼでは休止状態だけでなく、反応中間体である cpd I や compound II (cpd II (Fe^{IV}=O Por)) でも結晶構造解析が行われ⁴⁶⁻⁴⁸、ヘムの Fe と結合する Tyr の酸素と Arg の窒素との距離が、2.1 Å (休止状態)、1.8 Å (cpd I)、2.8 Å (cpd II) と鉄の酸化状態により変化することがわかる。このことから、軸配位子に対する水素結合ネットワークが、各反応ステップでフレキシブルに動くことにより、Fe に対する Tyr の酸素からの電子的効果が変化し、反応性を調節していると考えられるが、それを実験的に確かめた例はない。

上記に加えて、酵素が特異的な反応を行うためには、基質の取込みおよび配向までを考えた固定が重要である^{14,49}。水酸化反応を行う代表的な酵素である P450cam では、基質である *d*-カンファアの配向を制御するために Tyr96 が水素結合を形成し、Val247 と Val295 が疎水性相互作用している。こうして基質を固定することによって、部位特異的に反応を行い 5-*exo*-ヒドロキシカンファアを生成する (図 1-6)⁴⁹。Tyr96 を Phe に置換した変異体では、野生型の

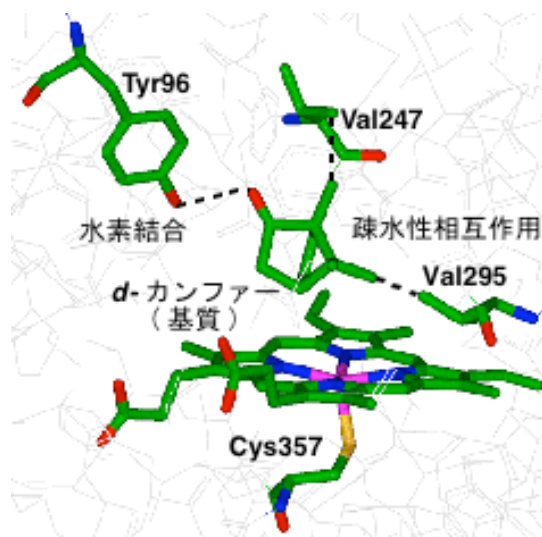


図 1-6. P450cam の活性中心構造。

5-*exo*-異性体の収率を1とすると0.92に減少することが報告されている⁵⁰。また、Val295をより側鎖の長い疎水性アミノ酸であるIleに置換すると野生型で総生成物の82%の5-*exo*-異性体が生成するのに対し、その選択性が90%に上昇し、Val247とVal295の両方をAlaに変えた変異体では逆に73%へと減少することが知られている⁵¹。このように、P450camでは基質を固定化して、部位特異的な酸化反応を触媒していることが理解できる。以上のことから、本論文ではヘム酵素による酸化反応の基礎的理解に(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)基質の結合様式が重要であると考え(図1-7)研究を行った。以下、これら3つのポイントについて詳細に述べて行く。

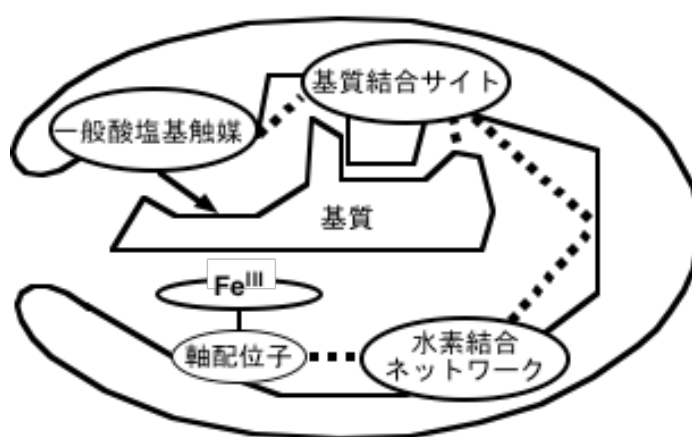
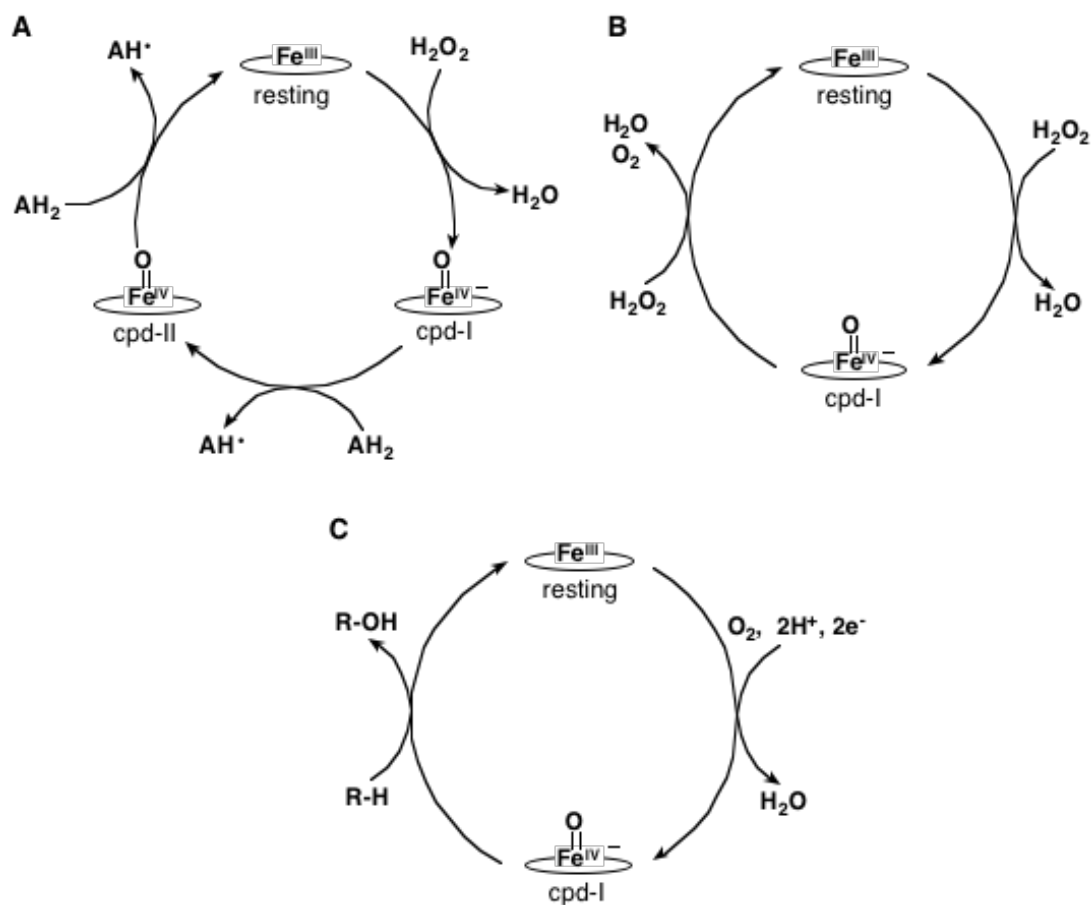


図 1-7. ヘム蛋白質活性中心のイメージ図。

一般酸塩基触媒によるヘム酵素の酸化活性制御

ヘム酵素による酸化反応サイクル(スキーム 1-3)では、過酸化水素のような酸化剤や酸素分子と電子を効率良く反応させて cpd I を生成させる必要がある。Poulos と Kraut は CcP の結晶構造から、ヘム近傍に存在する His52 が過酸化水素のプロトン受容体として働くと提唱し⁵²、Erman らによる His52 を Leu に置換した変異体の研究から、cpd I 生成速度が 4.5×10^7 から $236 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ まで減少することが知られている⁵³。クロロペルオキシダーゼ(CPO)の場合、結晶



スキーム 1-3. ヘム酵素の酸化反応サイクル。ペルオキシダーゼ(A)。カタラーゼ(B)。P450(C)。

構造 (図 1-8) から Glu183 がプロトンの授受を通して、近傍の His105 と共同的に一般酸塩基触媒として働き、cpd I が生成すると考えられている⁵⁴。すなわち、ヘム近傍に存在する His と Glu が一般酸塩基触媒として働くことにより、過酸化水素をヒドロペロオキシアニオンとし、鉄への配位を容易にしていると考えられる。ヘム近傍の一般酸塩基触媒を取り除いた HRP の変異体 (His42Ala, His42Val) や Mb の遠位側の His64 を取り除いた変異体では、cpd I は生成するものの、その速度は非常

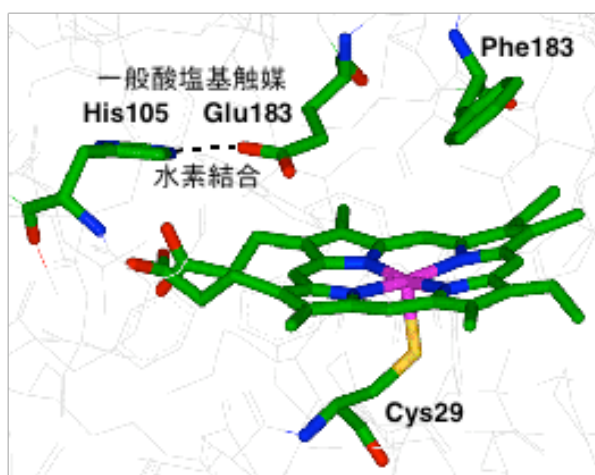
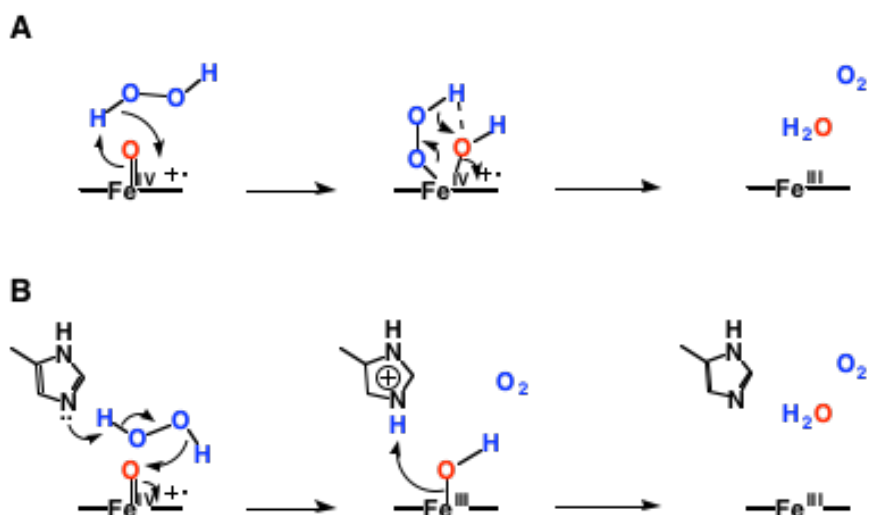


図 1-8. CPO の活性中心構造。

に遅い。そして、Mbの変異体による cpd I の生成には、ヘム鉄(III)近傍が H_2O_2 に対して高い親和性を有することが必要だと考えられている¹⁰。

次に、スキーム 1-3 に示すように cpd I は一電子酸化反応、二電子酸化反応および水酸化反応を行う。その中でもカタラーゼの行う二電子酸化反応である過酸化水素の水と酸素への分解反応は、カタラーゼ以外では CPO⁵⁵やカタラーゼ-ペルオキシダーゼ (KatG)⁵⁶などで報告されているが、その反応性はカタラーゼに比べ非常に低い。この cpd I と過酸化水素の反応は、モデル錯体による研究から推定された機構 (スキーム 1-4A)⁵⁷と結晶構造の考察から提唱された反応機構 (スキーム 1-4B)^{44,58}がある。しかし、スキーム 1-4A の反応機構については、CPK モデルで表示されたカタラーゼの cpd I の結晶構造に示されるように (図 1-9)、cpd I の鉄原子に配位する酸素原子がほぼ鉄原子上部の空間をおおっているために、脱プロトン化した過酸化水素が直接鉄に配位できる空間的な余裕は存在しない。また、HRP の cpd I の反応では、一般酸塩基触媒は水分子を介して、基質からプロトンの引き抜きを行い、生成した基質のアニオンから cpd I への電子移動により一電子酸化が進行していると考えられている (図 1-10)⁵⁹。



スキーム 1-4. Cpd I と過酸化水素の反応の推定メカニズム。錯体モデル(A)、結晶モデル(B)。

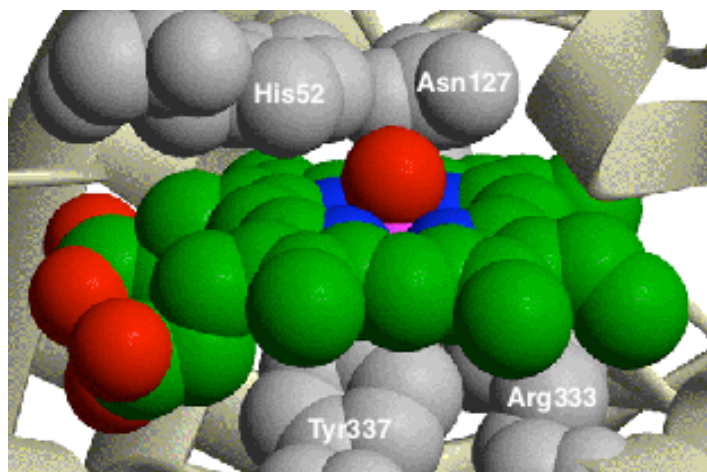


図 1-9. CPK モデルで表示されたカタラーゼの cpd I。

一方、Mb のヘム近傍に存在し、一般酸塩基触媒として作用可能な遠位側の His (His64) を取り除いた変異体、および HRP、CcP モデルとして作成した変異体においてもカタラーゼ活性が報告されている⁹。これらの変異体では *m*CPBA と反応させることにより cpd I を生成させ、その後 cpd I と過酸化水素の反応は、吸収スペクトル変化あるいは酸素分子の発生から直接観測することが可能である⁶⁰。そこで、Mb の変異体で図 1-11 に示すように一般酸塩基触媒を持つ変異体、持たない変異体を用い、この反応の活性中心環境の影響による反応素過程の違いを速度論的に解析することにより、cpd I と過酸化水素との反応で過酸化水素の水素原子引き抜き機構を検証することにした。

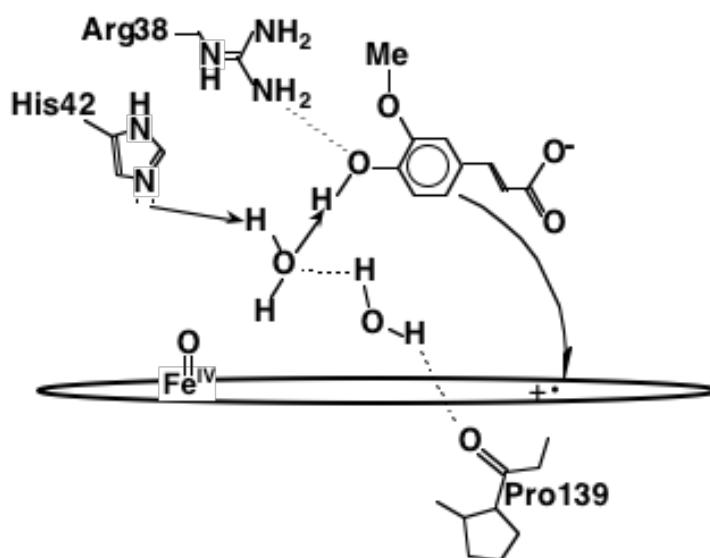


図 1-10. HRP の cpd I と基質の反応における推定構造。

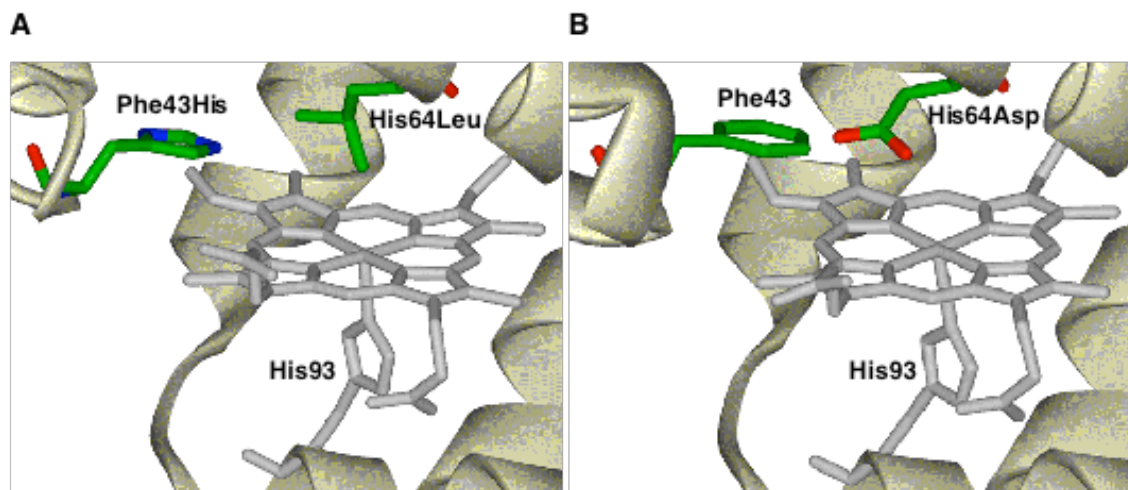


図 1-11. Mb によるペルオキシダーゼ,カタラーゼモデル。一般酸塩基触媒を持つモデル (Mb F43H/H64L) (A)。一般酸塩基触媒を持たないモデル (Mb H64D) (B)。

水素結合の役割

多くの金属タンパク質では、金属イオンに配位している原子への水素結合が反応制御で重要な役割を果たしていると考えられている。ヘム酵素も例外ではなく、図 1-12 に示すように HRP⁴⁰、カタラーゼ⁶¹、P450cam⁶²などにも同様の水素結合が存在するが、その機能については良くわかっていない。特に興味深い点は、カタラーゼの結晶構造から明らかのように、一般酸塩基触媒として働く His61 から軸配位子の Tyr343 まで水素結合ネットワークが形成されている点である (図 1-13)。さらに、休止状態⁶³、と cpd I⁴⁸ではその水素結合の距離が異なっている (図 1-14)。P450cam の結晶構造からも、5 配位と CO 体の 6 配位では軸配位子を形成している Cys の硫黄原子の水素結合の距離が変化していることがわかる (図 1-15)⁶⁴。これらの違いは、触媒サイクルの各ステップで水素結合を通してヘム鉄の反応性が制御されていることを示唆している。しかし、このような反応機構に対する水素結合の効果を検証するのは難しい。

今まで行われた研究の例として、P450cam の軸配位子と水素結合を形成している Leu358 を Pro に置換することにより 3 つ存在する水素結合の 1 つを欠損させたものがあるが、シクロヘキササンやシクロヘキセン、スチレンを酸化させた結果、反応速度は上昇したものの副反応で生成する過酸化水素の量が野生型

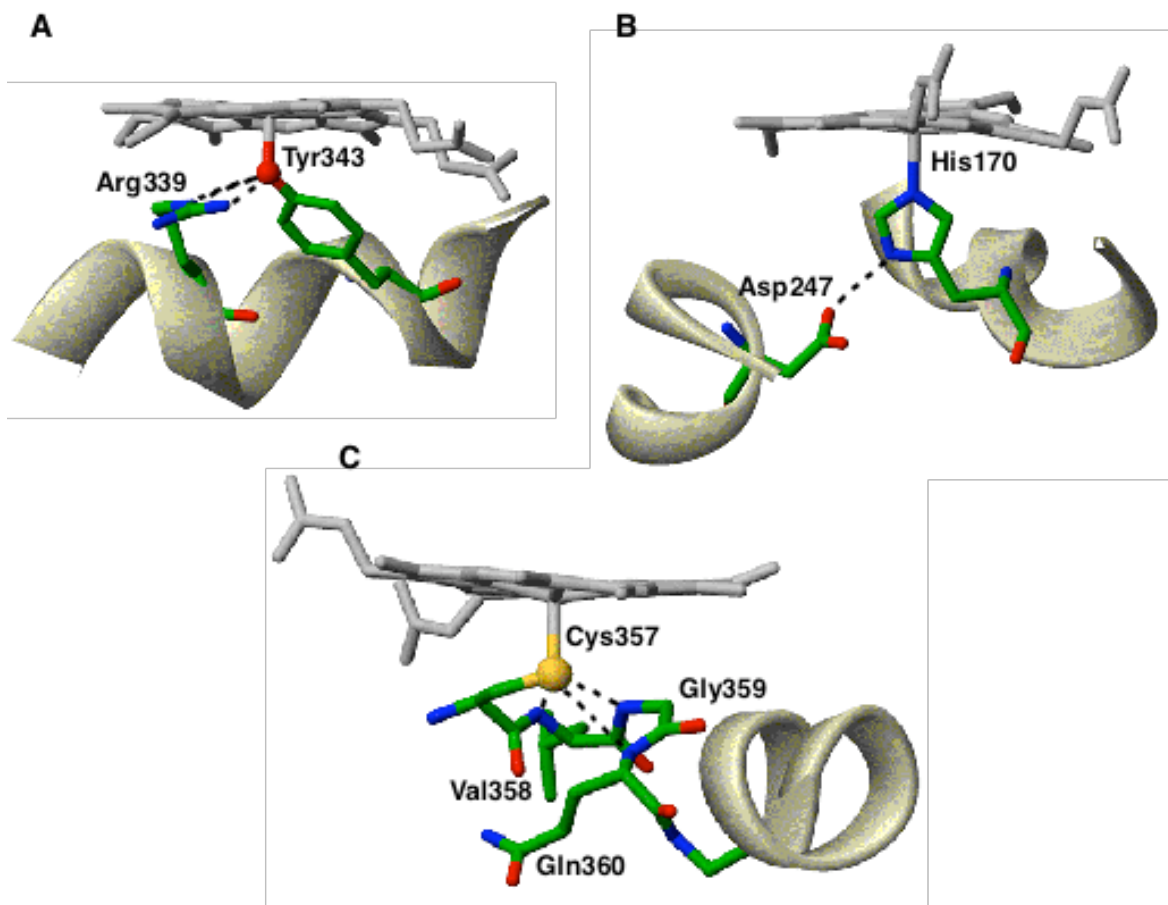


図 1-12. ヘム蛋白質の軸配位子に対する水素結合。カタラーゼ (A)。HRP (B)。P450cam (C)。

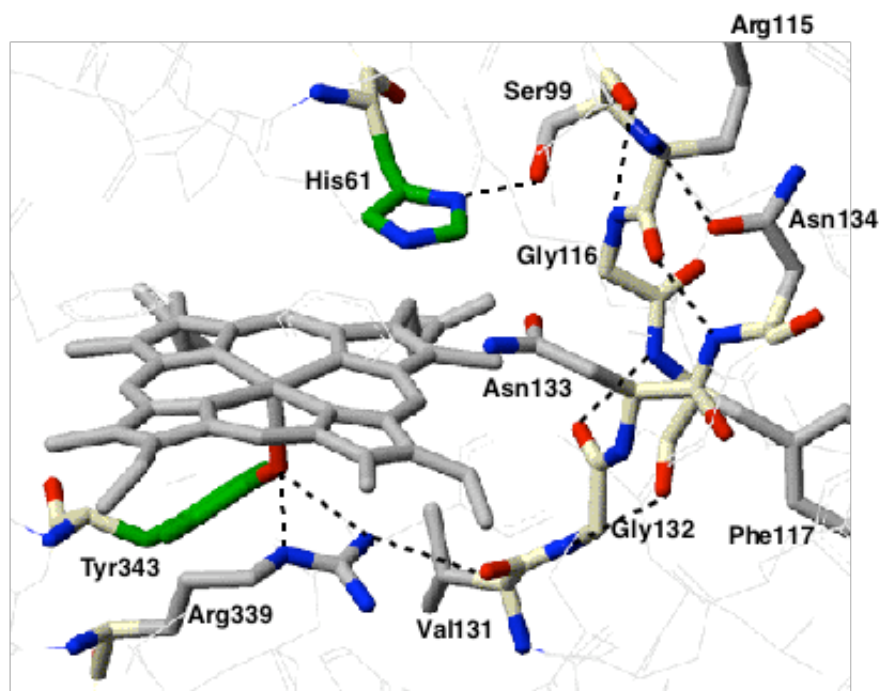


図 1-13. カタラーゼの遠位側と近位側を結ぶ水素結合ネットワーク。

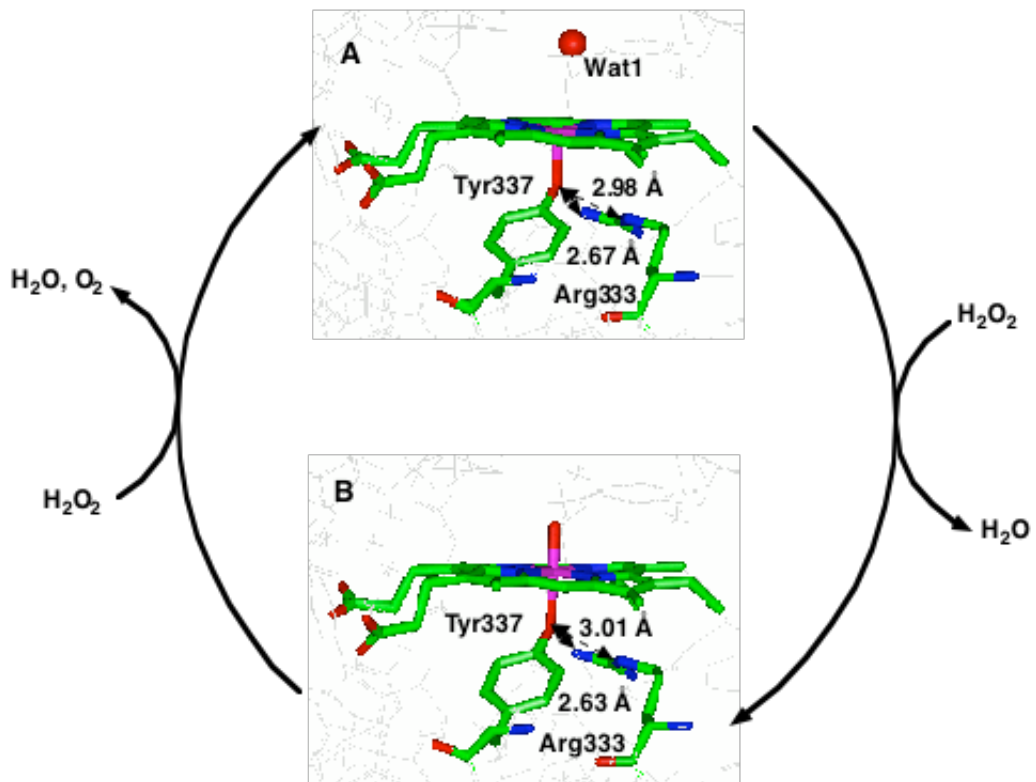


図 1-14. カタラーゼの休止状態 (A)、cpd-I (B) における軸配位子に対する水素結合とその距離。

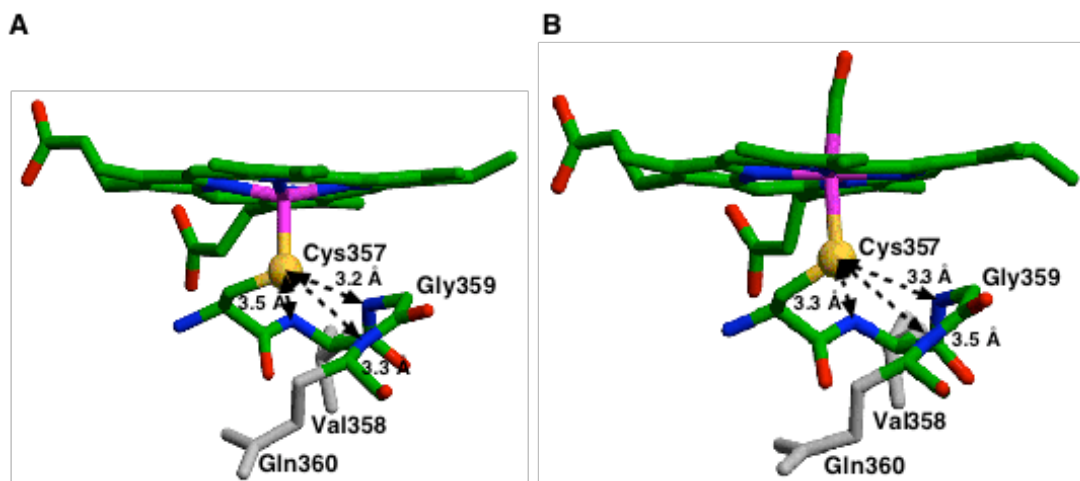


図 1-15. P450cam の休止状態(A)および CO 体(B)のヘム近位側構造と水素結合距離。

に比べ、約 60%程度減少した⁶⁵。また、モデル錯体を用い軸配位子に対する水素結合の数を変化させた研究がある。P450 のモデル錯体である(プロピネート)(チオレート)鉄(III)錯体の場合、鉄に配位している硫黄原子に対し、NH...S 水素結合のない錯体と 2 つの水素結合を導入した錯体を比較すると、Fe-S の距離は 2.299 Å が 2.356 Å と 0.057 Å 伸び、Fe(III)□ Fe(II)間の酸化還元電位は-0.68 が-0.35 に変化した⁶⁶。同様にフェノレート配位子を持つ錯体の場合、鉄に配位している酸素に対し NH...O 水素結合の有無で Fe-O の距離にはほとんど優位な差は見られなかったが、Fe(III)□ Fe(II)間の酸化還元電位は-0.63 が-0.49 に変化した⁶⁷。こうした結果は、軸配位子に対する水素結合がヘムの鉄に対して作用し、電子状態を変化させている事を示すものである。しかし、今までのような部位特異的アミノ酸置換による研究では、得られる情報が水素結合を行なうアミノ酸残基の有無による水素結合の重要性の理解に限定され、モデル錯体では

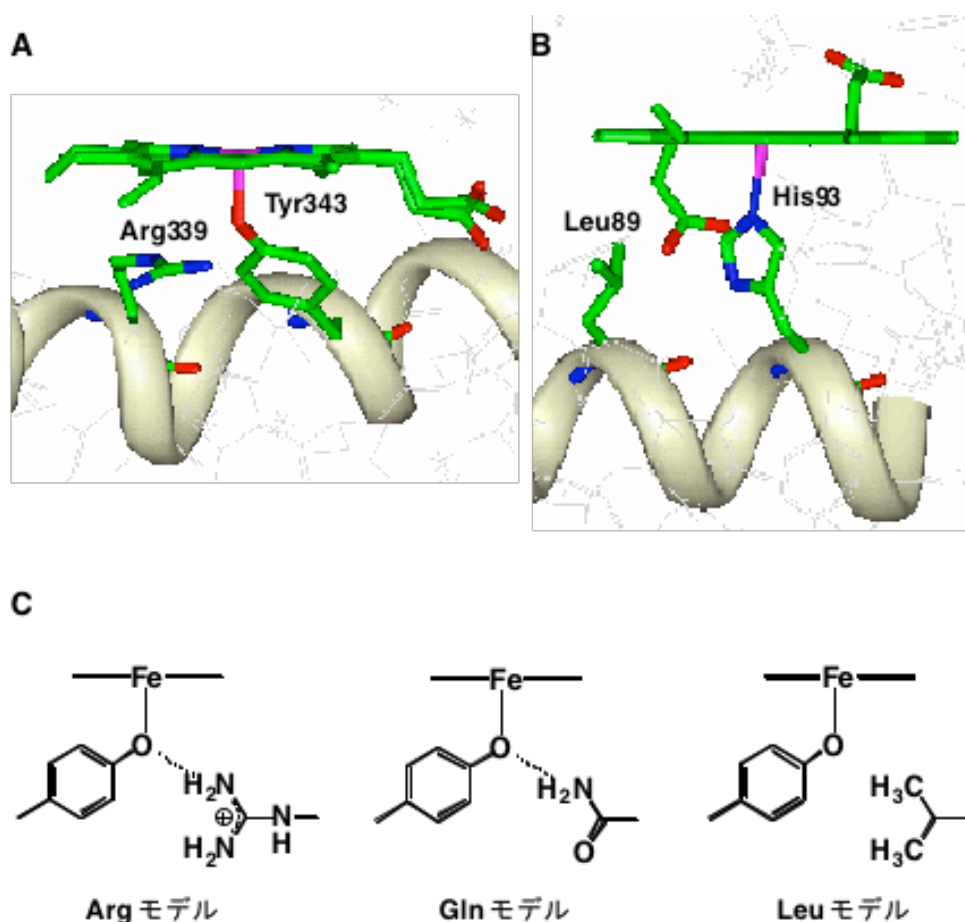


図 1-16. カタラーゼの近位側構造 (A)、Mb の近位側構造 (B) 及び 3 つの Mb デザイン (C)。

軸配位子に対する水素結合の強さを容易に調節することができるが、構造がかたく固定されてしまうため、反応のどの段階で水素結合が重要な役割を果たしているのかわからない。

一方、Mb の変異体では軸配位子に対し水素結合を形成するアミノ酸残基を選ぶことが可能であり、軸配位子に対する水素結合の効果を反応素過程の直接観測で解明できる可能性がある。そこで、カタラーゼと Mb の軸配位子がどちらも α -ヘリックス上に存在することから (図 1-16A, B)^{61,68}、Mb の軸配位子を Tyr に置換し、カタラーゼの軸配位子と水素結合している Arg と同様の位置に存在する Leu を Arg や Gln と置換し (図 1-16C)、軸配位子に対する水素結合の様式を変え、過酸に対する反応性を解析することにより、反応サイクル中における水素結合の効果を検証することにした。

基質の固定化及び配向制御

基質の固定および配向の制御は、酵素反応の最大の特徴である基質特異性のために非常に重要である。例えば P450cam の基質複合体の結晶構造を検討すると、水素結合や疎水性相互作用などの分子間相互作用によってヘム近傍に基質がしっかりと固定されることにより、不斉選択的水酸化反応を行うことが理解できる (図 1-6)⁴⁹。また、高い不斉選択的スルホキシ化を行う CPO は、立体障害と分子間相互作用で R/S 選択性を決定していると考えられる⁵⁴。

選択性の賦与は HRP や Mb に変異を加えることでも可能である。表 1-1 に示したように、天然の HRP によるチオアニソールの不斉スルホキシ化では、77% ee(S)であるが、アミノ酸置換を行った変異体である F41L HRP は、97% ee(S) という高いエナンチオ選択性を与え、逆に F41T HRP では 10% ee(S)とエナンチオ選択性は大きく減少した³⁶。Mb の場合、野生型 Mb では 25% ee(R)であったエナンチオ選択性が、L29H/H64L Mb では 97% ee(R)と上昇が見られた³⁷。何よりも注目すべき点は、エナンチオ選択性が H64D Mb では 6% ee(R)と低いものの、野生型 Mb の 580 倍の速度で反応を進行させることが可能であり、さらに変異を加えた H64D/V68A Mb では、反応速度をほぼ維持したままエナンチオ選択性を 84% ee(R)まで上昇させることに成功している点である⁶⁹。このようにアミノ酸置換を行うことで、エナンチオ選択性及び反応性の制御が人工的にできるこ

とがわかる。

一方、Mb の変異体による様々な基質の不斉選択的スルホキシ化の系統的検討から、エナンチオ選択性は活性中心での基質の立体障害により決まると提唱された⁴¹。しかし、反応サイクルのどの段階で、エナンチオ選択性が制御されるのかは不明であり、いまだ詳細な反応機構を理解したデザインには至っていない。そこで、不斉認識機構を明らかにするために、メチルフェニルスルホキシドと似た構造を持つ α -メチルベンジルアミンを遷移状態モデル (図 1-17) として用いることにした。速度論的解析を行ない、アミンのヘム鉄への結合速度と解離速度の違いから、解離段階と結合段階のどちらのプロセスで不斉認識が行われているか理解できると考えられる。そこで、H64D/V68A および H64D/V68S Mb を用い速度論的解析により不斉認識機構を明らかにすることにした⁷⁰。

表 1-1. ペルオキシダーゼと Mb によるチオアニソールの酸化反応。

Protein	rate (turnover/min)	%ee
native CPO	1050 ^a	98(<i>R</i>)
native HRP	3.38 ^b	77(<i>S</i>)
F41L HRP	10.00 ^b	97(<i>S</i>)
F41T HRP	6.64 ^b	10(<i>S</i>)
SW wild type Mb	0.25 ^a	25(<i>R</i>)
SW L29H/H64L Mb	5.5 ^a	97(<i>R</i>)
SW F43H/H64L Mb	47 ^a	85(<i>R</i>)
SW H64D Mb	145 ^a	6(<i>R</i>)
SW H64D/V68A Mb	121 ^a	84(<i>R</i>)
SW H64D/V68S Mb	64 ^a	88(<i>R</i>)
SW H64D/V68L Mb	261 ^a	3(<i>R</i>)
SW H64D/V68I Mb	413 ^a	25(<i>S</i>)
SW H64D/V68F Mb	48 ^a	46(<i>R</i>)

a: turnover number と反応時間から計算した。

b: チオアニソール 5 mM における K_m , V_{max} から計算した。

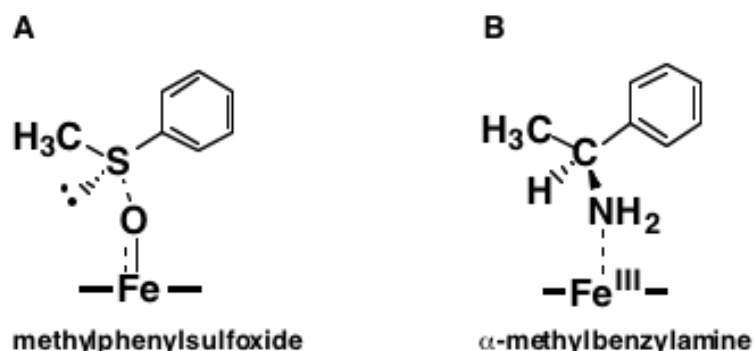


図 1-17. チオアニソールの酸化反応の遷移状態 (A) とそのモデル (B)。

論文の構成

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、二章では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、さらにカタラーゼを用い、活性中心環境の影響を調べるために ^2H 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ものは $k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$ が 2.1 という小さな値を示し、持たないものは $k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$ が 10 以上の大きな値を示し、トンネル効果によるものだと示したことから、それぞれイオニックな反応とラジカル的な反応の 2 種類の反応機構が存在する事が確認された。

三章 カタラーゼでは、Fe 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。この水素結合とカタラーゼ活性の関係は未だ不明である。そこで、三章では軸配位子への水素結合の影響を検討するために、Mb の軸配位子の 93 位 His を Tyr に変え、水素結合を導入していない変異体、水素結合を導入した変異体を作成し、ラマン分光により水素結合の強さを測定し、酸素発生、ストップフロー法を用い ABTS の酸化および *m*CPBA との反応によるスペクトル変化の測定を行った。その結果、水素結合の有無に

より酸素発生および *m*CPBA との反応で違いが見られ、基質の結合および cpd I の活性化の段階で軸配位子に水素結合が作用していることが確認された。

四章 エナンチオ選択性は立体障害による配向の制御によって達成されることが考えられるが、反応サイクルのどの段階で制御されるのか不明であり、詳細な反応機構の理解はされていない。そこで、四章では H64D/V68A および H64D/V68S Mb を用い、チオアニソールの酸化反応の遷移状態モデルとして π -メチルベンジルアミンを用い、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を行った。その結果、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、基質の解離段階で不斉認識が行われていることを明らかにした。

- (1) In *Handbook of Metalloproteins*; Messerschmidt, A., Huber, R., Poulos, T., Wieghardt, K., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd, 2001.
- (2) Chan, M. K. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 216-222.
- (3) Watanabe, Y. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 208-216.
- (4) Celik, A.; Cullis, P. M.; Sutcliffe, M. J.; Sangar, R.; Raven, E. L. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 78-85.
- (5) Crane, B. R.; Arvai, A. S.; Gachhui, R.; Wu, C. Q.; Ghosh, D. K.; Getzoff, E. D.; Stuehr, D. J.; Tainer, J. A. *Science* **1997**, *278*, 425-431.
- (6) England, P. A.; Harford-Cross, C. F.; Stevenson, J. A.; Rouch, D. A.; Wong, L. L. *FEBS Lett.* **1998**, *424*, 271-274.
- (7) Hara, I.; Ueno, T.; Ozaki, S.; Itoh, S.; Lee, K.; Ueyama, N.; Watanabe, Y. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 36067-36070.
- (8) Hirst, J.; Goodin, D. B. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 8582-8591.
- (9) Matsui, T.; Ozaki, S.; Liong, E.; Phillips, G. N.; Watanabe, Y. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 2838-2844.
- (10) Matsui, T.; Ozaki, S.; Watanabe, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9952-9957.
- (11) Ozaki, S. I.; Roach, M. P.; Matsui, T.; Watanabe, Y. *Accounts Chem. Res.* **2001**, *34*, 818-825.
- (12) Savenkova, M. I.; Kuo, J. M.; de Montellano, P. R. O. *Biochemistry* **1998**, *37*, 10828-10836.
- (13) Sigman, J. A.; Kwok, B. C.; Lu, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8192-8196.
- (14) Smith, A. T.; Veitch, N. C. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 269-278.
- (15) Stevenson, J. A.; Westlake, A. C. G.; Whittock, C.; Wong, L. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12846-12847.
- (16) Wilcox, S. K.; Putnam, C. D.; Sastry, M.; Blankenship, J.; Chazin, W. J.; McRee, D. E.; Goodin, D. B. *Biochemistry* **1998**, *37*, 16853-16862.
- (17) Arnold, F. H.; Volkov, A. A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 54-59.
- (18) Cherry, J. R.; Lamsa, M. H.; Schneider, P.; Vind, J.; Svendsen, A.; Jones, A.; Pedersen, A. H. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 379-384.
- (19) Iffland, A.; Tafelmeyer, P.; Saudan, C.; Johnsson, K. *Biochemistry* **2000**, *39*, 10790-10798.
- (20) Iffland, A.; Gendreizig, S.; Tafelmeyer, P.; Johnsson, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *286*, 126-132.

- (21) Joo, H.; Arisawa, A.; Lin, Z. L.; Arnold, F. H. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 699-706.
- (22) Joo, H.; Lin, Z. L.; Arnold, F. H. *Nature* **1999**, *399*, 670-673.
- (23) Li, Q. S.; Schwaneberg, U.; Fischer, P.; Schmid, R. D. *Chem.-Eur. J.* **2000**, *6*, 1531-1536.
- (24) Rai, G. P.; Zong, Q.; Hager, L. P. *Isr. J. Chem.* **2000**, *40*, 63-70.
- (25) Rai, G. P.; Sakai, S.; Florez, A. M.; Mogollon, L.; Hager, L. P. *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 638-645.
- (26) Eaton, W. A. *Nature* **1980**, *284*, 183-185.
- (27) Go, M. *Nature* **1981**, *291*, 90-92.
- (28) Inaba, K.; Ishimori, K.; Morishima, I. *J. Mol. Biol.* **1998**, *283*, 311-327.
- (29) Inaba, K.; Ishimori, K.; Imai, K.; Morishima, I. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 8080-8087.
- (30) Sieber, V.; Martinez, C. A.; Arnold, F. H. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 456-460.
- (31) Wakasugi, K.; Ishimori, K.; Imai, K.; Wada, Y.; Morishima, I. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 18750-18756.
- (32) Hamachi, I.; Tsukiji, S.; Shinkai, S.; Oishi, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5500-5506.
- (33) Hayashi, T.; Hitomi, Y.; Ogoshi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4910-4915.
- (34) Hayashi, T.; Hitomi, Y.; Ando, T.; Mizutani, T.; Hisaeda, Y.; Kitagawa, S.; Ogoshi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7747-7750.
- (35) Ohashi, M.; Koshiyama, T.; Ueno, T.; Yanase, M.; Fujii, H.; Watanabe, Y. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2003**, *42*, 1005-+.
- (36) Ozaki, S.; Demontellano, P. R. O. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7056-7064.
- (37) Ozaki, S.; Matsui, T.; Watanabe, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9784-9785.
- (38) Ozaki, S.; Matsui, T.; Watanabe, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6666-6667.
- (39) Finzel, B. C.; Poulos, T. L.; Kraut, J. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 3027-3036.
- (40) Gajhede, M.; Schuller, D. J.; Henriksen, A.; Smith, A. T.; Poulos, T. L. *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 1032-1038.
- (41) Ozaki, S.; Yang, H. J.; Matsui, T.; Goto, Y.; Watanabe, Y. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 183-192.
- (42) Ozaki, S.; Hara, I.; Matsui, T.; Watanabe, Y. *Biochemistry* **2001**, *40*, 1044-1052.
- (43) Dunford, H. B.; Hewson, W. D.; Steiner, H. *Can. J. Chem.-Rev. Can. Chim.*

1978, 56, 2844-2852.

- (44) Putnam, C. D.; Arvai, A. S.; Bourne, Y.; Tainer, J. A. *J. Mol. Biol.* **2000**, 296, 295-309.
- (45) Matsui, T.; Ozaki, S.; Watanabe, Y. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 32735-32738.
- (46) Murshudov, G. N.; Grebenko, A. I.; Brannigan, J. A.; Antson, A. A.; Barynin, V. V.; Dodson, G. G.; Dauter, Z.; Wilson, K. S.; Melik-Adamyman, W. R. *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* **2002**, 58, 1972-1982.
- (47) Gouet, P.; Jouve, H. M.; Williams, P. A.; Andersson, I.; Andreoletti, P.; Nussaume, L.; Hajdu, J. *Nat. Struct. Biol.* **1996**, 3, 951-956.
- (48) Andreoletti, P.; Sainz, G.; Jaquinod, M.; Gagnon, J.; Jouve, H. M. *Proteins* **2003**, 50, 261-271.
- (49) Montellano, P. R. O. d. *Cytochrome P450 : structure, mechanism, and biochemistry*; Plenum: New York, 1995.
- (50) Atkins, W. M.; Sligar, S. G. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 18842.
- (51) Atkins, W. M.; Sligar, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 2715-2717.
- (52) Poulos, T. L.; Kraut, J. *J. Biol. Chem.* **1980**, 255, 8199-8205.
- (53) Wrman, J. E.; Vitello, L. B.; Miller, M. A.; Shaw, A.; Brown, K. A.; Kraut, J. *Biochemistry* **1993**, 32, 9798-9806.
- (54) Sundaramoorthy, M.; Ternier, J.; Poulos, T. L. *Chem. Biol.* **1998**, 5, 461-473.
- (55) Thomas, J. A.; Morris, D. R.; Hager, L. P. *J. Biol. Chem.* **1970**, 245, 3219.
- (56) Nagy, J. M.; Cass, A. E. G.; Brown, K. A. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 31265-31271.
- (57) Meunier, B. *Biomimetic oxidations catalyzed by transition metal complexes*; Imperial College: London, 2000.
- (58) Fita, I.; Rossmann, M. G. *J. Mol. Biol.* **1985**, 185, 21-37.
- (59) Gajhede, M. *Biochem. Soc. Trans.* **2001**, 29, 91-99.
- (60) Ozaki, S.; Matsui, T.; Roach, M. P.; Watanabe, Y. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 198, 39-59.
- (61) Murshudov, G.; Melik-Adamyman, W.; Grebenko, A.; Barynin, V.; Vagin, A.; Vainshtein, B.; Dauter, Z.; Wilson, K. *FEBS Lett* **1992**, 312, 127-131.
- (62) Schlichting, I.; Berendzen, J.; Chu, K.; Stock, A. M.; Maves, S. A.; Benson, D. E.; Sweet, B. M.; Ringe, D.; Petsko, G. A.; Sligar, S. G. *Science* **2000**, 287, 1615-1622.
- (63) Gouet, P.; Jouve, H. M.; Dideberg, O. *J Mol Biol* **1995**, 249, 933-954.

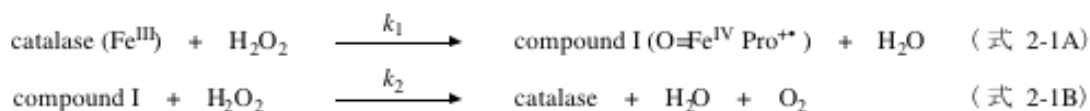
- (64) Raag, R.; Poulos, T. L. *Biochemistry* **1989**, *28*, 7586-7592.
- (65) Yoshioka, S.; Takahashi, S.; Ishimori, K.; Morishima, I. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2000**, *81*, 141-151.
- (66) Ueyama, N.; Nishikawa, N.; Yamada, Y.; Okamura, T.-a.; Nakamura, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12826-12827.
- (67) Ueyama, N.; Nishikawa, N.; Yamada, Y.; Okamura, T.-a.; Nakamura, A. *Inorganica Chimica Acta* **1998**, *283*, 91-97.
- (68) Yang, F.; Jr., G. N. P. *J. Mol. Biol.* **1996**, *256*, 762-274.
- (69) Yang, H.-J. *Doctor of Philosophy* **2000**.
- (70) Kato, S.; Yang, H. J.; Ueno, T.; Ozaki, S.; Phillips, G. N.; Fukuzumi, S.; Watanabe, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8506-8507.

第二章

ミオグロビン変異体によるカタラーゼ反応の分子機構の解明

2.1 序論

カタラーゼは生体内に広く存在し、過酸化水素を水と酸素に分解するヘム酵素である。反応サイクルは休止状態 (Fe^{III}) のヘムが過酸化水素と反応することにより開始され、cpd I ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O Por}^{+}$) と水を生成する (式 2-1A)。さらに、cpd I は過酸化水素と反応することで水と酸素を生成し、休止状態に戻る (カタラーゼ反応) (式 2-1B)^{1,2}。この反応は昔から良く知られているものの、カタラーゼの cpd I と過酸化水素の反応速度 (k_2) は、cpd I の生成速度 (k_1) とほぼ同じであるため、過酸化水素の分解過程を直接観測することが出来ない。そのため、分子機構はまだ明白になっていない。また、カタラーゼの cpd I を定量的に生成させるには、メチルヒドロペルルオキシドや過酢酸などのアルキル過酸を用いる必要があるが、この時生成するメタノール等の生成物はカタラーゼの反応阻害剤であり、カタラーゼ反応を阻害することで cpd I の観測を可能にしている^{1,3,4}。過酸化水素の分解反応を行なう他のヘム酵素として、クロロペルオキシダーゼ (CPO)⁵やカタラーゼ-ペルオキシダーゼ (KatG)⁶などが報告されているが、その反応性はカタラーゼに比べ非常に低く、反応機構の詳細は不明のままである。



一方、ミオグロビン(Mb)は筋肉中で酸素を貯蔵しているタンパク質であるが、ヘムタンパク質の活性中心環境の構造的、機能的モデルとして非常に有用なタンパク質として、多くの研究が行われている⁷⁻¹⁴。最近、ヘムの遠位側に存在する 64 位の His が Mb の cpd I 生成に重要な役割をはたしていることがわかった。実際、64 位の His を他のアミノ酸に置換した変異体で、ラピッドスキャン測定により cpd I が観測されている。より重要なのは、得られた cpd I が過酸化水素やチオエーテル、オレフィン、N-脱メチル化、芳香環の酸化を行ない、その反応素過程が吸収スペクトル変化として直接観測できる点である^{10,11,15,16}。例えば、H64X Mb (X = A, S, D) の cpd I は $10^3 \sim 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ の反応速度で過酸化水素と反応し休止状態にもどる¹¹。

本章では、軽水および重水中で反応素過程の測定が可能な Mb の変異体をカ

タラーゼモデルとして用い、Mb の cpd I (Mb-I) と過酸化水素の反応の速度論解析を行なった。さらに、カタラーゼと Mb 変異体の X 線結晶構造の比較をおこない、分子機構の検討を行った。また、カタラーゼについても軽水および重水中で速度論解析を行ない、Mb のカタラーゼモデルと比較することで cpd I と過酸化水素の反応機構を検証した。

2.2 実験

試薬

標準的な試薬は和光純薬とナカライテスクより購入した。99.9%の重水はケンブリッジ同位体研究所とアルドリッチから入手した。メチルヒドロペルオキシドは Elrod らの報告した方法を修正し合成した¹⁷。mCPBA はナカライテスクで購入し、渡辺らの方法で精製を行った¹⁸。H₂¹⁸O₂は、Foote らの方法に従い¹⁸O₂から合成を行った¹⁹。H₂¹⁸O₂中の¹⁸Oの割合はトリフェニルフォスフィンに H₂¹⁸O₂で酸化して得られるトリフェニルフォスフィンオキシドを Shimadzu GC-17A/GCMS-QP5000 (島津製作所) で定量することで決定した。反応に使用する過酸の濃度は過剰に存在するヨウ化カリウム中で HRP が触媒する I₃⁻ ($\epsilon_{535} = 2.62 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) の濃度を測定することで決定した^{20,21}。

カタラーゼは牛肝臓 (BLCase) および *Micrococcus lysodeikticus* (MLC) 由来をそれぞれシグマとナガセケムテックスから購入した。BLCase は緩衝溶液に溶解、透析後、Superdex 75 ゲル濾過クロマトグラフィー、Resocue Q イオン交換クロマトグラフィーを行い精製した。MLC は同様に溶解、透析後、Superdex 75 ゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。BLCase と MLC の濃度はそれぞれ、モル吸光係数 $\epsilon_{405} = 3.24 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ²²、 $\epsilon_{406} = 1.03 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ²³から求めた。H64A、H64S、H64D、F43H/H64L、L29H/H64L マッコウクジラ (SW) Mb の遺伝子は松井らが作成したものを使用し^{10,24}、変異体の発現および精製は Springer らの方法に従って行った²⁵。Mb 変異体の濃度は Mb の CO 体のモル吸光係数 $\epsilon_{423} = 1.87 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ から決定した²⁶。

重水緩衝液および試料の調製

例として、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液の調製例を示す。重水で薄めた酢酸

に濃い水酸化ナトリウム重水溶液を滴下し、pL を調整した後、50 mM になるように容量をあわせた。緩衝溶液の pL は、 $pL = pH_{obs} + 0.3314 n + 0.076 n^2$ (n は溶液中の重水分子の割合、 pH_{obs} は HM-30V pH meter (東亜電波工業株式会社) の pH の読み) の式を用い決定した²⁷。

重水の試料は、タンパク質水溶液 (1 mM) 0.5 mL に 4.5 mL の重水緩衝液を加え、攪拌後、限外濾過で 0.5 mL まで濃縮し、再び 4.5 mL の重水緩衝液を加えた。この作業を 5 回くり返した。その後、試料の H-D 交換を行うため、重水緩衝液中 4 °C で一晩静置した。

分光分析

吸収スペクトルは UV-2400 spectrophotometer (島津製作所) を用いて測定を行った。スペクトルの変化は、SF-43 cryostopped-flow MG 6000 diode array spectrophotometer (HI-TECH Scientific) あるいは RSP-601 stopped-flow rapid-scan spectrometer (ユニソク) を用いて測定をおこなった。

Mb 変異体と *m*CPBA の反応

正確な Mb-I を測定するために Mb の変異体 (5.5~9.7 μ M) を 10 モル当量以上の *m*CPBA で反応させた。*m*CPBA による Mb-I 生成速度は 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pL 5.0) 中、5 °C で 408 nm の吸光度の減少を追うことで決定した。二次反応速度定数は測定された擬一次反応速度定数対酸化剤の濃度をプロットすることで決定した。

Mb-I と過酸化水素の反応

Mb-I と過酸化水素の反応の追跡は、ダブルミキシングストップフロー法を用い、吸収スペクトル変化を直接観測して行った。カタラーゼ反応の触媒サイクルが回らないように、最初のみキシングでは Mb の変異体 (5.5~7.8 μ M) と 1.5 モル当量の *m*CPBA によって Mb-I を生成させ、引き続き、100 モル当量以上の過酸化水素を加えて (50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液, pL 5.0)、5 °C でカタラーゼ反応を開始させた。カタラーゼ反応は 408 nm の吸光度の増加を追うことで決定した。二回目のみキシングまでの遅延時間は 0.1~1.1 sec であった。H64A Mb-I と過酸化水素との反応の温度依存性は、反応を 5, 10, 15, 20, 25 °C で行なって検討した。アレニウスのパラメーター (A と E_a) はアレニウスプロ

ット ($\ln k = \ln A - E_a/RT$) によって決定した。

MLC と過酸化水素の反応

MLC の cpd I のスペクトル測定はラピッドスキャン法を用いて行った。Cpd I のスペクトルは軽水、重水緩衝液中で MLC (8.1 μM) と 40 モル当量のメチルヒドロペルオキシドを混合し、それぞれ、10 msec、15 msec 後のスペクトルとして観測した。過酸化水素による定常状態のスペクトル観測は、15 モル当量の過酸化水素と混合後、それぞれ、440 msec、610 msec 後に行なった。これらの測定は 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pL 7.0)、5 °C で行なった。

MLC と過酸化水素の反応の速度論的解析は、MLC-I 生成と過酸化水素濃度の減少をストップフロー法を用いて、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pL 7.0) 中、5 °C で測定した結果に基づいて行った。MLC-I 生成反応は MLC (1.0 ~ 2.0 μM) と 2-9 モル当量の過酸化水素を反応させ、406 nm の吸光度の減少を追跡した。MLC-I の生成反応は、 $\ln (A/A_0)(B_0/(B_0 - A_0 + A))$ 対時間の二次プロットで直線を引き、速度定数 ($k_{\text{app_cpd I}}$) を求めた。過酸化水素濃度の減少は、MLC (50 nM) と 40 モル当量以上の過酸化水素を反応させ、204 nm の吸光度の減少から追跡した。過酸化水素分解反応は $\ln (A - A_0)$ 対時間で一次プロットとして直線を引き、速度定数 ($k_{\text{app_peroxide}}$) を求めた。一次及び二次速度定数は Igor pro (ver. 4.01) を用い、最小二乗法で決定した。

酸素発生

酸素の生成は酸素電極 (TD-650, 東興化学研究所) を用いて行った。Mb の変異体 (10 mM) は、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 中、5 °C で過酸化水素 (1 mM) を混合することによって酸素を発生させた。

H₂¹⁶O₂/H₂¹⁸O₂ (1:1) とヘム酵素の反応による酸素生成物の同定

Mb 変異体 (50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 中、200 μM) および BLCase (50 mM リン酸ナトリウム (pH 7.0) 中、25 μM) を窒素雰囲気下、室温で 5 分間、H₂¹⁶O₂/H₂¹⁸O₂ (1:1) (200 mM) と攪拌することで酸素の生成を確認した。生成した酸素分子 (¹⁶O₂ ($m/e = 32$), ¹⁶O¹⁸O ($m/e = 34$), ¹⁸O₂ ($m/e = 36$)) は、VARIAN Molsieve 5A PLOT capillary column を用い Shimadzu GC-17A/GCMS-QP5000 で分離、定量を行った。

2.3 結果

軽水および重水中での Mb 変異体の cpd I 生成反応

至適条件下で求めた *m*CPBA と Mb の変異体の cpd I 生成反応の二次反応速度定数を表 2-1 に示した。H64A Mb と *m*CPBA の反応による Mb-I へのスペクトル変化を図 2-1A に示した。過酸を混合した 320 msec 後には、ソーレー帯の吸収は半分以下に減少し、648 nm にピークが新しく現われた。軽水、重水中での *m*CPBA による cpd I 生成反応の速度定数は小さな k_H/k_D (0.8~1.6) の値を示した。*m*CPBA の場合とは対照的に過酸化水素による H64D Mb-I の生成反応は、大きな同位体効果の値 ($k_H/k_D = 15$) を示し、過酸化水素からの脱プロトン化が律速となっていることがわかる。

軽水および重水中での Mb 変異体のカタラーゼ反応

Mb-I と過酸化水素による酸素分子生成反応の素過程の分光学的測定は、pL 5.0、5 °C でダブルミキシングストップフロー法を用いて行った。始めに、小過剰 (Mb の 1.5 モル当量) の *m*CPBA を用い、ほぼ完全な cpd I を得た²⁴。例えば H64A Mb ではソーレー帯の吸光度の減少と 648 nm の吸収の増加から Mb-I の生成が確認でき、この条件下で 95% の cpd I が生成した (図 2-1A)。他の Mb 変異体でも同様の実験条件下で Mb-I の生成が確認できた。さらに、H64A Mb-I に過酸化水素を加えると (2nd ミキシング)、Mb-I は他の中間体を経ることなく、直接 Fe^{III} に還元される (図 2-1B)。他の変異体でも同様のスペクトル変化が確認され、Mb-I は過酸化水素を二電子酸化できることが示された。これらのスペクトル変化から決定された軽水、重水中でのカタラーゼ反応の速度定数 (k_{2H} と k_{2D}) を表 2-2 に示した。重水で溶媒を置換することにより、H64X Mbs および L29H/H64L Mb のカタラーゼ反応の速度は 1/10~1/30 程度に減少した。H64A Mb の場合、アレニウスプロットから求めた A_H/A_D が 0.07 (表 2-3) であることから、これらの変異体の大きな速度論的同位体効果 (KIE) は直線的なトンネル効果によるものだということがわかった²⁸。一方、H64A Mb と対照的に、一般酸塩基触媒を持つ F43H/H64L は 2.1 という小さな同位体効果を示した。

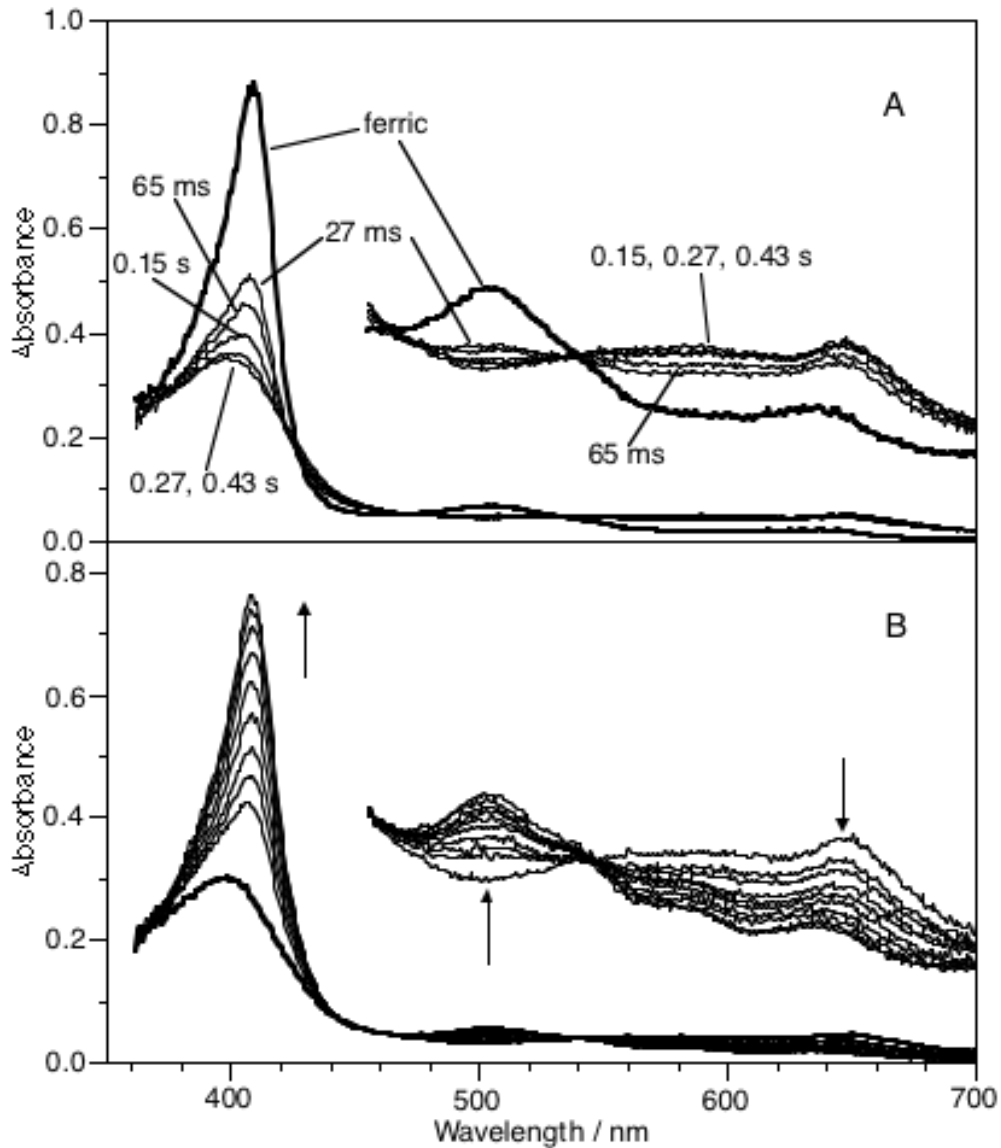


図 2-1. (A) H64A Mb と 1.5 モル当量の *m*CPBA の反応の吸収スペクトルの変化。混合後の条件：7.1 μ M H64A Mb、10.7 μ M *m*CPBA。スペクトルは *m*CPBA 混合前（太線）と混合後を示してある。(B) Mb-I と H₂O₂ の反応のスペクトル変化。混合後の条件：7.1 μ M H64A Mb、10.7 μ M *m*CPBA、250 μ M H₂O₂。スペクトルは H₂O₂ 混合後、0.40 秒後（太線）と 0.6～2.2 秒後を 0.20 秒間隔で示してある。測定条件は 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.0、5 °C でおこなった。

表 2-1. Mb と MLC の cpd I 形成反応の速度定数 (k_1)

Enzyme	substrate	$k_{1H}^{(a)}$ mM ⁻¹ s ⁻¹	$k_{1D}^{(b)}$ mM ⁻¹ s ⁻¹	k_{1H}/k_{1D}
H64A Mb	<i>m</i> CPBA	987 ± 1	626 ± 1	1.6
H64S Mb	<i>m</i> CPBA	629 ± 1	442 ± 1	1.4
H64D Mb	<i>m</i> CPBA	526 ± 1	328 ± 1	1.6
	H ₂ O ₂	12.4 ± 0.1	0.800 ± 0.022	15
L29H/H64L Mb	<i>m</i> CPBA	418 ± 3	420 ± 5	1.0
F43H/H64L Mb	<i>m</i> CPBA	667 ± 3	877 ± 27	0.8
MLC ^(a)	H ₂ O ₂	16000	10800	1.5

^a軽水中 ^b重水中.

Mb 変異体の測定条件 : 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pL 5.0、5 °C。

MLC の測定条件 : 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pL 7.0、5 °C。

表 2-2. Mb-I と MLC-I のカタラーゼ反応の速度定数 (k_2)

Enzyme	k_{1H} mM ⁻¹ s ⁻¹	k_{1D} mM ⁻¹ s ⁻¹	k_{1H}/k_{1D}
H64A Mb	5.26 ± 0.06	0.232 ± 0.029	23
H64S Mb	6.91 ± 0.01	0.238 ± 0.001	29
H64D Mb	15.8 ± 0.3	0.818 ± 0.002	18
L29H/H64L Mb	33.6 ± 0.1	3.39 ± 0.03	10
F43H/H64L Mb	21.0 ± 0.5	10.3 ± 0.1	2.1
MLC	7500	1890	4.0

^a軽水中 ^b重水中

Mb 変異体の測定条件 : 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pL 5.0、5 °C。

MLC の測定条件 : 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pL 7.0、5 °C。

表 2-3. H64A Mb-I と過酸化水素の反応の温度依存性

parameter	H64A
k_H (M ⁻¹ s ⁻¹) ^(a)	5260
k_D (M ⁻¹ s ⁻¹) ^(a)	232
KIE ^(a)	23
$\Delta E_{a(H)}$ (kcalmol ⁻¹) ^(b)	0.47
$\Delta E_{a(D)}$ (kcalmol ⁻¹) ^(b)	1.3
A_H/A_D ^(b)	0.07
$\Delta H^\ddagger_{(O-H)}$ (kcalmol ⁻¹) ^(b)	0.33
$\Delta H^\ddagger_{(O-D)}$ (kcalmol ⁻¹) ^(b)	1.2

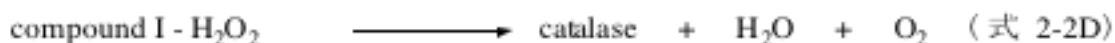
^a50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pL 5.0、5 °C。

^b50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pL 5.0、5、10、15、20、25 °C で測定をおこなった。

軽水および重水中でのカタラーゼの触媒反応

軽水および重水中の MLC と過酸化水素およびメチルヒドロペルオキシドとの反応の定常状態におけるスペクトルを図 2-2 に示す。過酸化水素との反応では軽水中および重水中の定常状態のスペクトルに大きな違いが見られた。対照的にメチルヒドロペルオキシドとの反応では、全く同じスペクトルが観測され、過酸を用いることで軽水、重水中に関わらず、100%の cpd I の生成が確認できたと考えられる。また、得られたスペクトルの変化量から、定常状態における過酸化水素による cpd I の生成は軽水、重水中でそれぞれ 45%、82%であることがわかった。

小過剰の過酸化水素を用いた cpd I の生成に伴うソーレー帯の吸収強度の減少(図 2-3)は、半減期は異なるものの、定常状態のスペクトルの吸光度がほぼ全ての反応で等しいことが示された。従って、この反応は過酸化水素の濃度に依存するが、MLC と過酸化水素の間には式 2-2A, C に示される平衡が存在しないことが明らかとなった。



Cpd I 生成で最もスペクトル変化の大きいソーレー帯(406 nm)の吸光度変化から、軽水、重水中の cpd I 生成速度定数 ($([\text{H}_2\text{O}_2]_0 - [\text{MLC}]_0) k_{\text{app, cpd I}} = \ln(([\text{MLC}] / [\text{MLC}]_0) / ([\text{H}_2\text{O}_2]_0 / ([\text{H}_2\text{O}_2]_0 - [\text{MLC}]_0 + [\text{MLC}])))$) ($[\text{H}_2\text{O}_2]_0$ は H_2O_2 の初濃度、 $[\text{MLC}]_0$ はカタラーゼの初濃度、 $[\text{MLC}]$ はカタラーゼの濃度) がそれぞれ $2.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $1.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ となった。一方、過酸化水素の分解反応による吸光度変化は、過酸化水素の吸収である 240nm から、軽水、重水中でそれぞれ約 2.5 sec、4.7 sec の半減期を持つ一次反応となった(図 2-4)。分解速度定数 ($k_{\text{app, H}_2\text{O}_2} = 2k_1k_2[\text{MLC}]_0 / (k_1 + k_2)$) は、カタラーゼ濃度が 50 nM の時 0.51 s^{-1} 、 0.16 s^{-1} となった。

この反応で過酸化水素が大過剰でも小過剰でも cpd I 生成のスペクトルの変化率に違いが見られないことから、定常状態に関係式を対応させることができ

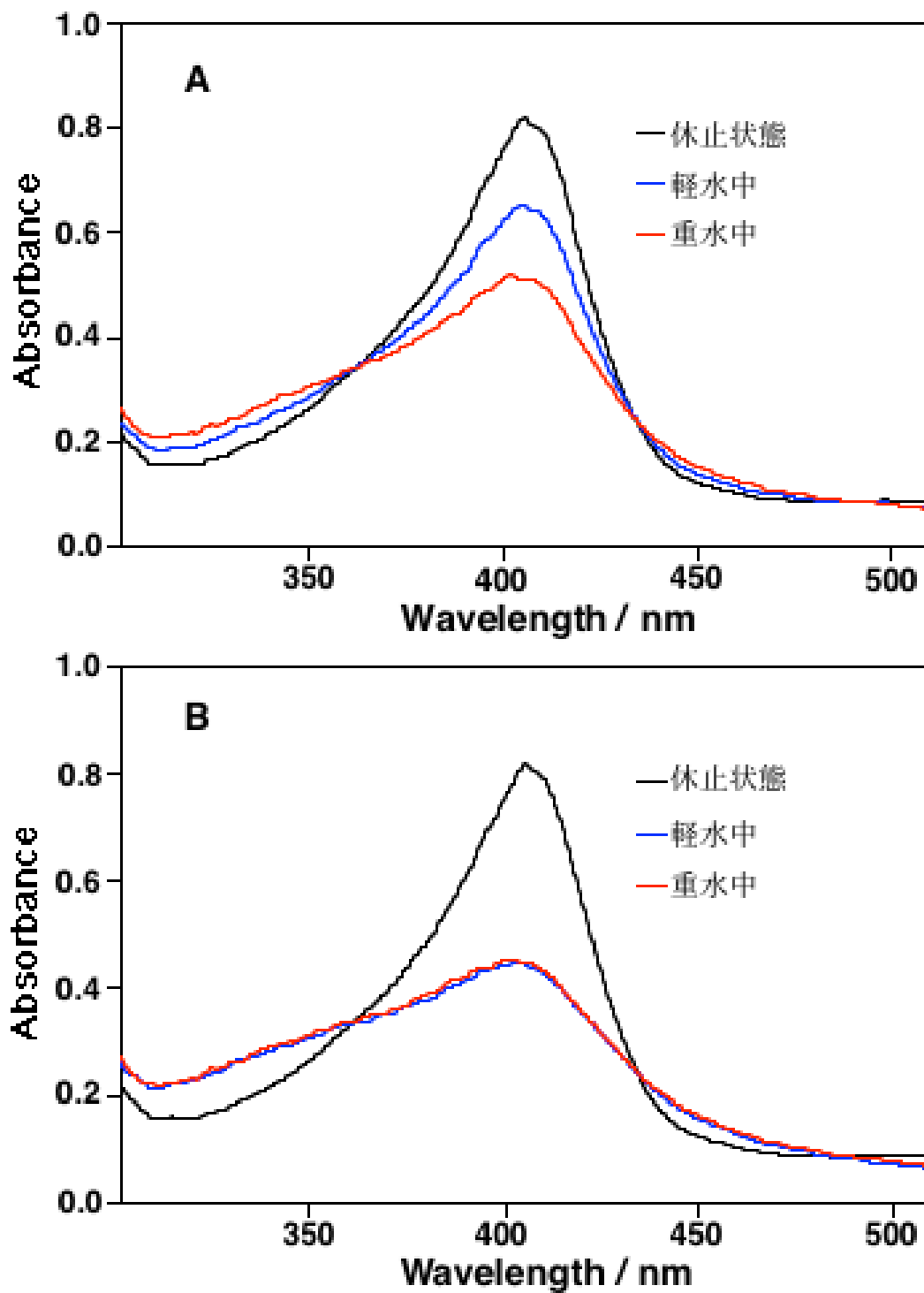


図 2-2. MLC と過酸化水素およびメチルヒドロペルオキシドとの反応における定常状態のスペクトル。(A)過酸化水素との反応。(B)メチルヒドロペルオキシドとの反応。反応条件：50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pL 7.0、5 °C。

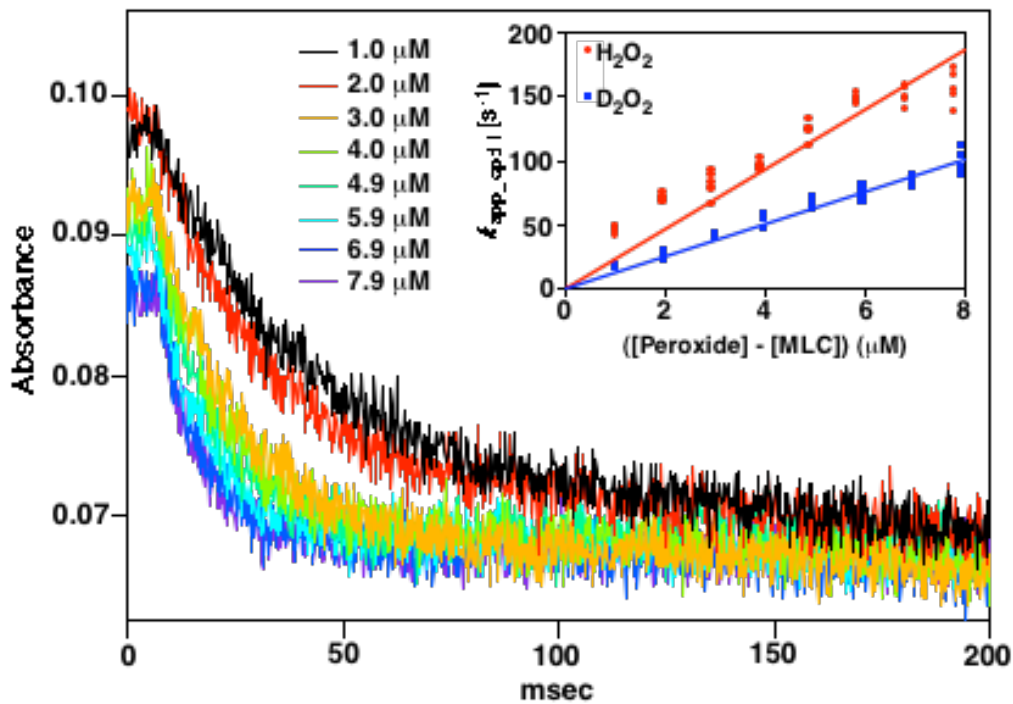


図 2-3. MLC と小過剰の過酸化水素の反応によるスペクトル変化。挿入図は、観測された速度定数のプロット。反応条件：50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pL 7.0、5 °C。

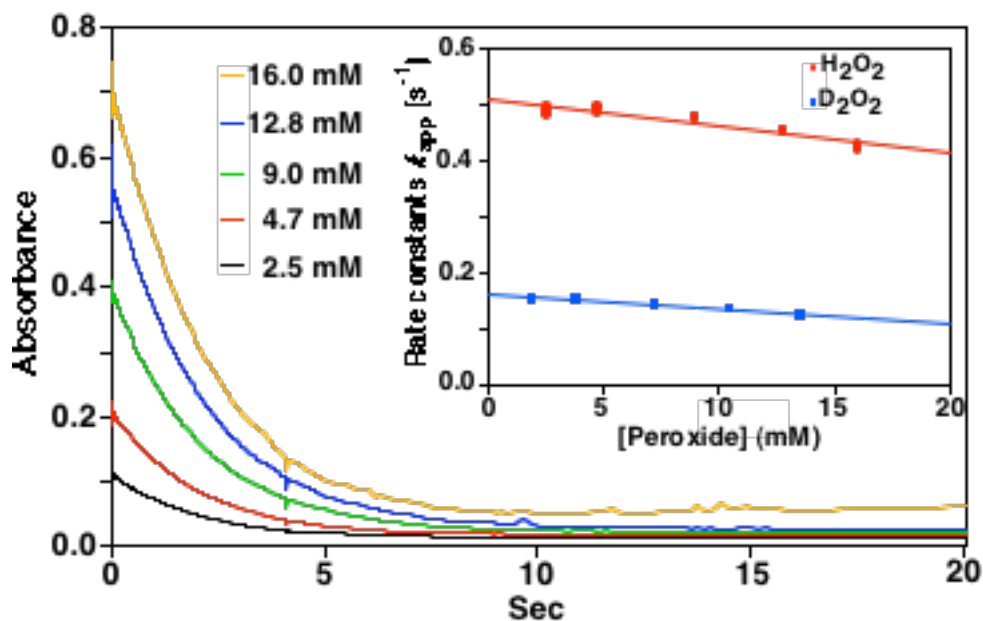


図 2-4. MLC と大過剰の過酸化水素の反応による過酸化水素の減少。挿入図は、観測された速度定数のプロット。反応条件：50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pL 7.0、5 °C。

ると考えられる。以上から、cpd I 生成反応の関係式は $k_{\text{app_cpd I}} = k_1 + k_2$ となり、分解反応の関係式は $k_{\text{app_peroxide}} = 2k_1k_2 [\text{MLC}]_0 / (k_1 + k_2)$ となることから、軽水、重水中でそれぞれ k_1 が $1.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $1.1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 k_2 が $7.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $1.9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 k_H/k_D が k_1 で 1.5、 k_2 で 4.0 となった (表 2-1, 2)。

O₂ の生成

100 モル当量以上の過酸化水素存在下、様々な Mb の変異体が生成する酸素を酸素電極によって測定し、求められた酸素生成速度を表 2-4 に示す。過酸化水素による H64D Mb の cpd I 生成とカタラーゼ反応速度、酸素発生速度は、 $1.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $1.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、8.1 turnover/min であるのに対し、MLC では、 $1.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $7.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、3,056 turnover/min であった。すなわち、H64D Mb と MLC では cpd I 生成速度、cpd I による過酸化水素の分解速度、さらに触媒条件下の酸素分子の発生速度を比べると、MLC が H64D Mb に対して、1,300 倍、470 倍、380 倍大きいことになる。従って、この触媒条件下で得られた酸素生成活性とカタラーゼ反応の速度との比が約 400 と同程度である。

表 2-4. Mb 変異体および MLC と過酸化水素との反応による酸素発生

Enzyme	Turnover/min
Mb H64A ^(a)	1.7
Mb H64S ^(a)	2.2
Mb H64D ^(a)	8.1
Mb L29H/H64L ^(a)	0.93
Mb F43H/H64L ^(a)	5.0
Catalase ^(b)	3,056

Mb の変異体の測定条件 : 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pL 5.0、5 °C。

MLC の測定条件 : 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pL 7.0、5 °C。

MLC の酸素発生量は過酸化水素分解速度から換算した。

50 : 50 で混合した H₂¹⁸O₂/H₂¹⁶O₂ との反応で生成した O₂ の同定

50 : 50 で混合した H₂¹⁸O₂/H₂¹⁶O₂ 溶液を用いて、H64D Mb と F43H/H64L Mb によるカタラーゼ反応で発生した O₂ を GC-MS で分析した結果、¹⁸O₂ (m/e = 36) と ¹⁶O₂ (m/e = 32) の 2 つのピークが検出され、¹⁶O¹⁸O (m/e = 34) は約 3 % と実験誤差程度しか検出されなかった。同様の結果は、他の Mb 変異体によるカタラーゼの反応やカタラーゼ自身、さらに CPO でも得られており、同じ中間体を経て、反応が進行することが示された^{29,30}。

2.4 考察

カタラーゼの反応速度

カタラーゼにおける cpd I 生成反応速度の研究は、今まで *Micrococcus lysodeikticus*、人赤血球、馬肝臓、牛肝臓由来種などを用いて行なわれ、酸素の生成条件下もしくは阻害剤としてエタノール存在下で測定が行われ、二次反応速度定数は、 $0.56 \sim 6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ の範囲の値であった^{4,31-34}。また、カタラーゼ反応は BLCase を用い、 $0.25 \sim 1.00 \text{ M}$ のエタノール存在下で反応が解析され、 $1.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と報告されている⁴。しかし、同じ反応条件下で行なわれた、この BLCase による cpd I 生成反応では、cpd I 生成速度が $5.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と他の測定と比べ半分以下の反応速度であり、タンパク質の変性やアセトアルデヒドとの副反応が起きている可能性がある。以上の点を考えると、こうした阻害剤存在下でなく、純粋なカタラーゼと過酸化水素による詳細な速度論的解析が必要であると考えられる。そこで今回の測定では、過酸化水素とカタラーゼのみの反応でスペクトルに変化が観測される MLC を用い、ヘムに特徴的なソーレー帯の cpd I 生成に伴う吸光度の減少およびカタラーゼと過酸化水素の反応による過酸化水素の減少から cpd I の生成速度と cpd I による過酸化水素の分解速度を最も基本的な速度式によって決定した。Cpd I 生成速度定数は $1.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ となり、これまでの測定結果と比較しても大きな違いは見られなかった。カタラーゼ反応の速度定数は $7.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ となった。得られた cpd I の生成速度とカタラーゼ反応速度の比は、触媒反応条件下で過酸化水素によって形成される cpd I の定常濃度から得られる速度定数の比とほぼ一致した。

Cpd I 生成およびカタラーゼ反応の同位体効果

軽水中と重水中で測定した過酸化水素による MLC の cpd I 生成速度の KIE の値は 1.5 となった。この同位体効果は、Dunford らによる西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) の cpd I で報告されている $\text{KIE} = 1.6$ と近い値である³⁵。従って、カタラーゼによる cpd I 生成反応でも、遠位ヒスチジンの一般酸塩基触媒作用により、過酸化水素からのプロトン引き抜きが円滑に進行していると考えられる。対照的に、一般酸塩基触媒を持たない H64D Mb と過酸化水素との反応では大きな値の KIE ($k_{\text{H}}/k_{\text{D}} = 15$) が得られ、過酸化重水素の O-D 結合開裂が H64D Mb-I の生成の律速であり、脱プロトン化に高いバリアが存在していると考えら

れる。一方、Mb 変異体と *m*CPBA の反応による Mb-I 生成の速度定数から決定した k_H/k_D の値は 0.8~1.6 の範囲であり、容易にプロトンの解離が起こっていることがわかる。反応で用いた酸化剤の過酸化水素と *m*CPBA の *pKa* はそれぞれ 11.6¹¹、7.57³⁶である。一般酸塩基触媒の効果を検証すると MLC と HRP の KIE は 1.5 および 1.6 であり、H64D Mb と *m*CPBA との反応における k_H/k_D も 1.6 である。それに対し H64D Mb と過酸化水素による反応における KIE は 15 であることから、一般酸塩基触媒により *pKa* を約 4 低下させるほどの効果があったと考えられる。

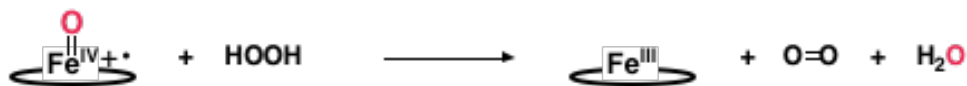
MLC-I と過酸化水素の反応の場合、カタラーゼ反応によって生成する Fe^{III} 状態が系内に過剰に存在する過酸化水素とすばやく反応するため、結果的に cpd I と Fe^{III} 状態が一定の割合で混在する定常状態に至る過程のみが観測された。そこで、本論文では MLC の重水素同位体効果を得るために、過酸化水素小過剰による cpd I 生成速度と、大過剰の過酸化水素存在下の過酸化水素の分解速度からカタラーゼ反応における速度論的解析を行い、カタラーゼ反応における同位体効果 4.0 を決定した (表 2-2)。反応素過程の直接観測が可能な F43H/H64L Mb では、カタラーゼ反応における KIE は 2.1 という小さな同位体効果がえられた。これらの結果から、MLC や F43H/H64L Mb では cpd I と過酸化水素の反応において脱プロトン化が円滑に進行していることを示している。一方、その他の Mb-I と過酸化水素の反応では、L29H/H64L Mb と H64X (X = D, A, S) Mb の KIE の値が F43H/H64L Mb や MLC の値に比べ明らかに大きな値 (10~29) となった (表 2-2)。こうした大きな KIE 値は、アレニウスのパラメーターの比 ($A_H/A_D = 0.07$) からトンネル効果によるものだと結論された²⁸。

カタラーゼ反応で生成する酸素分子の酸素源

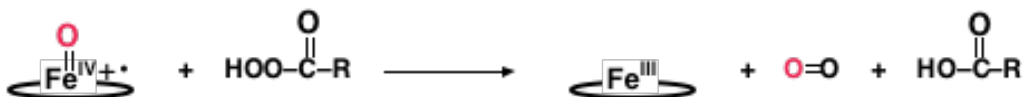
カタラーゼの cpd I による過酸化水素の分解反応で生成する酸素分子は、過酸化水素自身の二つの酸素分子によって構成されることが実験的に検証されている (スキーム 2-1A)。一方、CPO は過酸 (R-CO₃H) を分解して酸素分子を生成するが、その際、cpd I の酸素原子と過酸の酸素原子が結合して酸素分子を与える (スキーム 2-1B)²⁹。そこで、50 : 50 で混合した H₂¹⁸O₂/H₂¹⁶O₂ 溶液と Mb 変異体およびカタラーゼを反応させて、生成する酸素分子の分子量を調べたところ ¹⁸O₂ と ¹⁶O₂ だけが生成した。このことから、過酸化水素の二電子酸化によって生成する O₂ は一般酸塩基触媒の有無に関わらず O-O 結合が切断され

ることなく生じたものであることが確認された。

(A)



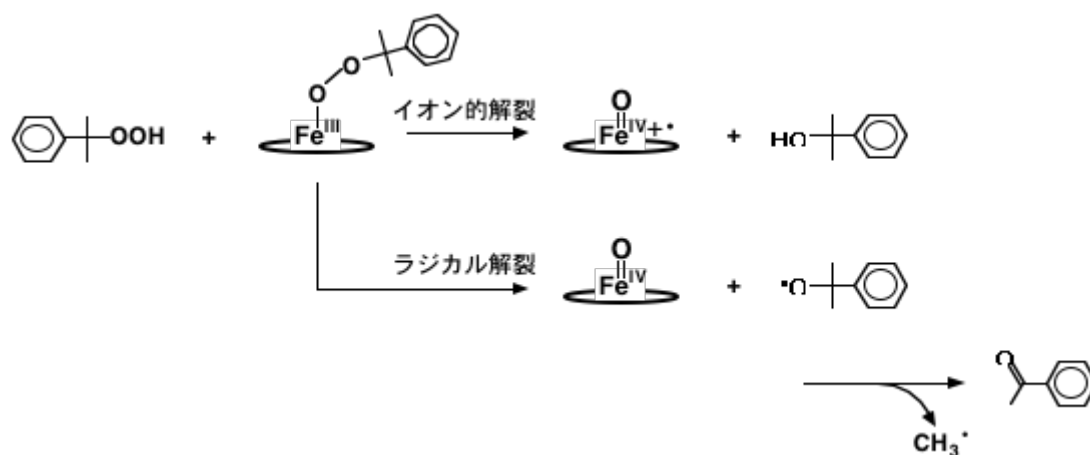
(B)



スキーム 2-1. CPO の cpd I による過酸化水素 (A) および過酸 (B) の酸化反応。

構造と KIE の関係

クメンヒドロペルオキシドとヘムタンパク質の反応はスキーム 2-2 に示す様に二つの反応が知られている。すなわち、O-O 結合のイオンの解裂とラジカル解裂である。ヘム近傍に一般酸塩基触媒として作用可能な His 残基を有するペルオキシダーゼではイオンの解裂が優先的に進行する。一方、一般酸塩基触媒がない場合はラジカル解裂の割合がイオンの解裂に比べて増加する。従って、クミルアルコールとアセトフェノンの生成比を調べることで、一般酸塩基触媒の寄与を推定することができる。一方、シアン化水素 (HCN) は、ヘムタンパク質に第六配位子として CN⁻型で配位する。この場合、HCN からの脱プロトン



スキーム 2-2 クメンヒドロペルオキシドとヘムタンパク質の反応の反応機構。
 (A) イオンの解裂。(B) ラジカル解裂。

化が重要であり、ヘム近傍にある His が塩基として作用可能な場合は脱プロトン化が容易に進行し、CN⁻の結合速度が大きくなる。従って、Mb 変異体のヘム近傍の His の塩基性および一般酸塩基としての作用を見積もるために、HCN⁻の結合速度やクメンヒドロペルオキシドとヘムタンパク質の反応生成物であるクミルアルコールとアセトフェノンの割合が検討されている。その結果、F43H/H64L Mb の遠位側に存在する His (His43) は一般酸塩基触媒として働き、L29H/H64L Mb と H64D Mb の遠位側に存在する His (His29) と Asp (Asp64) は触媒としてほとんど働くことがないことが示されている^{10,11}。F43H/H64L Mb の結晶構造から、His43 の N_δ からヘムの Fe^{III} までの距離は 5.7 Å であり、チトクロム *c* ペルオキシダーゼ (CcP) や MLC と構造的に近い位置に存在する (図 2-5A, C, D)^{10,37,38}。一方、L29H/H64L Mb では Fe-N_δHis が 6.6 Å と遠いために、一般酸塩基触媒として機能できない (図 2-5B)¹⁰。

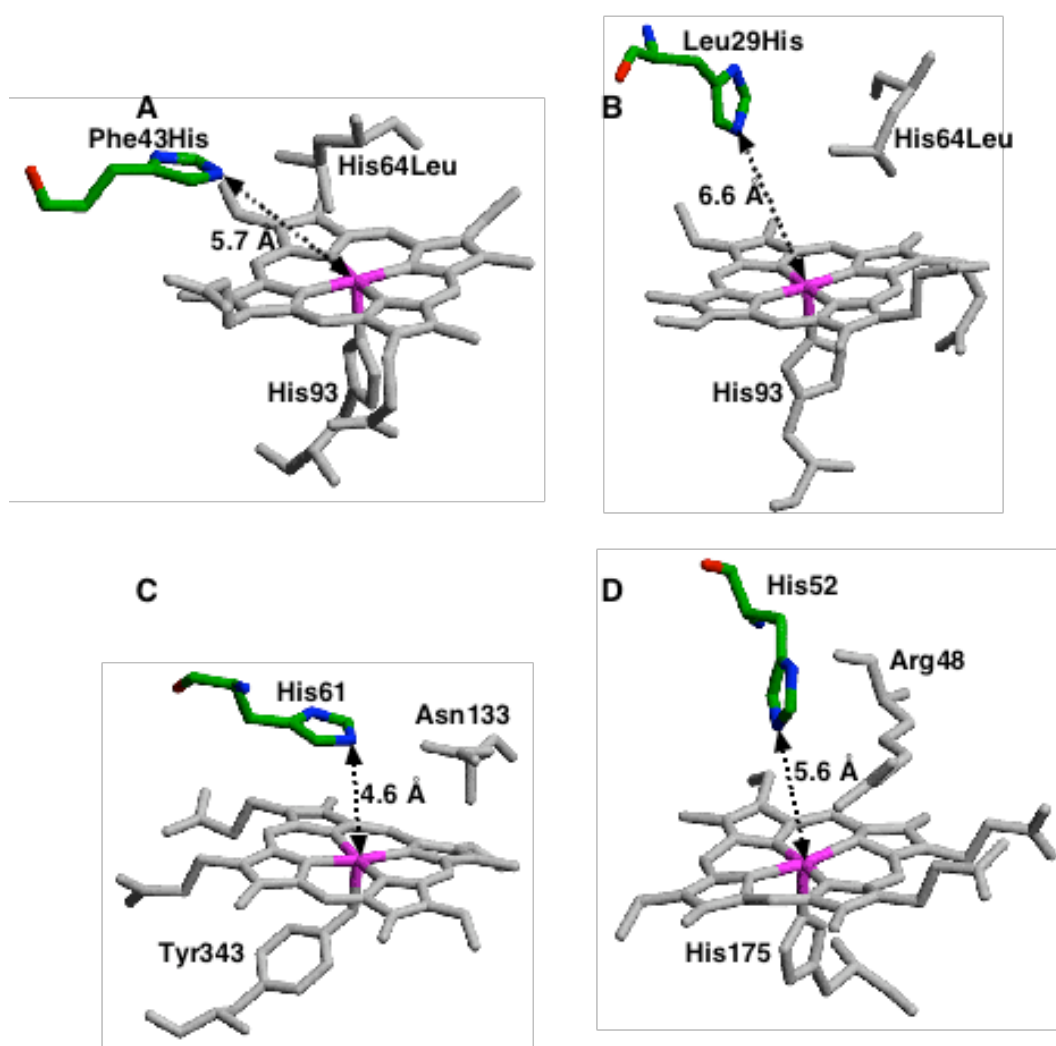


図 2-5. (A)F43H/H64L Mb、(B)L29H/H64L Mb、(C)MLC、(D)CcP の活性中心構造。

すなわち、適切な位置に一般酸塩基触媒が存在する MLC と F43H/H64L Mb のカタラーゼ反応はイオンの機構により進行し、円滑に過酸化水素からのプロトンの引き抜きが行われるため、小さな KIE (<9) を示す。一方、一般酸塩基触媒の欠損している他の Mb の変異体では、cpd I の酸素がトンネル効果を伴う水素 (H⁺) の引き抜きを経て、過酸化水素を酸化するため、非常に大きな KIE (10~29) を示すと考えられる。

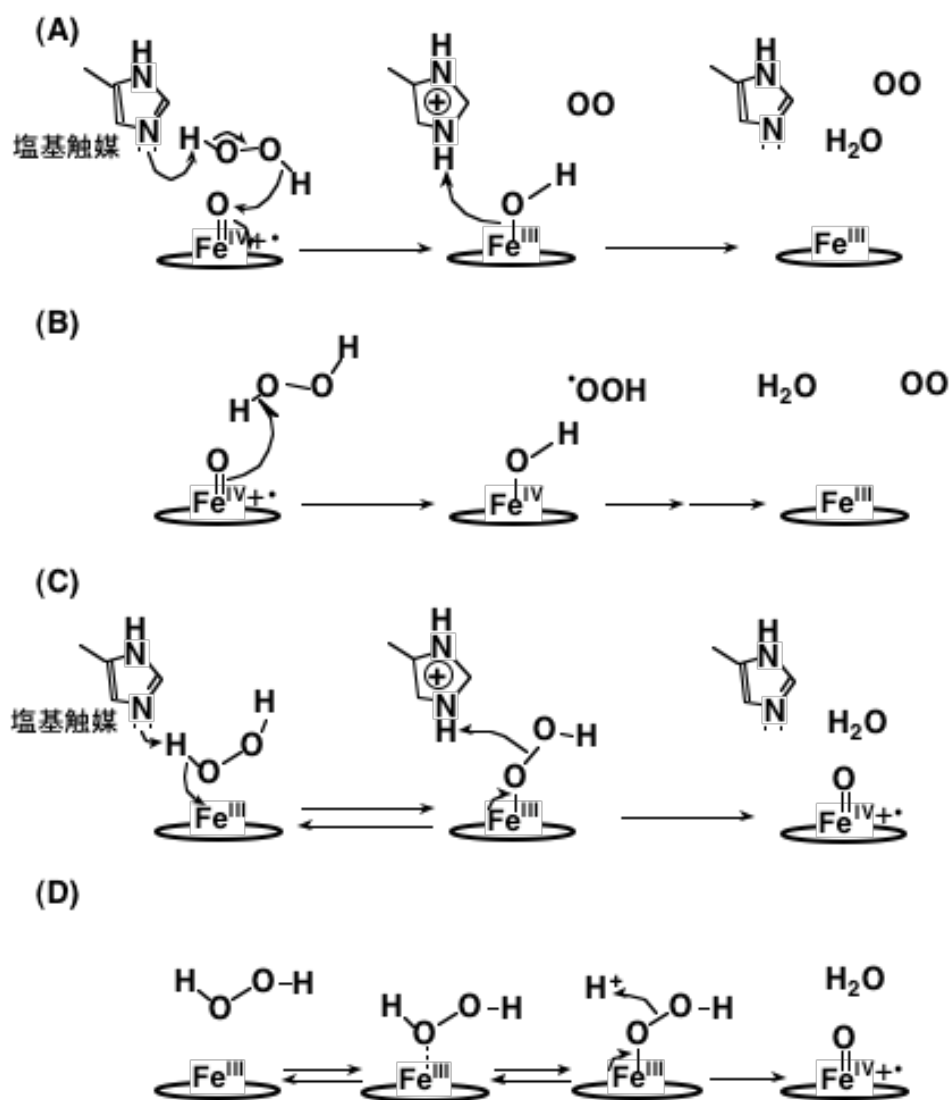
カタラーゼ触媒反応機構

Mb の変異体やカタラーゼの構造、KIE の値および生成される酸素の組成から、ヘム酵素と過酸化水素の反応による cpd I の生成と、それに引き続いて進行する cpd I と過酸化水素の反応による O₂ 形成にはそれぞれ二つの反応機構が考えられる (スキーム 2-3)。まず cpd I と過酸化水素の反応では、遠位側に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、最初にプロトンを引き抜くというイオンの機構(A)が考えられる。この場合、F43H/H64L Mb や MLC のように KIE は 2.1 や 4.0 という小さな値を示す。一般酸塩基触媒がない場合、cpd I のオキソ酸素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機構(B)が考えられる。このような例として、チトクロム P450 (P450) やモデル錯体の cpd I によるアルキル基の水酸化反応が知られており、その水酸化反応の第一段階はアルキル基からの水素原子 (H⁺) の引き抜きであり、ノンヘム酵素によるアルカンの水酸化反応でも同様な反応が進行していると考えられている^{39,40}。こうした水素原子の引き抜き反応は多くの場合、KIE が 9~29 と大きな値を与え、その原因はトンネル効果によるものである。測定を行った H64A Mb-I のカタラーゼ反応においても 5 °C で KIE が 23 となり、トンネル効果 ($A_H/A_D = 0.07$) も観測された²⁸。

一方、cpd I 生成反応では、一般酸塩基触媒がある場合、反応の第一段階の脱プロトン過程で His が塩基触媒として働き、最終的に cpd I が生成する機構が考えられる (C)⁴¹。一方、一般酸塩基触媒がない場合、ヘム鉄に配位した過酸化水素のプロトン脱離による cpd I 生成反応機構 (D) が考えられる。この場合、遊離のプロトンを捕らえる塩基が存在しないため、KIE は大きな値が予測される。以上のポイントをまとめると、カタラーゼの場合、過酸化水素との反応を効率良く進めるために、遠位ヒスチジンが一般酸塩基触媒として働き、KIE は小さな値を与える。すなわち、A, C の機構で反応が進行していると考えられる。

カタラーゼの結晶構造の検討

さらにカタラーゼの活性を考慮する上で、構造の検討が必要であると考え。Fita らは BLCase の結晶構造から、カタラーゼ反応の第一段階として cpd I と過酸化水素の複合体の形成を考えた。そこで推定された過酸化水素の位置は、cpd I の酸素および His74 の窒素と過酸化水素が水素結合し、Asn147 の窒素と過酸化水素の酸素が一つもしくは二つ水素結合を形成することで His と鉄をむすぶ位置に存在すると提唱した (図 2-6) ²。 *Proteus mirabilis* 由来のカタラーゼにつ



スキーム 2-3. カタラーゼの触媒反応の推定機構。(A)カタラーゼ反応の一般酸塩基触媒によるイオニックな機構。(B)カタラーゼ反応のラジカル的な機構。(C)cpd I 形成反応の一般酸塩基触媒によるイオニックな反応機構。(D)触媒を有さない過酸化水素の水素置換による cpd I 形成反応機構。

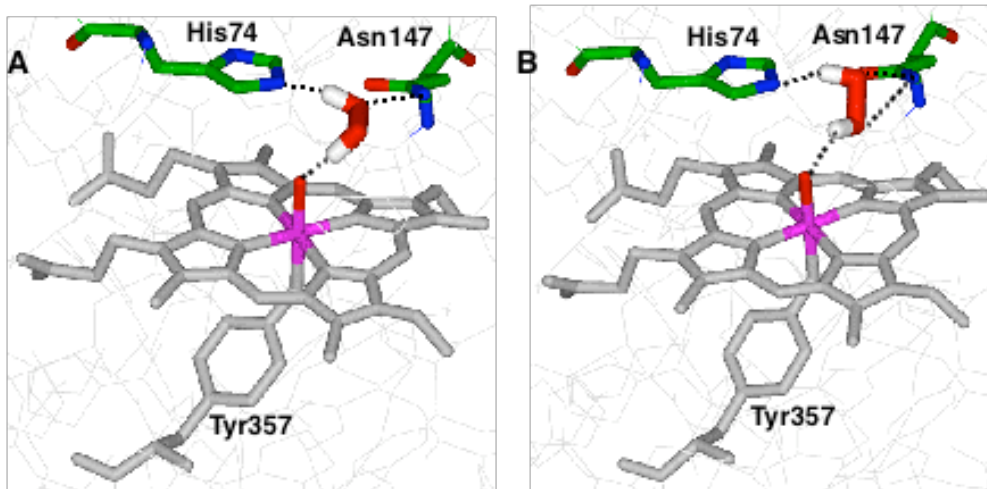


図 2-6. Fita らによるカタラーゼの cpd I と過酸化水素の複合体の推定機構。

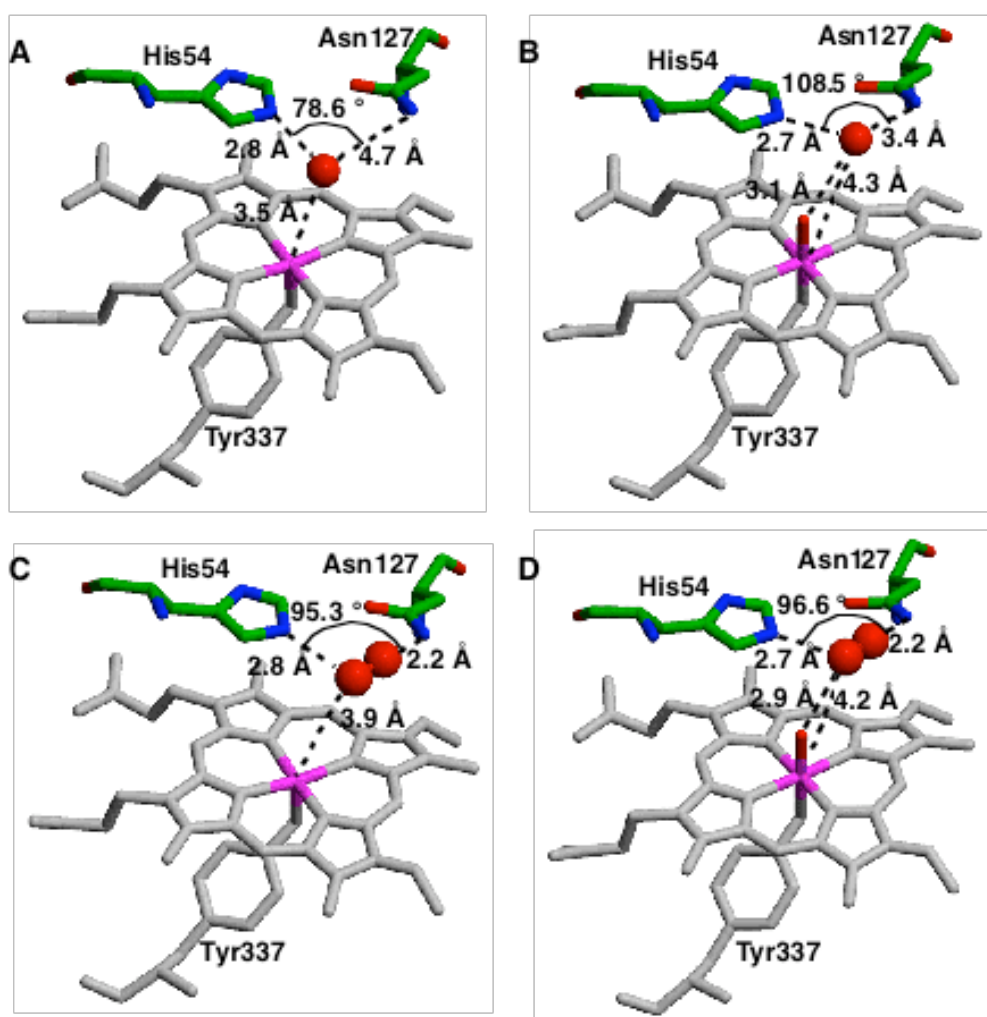


図 2-7. PMC の休止状態の結晶構造(A)、cpd I の結晶構造(B)、休止状態の過酸化水素複合体の推定構造(C)および cpd I の過酸化水素複合体の推定構造(D)。

いて、休止状態 (PMC) および cpd I (PMC-I) の結晶構造が解かれている^{42,43}。休止状態と cpd I の結晶構造の活性中心の構造を比較すると図 2-7 A, B のようになる。ヘム上部に存在する水分子を PMC と PMC-I は共に一つ持ち、それぞれ水分子は His54 から 2.84 Å, 2.73 Å の場所に、Asn127 の窒素からは 4.65 Å, 3.35 Å、鉄からは 3.48 Å, 4.32 Å、cpd I の酸素からは 3.31 Å の距離に位置している。また、His54 の窒素、水の酸素、Asn127 の窒素で形成される角度は 78.6°、108.5°であった。過酸化水素の

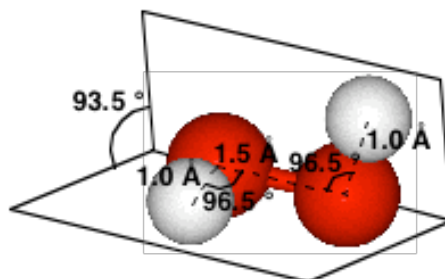


図 2-8. 過酸化水素の構造

H-O 結合、O-O 結合の距離は 0.97 Å, 1.49 Å、H-O-O で形成される角度は 96.52°であることから(図 2-8)、水分子の存在する位置を参考に最も過酸化水素がストレスを受けない位置に配置すると、Asn127 の窒素と水分子の線上に過酸化水素の O-O 結合が存在し、過酸化水素は His54 と Asn127 を結んでいる。従って、鉄側の過酸化水素のプロトンが休止状態と cpd I で共に His54 によって引き抜かれる反応が進行すると考えられ (図 2-7 C, D)、実験的に得られた低い KIE の値とも一致する。一方、F43H/H64L Mb のヘム近傍には、鉄に配位している水分子(Wat1)と配位していない水分子(Wat2)が存在している(図 2-9 A)。二つの水分子間の距離は 2.81 Å であり、Wat2 と His の窒素の距離は 2.75 Å であった。His と Wat2, Wat1 で形成される角度は 111.5°であった。この構造をふまえ、PMC と同様に休止状態および cpd I における過酸化水素の位置を予測すると、過酸化水素は His43 と鉄をむすぶように存在すると考えられる(図 2-9 B, C)。このことから、F43H/H64L Mb では Fita らの提唱したような配位で過酸化水素が存在し、His43 が一般酸塩基触媒として作用することが可能となり、カタラーゼと同一の反応機構で cpd I の生成とカタラーゼ反応が進行すると考えられる。他の Mb 変異体では、一般酸塩基触媒として働くアミノ酸残基がヘム近傍に存在しないため、異なる機構で反応が進行し、KIE も大きな値を与えたと考えられる。

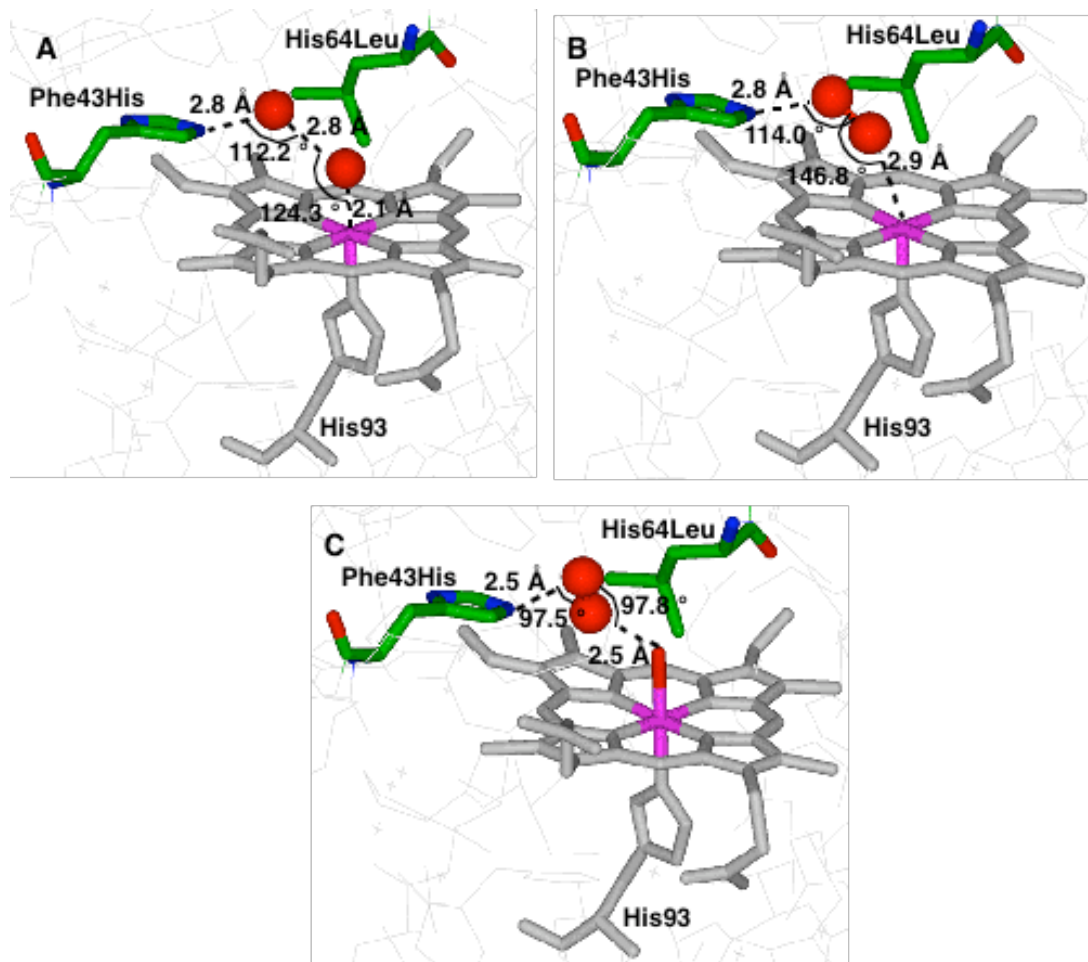


図 2-9. F43H/H64L Mb の休止状態の結晶構造(A)、休止状態の過酸化水素複合体の推定構造(B)および cpd I の過酸化水素複合体の推定構造(C)。

まとめ

本章では Mb-I と過酸化水素の反応の直接測定と MLC の cpd I および酸素分子の生成反応の測定による速度論的解析によって、Mb の変異体と MLC のカタラーゼ反応の素過程の検証をおこなった。Mb の変異体の cpd I と過酸化水素の反応での KIE は、カタラーゼ反応に異なる二つの機構が存在することを示した。それは、一般酸塩基触媒として作用する遠位側の His の存在の有無によるイオンの機構とラジカル的な機構である。カタラーゼの場合、イオンの機構により反応が進行していることが示された。さらに F43H/H64L Mb との構造の比較より、過酸化水素の配向が機構に影響を及ぼしていると考えられた。

- (1) Dunford, H. B. *Heme Peroxidases*; WILEY-VCH: NEW YORK, 1999.
- (2) Fita, I.; Rossmann, M. G. *J. Mol. Biol.* **1985**, *185*, 21-37.
- (3) Chance, B.; Greenstein, D. S.; Roughton, F. J. W. *Arch. Biochem. Biophys.* **1952**, *37*, 301-321.
- (4) Kremer, M. L. *Biochim. Biophys. Acta.* **1970**, *198*, 199-209.
- (5) Thomas, J. A.; Morris, D. R.; Hager, L. P. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 3219.
- (6) Nagy, J. M.; Cass, A. E. G.; Brown, K. A. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 31265-31271.
- (7) Adachi, S.-i.; Nagano, S.; Ishimori, K.; Watanabe, Y.; Morishima, I. *Biochemistry* **1993**, *32*, 241-252.
- (8) Egeberg, K. D.; Springer, B. A.; Martinis, S. A.; Sligar, S. G.; Morikis, D.; Champion, P. M. *Biochemistry* **1990**, *29*, 9783-9791.
- (9) Hargrove, M. S.; Singleton, E. W.; Quillin, M. L.; Ortiz, L. A.; George N. Phillips, J.; Olson, J. S.; Mathews, A. J. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 4207-4214.
- (10) Matsui, T.; Ozaki, S.-i.; Liong, E.; George N. Phillips, J.; Watanabe, Y. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 2838-2844.
- (11) Matsui, T.; Ozaki, S.-i.; Watanabe, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9952-9957.
- (12) Ortiz de Montellano, P. R.; Catalano, C. E. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 9265-9271.
- (13) Rao, S. I.; Wilks, A.; Ortiz de Montellano, P. R. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 803-809.
- (14) Tschirret-Guth, R. A.; Ortiz de Montellano, P. R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *335*, 93-101.
- (15) Goto, Y.; Matsui, T.; Ozaki, S.; Watanabe, Y.; Fukuzumi, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9497-9502.
- (16) Hara, I.; Ueno, T.; Ozaki, S.-i.; Itoh, S.; Lee, K.; Ueyama, N.; Watanabe, Y. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 36067-36070.
- (17) Masser, B. M.; Stielstra, D. E.; Cappa, C. D.; Scholtens, K. W.; Elrod, M. J. *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, *197*, 219-235.
- (18) Groves, J. T.; Watanabe, Y. *Journal of the American Chemical Society* **1986**, *108*, 7834-7836.
- (19) Sawaki, Y.; Foote, C. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 6292-6296.

- (20) Cotton, M. L.; Dunford, H. B. *Canadian Journal of Chemistry*. **1973**, *51*, 582-587.
- (21) Schowen, K. B.; Schowen, R. L. *Methods Enzymol.* **1982**, *87*, 551-606.
- (22) Lardinois, O. M.; Mestdagh, M. M.; Rouxhet, P. G. *Biochimica et Biophysica Acta* **1996**, *1295*, 222-238.
- (23) Brill, A. S.; Williams, R. J. P. *Biochem. J.* **1961**, *78*, 253-262.
- (24) Matsui, T.; Ozaki, S.-i.; Watanabe, Y. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32735-32738.
- (25) Springer, B. A.; Egeberg, K. D.; Sligar, S. G.; Rohlfs, R. J.; Mathews, A. J.; Olson, J. S. *Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264*, 3057-3060.
- (26) Antonini, E.; Brunori, M. *Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands*; North-Holland Publishing Co: London, 1971.
- (27) Bishop, G. R.; Davidson, V. L. *Biochemistry* **1995**, *34*, 12082-12086.
- (28) Kwart, H. *Acc. Chem. Res.* **1982**, *15*, 401-408.
- (29) Hager, L. P.; Doubek, D. L.; Silverstein, R. M.; Hargis, J. H.; Martin, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 4364-4366.
- (30) Jarnagin, R. C.; Wang, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 786-787.
- (31) George, P. *Biochemical Journal* **1949**, *44*, 197-205.
- (32) Chance, B. *Biochemical Journal* **1950**, *46*, 387-402.
- (33) Bonnichsen, R. K.; Chance, B.; Theorell, H. *Acta Chemica Scandinavica* **1947**, *1*, 685-709.
- (34) Chance, B.; Herbert, D. *Biochemical Journal* **1950**, 402-414.
- (35) Dunford, H. B.; Hewson, W. D.; Steiner, H. *Can. J. Chem.* **1978**, *56*, 2844-2852.
- (36) Serjeant, E. P.; Dempsey, B. *Ionisation constants of organic acids in aqueous solution*; Pergamon Press: New York, 1979.
- (37) Murshudov, G.; Melik-Adamyanyan, W.; Grebenko, A.; Barynin, V.; Vagin, A.; Vainshtein, B.; Dauter, Z.; Wilson, K. *FEBS Lett* **1992**, *312*, 127-131.
- (38) Poulos, T. L.; Freer, S. T.; Alden, R. A.; Edwards, S. L.; Skogland, U.; Takio, K.; Eriksson, B.; Xuong, N.-h.; Yonetani, T.; Kraut, J. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 575-580.
- (39) Neshein, j. C.; Lipscomb, J. D. *Biochemistry* **1996**, *35*, 10240-10247.
- (40) Sorokin, A.; Robert, A.; Meunier, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7293-

7299.

(41) Ozaki, S.; Roach, M. P.; Matsui, T.; Watanabe, Y. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 818-825.

(42) Gouet, P.; Jouve, H. M.; Dideberg, O. *J Mol Biol* **1995**, *249*, 933-954.

(43) Andreoletti, P.; Sainz, G.; Jaquinod, M.; Gagnon, J.; Jouve, H. M. *Proteins-Structure Function and Genetics* **2003**, *50*, 261-271.

第三章

ミオグロビン変異体を用いた軸配位子に対する
水素結合の役割の解明

3.1 序論

金属酵素の結晶構造を見ると、Cys の硫黄原子や His の窒素原子等金属に配位しているアミノ酸側鎖のヘテロ原子が水素結合を形成している例が多い。この水素結合は、酵素の反応制御に重要な役割を果たしていると考えられている。ヘム酵素でもペルオキシダーゼ^{1,2}、カタラーゼ³、クロロペルオキシダーゼ (CPO)⁴、シトクロム P450 (P450)⁵、カタラーゼ-ペルオキシダーゼ (KatG)⁶等で軸配位子に対する水素結合が確認されている。例えばカタラーゼでは、軸配位子 Tyr343 の酸素と Arg339 (*Micrococcus lysodeikticus* 由来)、CPO は、軸配位子の Cys29 と Ala31、Leu32 のペプチド結合の NH の水素との間、KatG で軸配位子 His279 と Asp389 である。さらに興味深いことに、カタラーゼの構造をよく観察すると、ヘム近位側の軸配位子 Tyr343 から遠位側の一般酸塩基触媒である His61 まで水素結合のネットワークが形成されていることがわかる⁷。このことから、遠位側と近位側の間をつなぐ水素結合のネットワークがカタラーゼ反応において重要な役割をはたしていると考えられる。また、酸化活性種 (cpd I)⁸と休止状態⁹の結晶構造から、ヘム鉄と Tyr の酸素の距離および Tyr と水素結合を形成している Arg との間の距離が変化していることがわかる。一方、モデル錯体である (オクタエチルポルフィナト) (フェノレート) 鉄錯体 ($\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OEP})(\text{PhO})$) の軸配位子に対する水素結合の導入により、ヘムと軸配位子の距離が 0.046 Å 伸びるという報告がある¹⁰。これらの結果から、ヘムに配位する軸配位子が、水素結合によってヘム鉄との結合距離を変えることによって、ヘム酵素が行なう反応を制御していると考えられるが、触媒サイクルにおいて具体的にどのように作用しているのかよくわかっていない。

ヘム酵素の軸配位子の位置についても一定の規則が存在し、軸配位子が Tyr、Cys、His と変わるにつれて、 \square -ヘリックス上に存在する位置も変化する。軸配位子が Tyr であるカタラーゼは \square -ヘリックスの中程に存在するのに対し、Cys を軸配位子に持つ CPO や P450 では N 末端に、シトクロム c ペルオキシダーゼや KatG のような His を軸配位子に持つヘム酵素は C 末端に軸配位子が存在する (図 3-1)¹¹。この \square -ヘリックス上での軸配位子の位置に対する効果は、 M^{III} (OEP) (Cys-ヘリカルペプチド) の Fe^{III} および Ga^{III} 錯体を用いて検討され、錯体に配位している \square -ヘリックスの距離がのびることにより、 $\text{Fe}(\text{III})\square$ $\text{Fe}(\text{II})$ 間の酸化還元電位は小さくなり、軸配位子である Cys の硫黄原子とそれに続くアミ

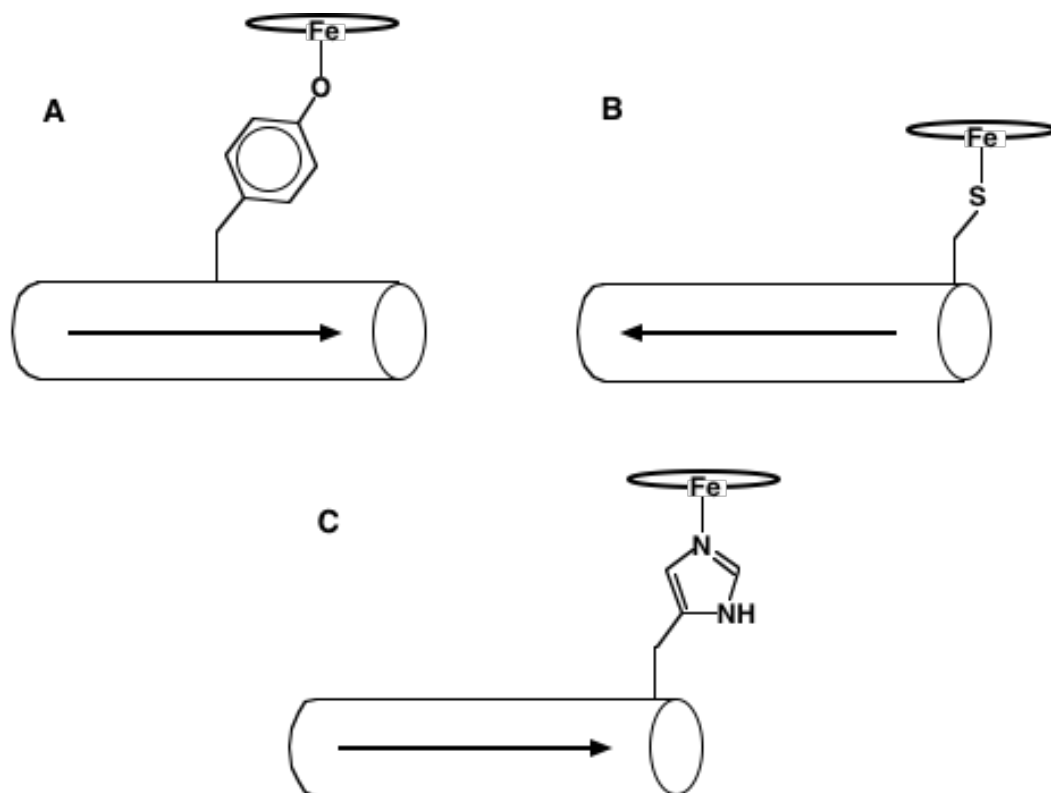


図 3-1. ヘム酵素の軸配位子の位置。カタラーゼ (A)。P450 および CPO (B)。HRP および KatG (C)。

ノ酸残基との水素結合の距離が短くなることが示された¹²。このことから、ヘム酵素は軸配位子をどの位置に配置するかによっても反応性を制御している可能性が考えられる。

近年、カタラーゼ反応がカタラーゼ以外のヘム酵素やヘムタンパク質およびその変異体でも報告されている¹³⁻¹⁷。自然界に存在するヘム酵素の中で、比較的高いカタラーゼ活性を示す例として CPO¹³や KatG¹⁴が良く知られているが、これらのヘム酵素の軸配位子は Tyr でなく Cys や His である。これらのことは、カタラーゼ反応を行なうためには、必ずしも軸配位子が Tyr である必要はないことを示している。しかし、これらの酵素が過酸化水素を分解するカタラーゼ活性をカタラーゼ自身と比較すると、圧倒的にカタラーゼの酵素活性が高く（馬肝臓カタラーゼ、KatG および CPO のカタラーゼ活性の k_{cat} はそれぞれ 3.0×10^7 , 1.0×10^4 , $1.5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ ）^{14,18,19}、Tyr が反応に及ぼす影響を示唆していると考えられる。

前章で述べたように、カタラーゼ反応における遠位側の一般酸塩基触媒である His の機能を Mb の変異体を用いたカタラーゼモデルの反応から検討した。その結果、この一般酸塩基触媒は過酸化水素からのプロトン引き抜きを触媒し、カタラーゼ反応のエネルギー障壁を下げ、反応を円滑に進めるという重要な役割を果たしていることを同位体効果で示した。一方、一般酸塩基触媒を持たない Mb 変異体の場合には、cpd I のオキソ酸素による過酸化水素からの水素原子 (H) の引き抜きによりカタラーゼ反応が進行することが同時に明らかとなった。このように、Mb の変異体はペルオキシダーゼやカタラーゼの反応機構の検討を行なう良いモデルになることが示された。このことは、ヘム遠位側の機能の解析だけでなく、近位側の構造と機能発現の解析にも有効な手段であると考えられる。

以上のことから、本章では、カタラーゼと同じように軸配位子が α -ヘリックスの中程に存在する Mb の変異体の軸配位子を Tyr に置換し、カタラーゼモデルタンパク質を作成した。軸配位子である Tyr のフェノレート酸素に対して水素結合の導入を試み、可視吸収スペクトル、EPR、ラマン分光により水素結合の有無の検討を行なった。過酸化水素と Mb 変異体の反応による酸素の生成、ABTS の酸化反応を行ない、mCPBA と Mb 変異体の反応を可視スペクトルの変化として測定し、反応サイクル中における水素結合の効果を検討した。

3.2 実験

Mb のデザイン

本研究では、カタラーゼのヘム近位側の構造を基に Mb 変異体のデザインを行なった。*Micrococcus lysodeikticus* 由来のカタラーゼ (MLC) を例にとると、軸配位子である Tyr343 と水素結合しているアミノ酸残基 (Arg339) は 4 残基離れたところに存在し、1 本の α -ヘリックス上に存在している⁷。カタラーゼに対応するように、Mb も軸配位子は α -ヘリックス上に存在している (図 3-2)²⁰。そこで、ヘム遠位側の構造は mCPBA と Mb 変異体との反応により生成した cpd I が最も安定に存在する H64A Mb を参考に設計を行ない、Mb の軸配位子である His93 を Tyr に変え、そこから 4 残基離れた Leu89 を Gln や Arg に置換した変異体を作成した。Gln と Tyr の水素結合ではアミドプロトンとフェノレートの

酸素との間に水素結合の形成を、Arg と Tyr の水素結合ではカタラーゼと同様に Arg のカチオンとマイナス性を帯びているフェノレートの酸素との間のイオン的な水素結合の形成を期待し、それぞれ H64A/L89Q/H93Y と H64A/L89R/H93Y Mb の設計を行なった。また、水素結合を形成しないように Leu89 をそのまま残した H64A/H93Y Mb の作成も行なった。(図 3-2)

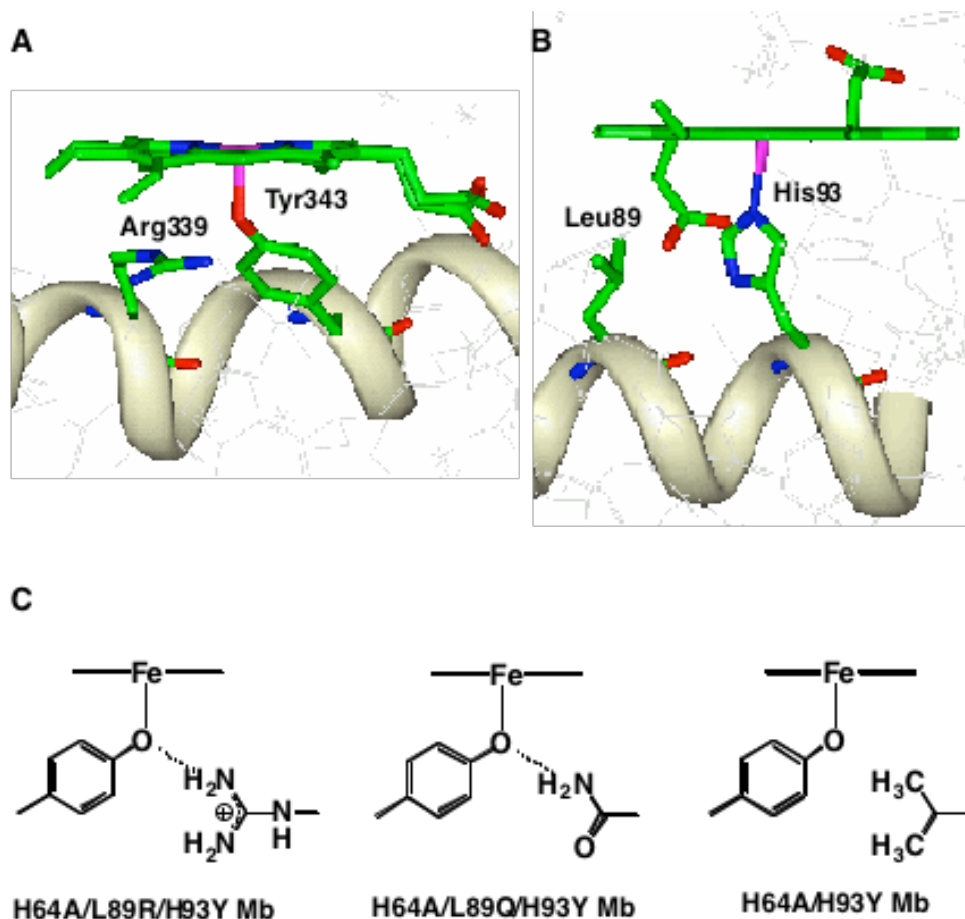


図 3-2. カタラーゼの近位側構造 (A)、Mb の近位側構造 (B) 及び設計した 3 つの Mb デザイン (C)。

試薬

標準的な試薬は和光純薬とナカライテスクから購入した。mCPBA はナカライテスクで購入し、渡辺らの方法で精製を行った²¹。反応に使用する過酸の濃度は、過剰に存在するヨウ化カリウム中で HRP が触媒する I⁻ の酸化生成物である I₃⁻ ($\epsilon_{535} = 2.62 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) の濃度を測定することで決定した^{22,23}。

MLC はナガセケムテックスから購入した。MLC は、緩衝溶液に溶解後、ゲル濾過クロマトグラフィーにより精製し、モル吸光係数 $\epsilon_{406} = 1.03 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ から濃度を決定した²⁴。

Mb 変異体の発現系の作成

H64A/L89R/H93Y, H64A/L89Q/H93Y, H64A/H93Y Mb は、松井らが作成した H64A SW Mb の発現用ベクターを使用し²⁵、部位特異的遺伝子変換を行うことで作成した。具体的には、H64A/H93Y Mb の場合、pUC19 (TAKARA) のマルチクローニングサイトに H64A SW Mb の遺伝子の入ったプラスミドを用い、His93Tyr をコードしたプライマー (センス鎖 : GCAATCGTACGC TACTA, アンチセンス鎖 : TAGTAGCGTACGATTGC) をデザインした。このプライマーおよびプラスミドを用い、ポリメラーゼチェーン反応 (PCR) を行ない、H64A/H93Y Mb の遺伝子を作成した。さらに、ベクターの pUC19 と作成した遺伝子を *KpnI* (TAKARA) および *PstI* (TAKARA) を用いて制限酵素消化後、ライゲーションを行なう事で pUC19 のマルチクローニングサイトに H64A/H93Y Mb の遺伝子を挿入した。ライゲーションは Ligation High (TOYOBO) を用い、一晚以上 16 °C で静置して行ない、H64A/H93Y Mb のプラスミドを作成した。作成したプラスミドは塩化ルビジウム法によって調整された TB I 大腸菌株のコンピテントセルに対し、形質転換を行なった。形質転換後、プレートに現れたコロニーを幾つか取り出し、培養後、パーマネントセルおよびプラスミドの回収を行なった。パーマネントセルは、培養した大腸菌 (700 μL) にジメチルスルホキシド (70 μL) を加え、直ちに液体窒素で急冷することで作成し、-80 °C で保存した。遺伝子配列の確認は回収したプラスミドを用い ABI PRISM[®] 310 (Applied Biosystems) で同定を行なった。H64A/L89R/H93Y と H64A/L89Q/H93Y Mb は H64A/H93Y Mb のプラスミドを用い、H64A/H93Y Mb と同様の方法で発現系を作成し、遺伝子配列の確認を行なった。Leu89Gln をコードしたプライマー (センス鎖 : TCAAACCGCAGGCGCAATCG, アンチセンス鎖 : CGATTGCGCCT GCGGTTTGA) および Leu89Arg をコードしたプライマー (センス鎖 : GCTGAGCT CAAACCGCGGGCGCAATCG, アンチセンス鎖 : CGATTGCGCCCGCGGTTTGA) は His93Tyr にプライマーがかからないようにデザインを行なった。

Mb 変異体の発現および精製

変異体の発現および精製は Springer らおよび Sligar らの方法を改良して行った^{26,27}。具体的には、-80 °C で保存してあるパーマネントセルから、白金耳で微量の菌体を取り出し、LB プレートに蒔いた後、37 °C で 14 時間以上、静置し、単一コロニーが出来ているのを確認した。生成したコロニーを LB 培地に移し、37 °C で合計約 21 時間、培養した。集菌は遠心分離を用いて行なった。溶菌はリゾチームおよび超音波によって行ない、続いて、50~90%の硫酸分画を得た。これを 15 mM リン酸カリウム緩衝液 pH 6.0 で 8 時間透析後、CM52 イオン交換クロマトグラフィーにより分離を行ない、アポ体のミオグロビン変異体を回収した。CM52 イオン交換クロマトグラフィーは 15 mM リン酸カリウム緩衝液 pH 6.0 と 100 mM リン酸カリウム緩衝液 pH 9.0 のグラジエントをかけることで溶出を行なった。目的とするアポ体のミオグロビン変異体は、まず 280 nm の吸収からミオグロビンの総量を計算した。このミオグロビン溶液を 100 mM KCl, 10% グリセロール存在下の 100 mM リン酸カリウム緩衝液 pH 9.0 に調整し、これを約 10 mL になるように濃縮した。この溶液に 1.2 当量のヘミンのアルカリ溶液を滴下し、4 °C で 8 時間以上攪拌することでヘム入れを行なった。余分なヘミンや塩等を取り除く為に 1 mM EDTA 存在下の 100 mM リン酸カリウム緩衝液 pH 9.0 で平衡化した G25 ゲル濾過クロマトグラフィーで精製後、更に Superdex G75 ゲル濾過クロマトグラフィーで最終精製を行なった。ゲル濾過クロマトグラフィーの移動相には 100 mM リン酸カリウム緩衝液 pH 9.0 を使用した。Mb 変異体の濃度はピリジンヘモクロム法で決定した²⁸。

可視吸収スペクトル

Fe^{III} 状態の可視吸収スペクトルは、UV-2400 spectrophotometer (島津製作所) を用いて測定した。Mb の変異体は 100 mM リン酸カリウム緩衝液中 (pH 9.0)、室温で測定を行ない、MLC は 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液中 (pH 7.0)、室温で行なった。Mb の変異体の Fe^{II} 状態および CO 体の可視吸収スペクトルの測定も Fe^{III} 状態と同条件で行なった。Fe^{II} 状態は Fe^{III} 状態の試料に微量の Na₂S₂O₄ を加え、反応溶液が黄色に変色したことを確認後、可視吸収スペクトルの測定を行なった。CO 体は Fe^{II} 状態の試料に CO ガスを反応させ、反応後、直ちに可視吸収スペクトルの測定を行なった。

EPR スペクトル

EPR スペクトルは E500 X-band CW-EPR (Bruker) を用い、クライオスタット (ITC503, Oxford) で 5K とし、100 mM リン酸カリウム緩衝液中 (pH 9.0) で観測した。試料の濃度は 200 μ M で測定を行なった。rhombicity は Peisach らの方法で計算した²⁹。

ラマンスペクトル

ラマンスペクトルは 100 mM リン酸カリウム緩衝液中 (pH 9.0)、室温で測定を行った。励起源として 488 nm および 406.7 nm の波長のレーザーを用い、レーザー強度は 50 mW で行なった。試料の濃度は、488 nm 励起波長の測定では 200 μ M、406.7 nm では 25 μ M の濃度で測定を行なった。

酸素発生

酸素の生成は、酸素電極 (OD MRTER TD - 51, 東興化学研究所) を用いて確認、定量を行った。Mb の変異体 (10 μ M) の 50 mM リン酸ナトリウム緩衝溶液 (pH 7.5) に対し、5 °C で過酸化水素 (1 mM) を混合後に反応溶液中の酸素量の測定を行い、生成した酸素の経時変化に基づき初速度法を用い速度を決定した。

Mb 変異体による 2,2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (ABTS) の酸化反応

Mb 変異体による ABTS の一電子酸化反応は、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液中 (pH 7.0)、5°C で RSP-601 stopped-flow rapid-scan spectrometer (ユニソク) を用いて観測を行った。ABTS カチオンラジカルの生成速度は Mb 由来の吸収がほとんどない 730 nm ($\epsilon_{730} = 1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) における吸収の増加を測定して求めた。スペクトルの測定条件は、最終 1 mM の ABTS と 62.5~1000 μ M の量の過酸化水素を用い、0.5 μ M Mb 変異体と混合することにより反応を開始させ、そのスペクトル変化に基づいて、擬一次反応速度定数をもとめた。二次反応速度定数は測定された擬一次反応速度定数対過酸化水素の濃度をプロットすることで決定した。

Mb 変異体の *m*CPBA による酸化反応

Mb 変異体の *m*CPBA による酸化に伴うスペクトルの変化は、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液中 (pH 7.0)、5°C で SF-43 cryostopped-flow MG 6000 diode array spectrophotometer (HI-TECH Scientific) を用いて測定をおこなった。なお、Mb 変異体は 10 μ M、*m*CPBA は 20 モル当量を用いた。

3.3 結果

可視吸収スペクトル

Mb 変異体および MLC の鉄三価状態の可視吸収スペクトルを図 3-3 に示す。ソーレー帯に大きな変化は見られなかったが、水素結合を導入した変異体は導入しなかった変異体に比べ、600 nm 付近の鉄-ポルフィリンの $p_{\pi}-d_{\pi}$ 電子遷移に基づく電子遷移³⁰が 10 nm ほど長波長側にシフトし、Fe-O (Tyr) の $p_{\pi}-d_{\pi}$ 電子遷移²⁷に帰属される 488 nm 付近の電子遷移吸収帯が 5 nm ほど長波長側にシフトした。また、Mb 変異体の鉄二価状態および CO 体の可視スペクトルの結果も表 3-1 に示した。

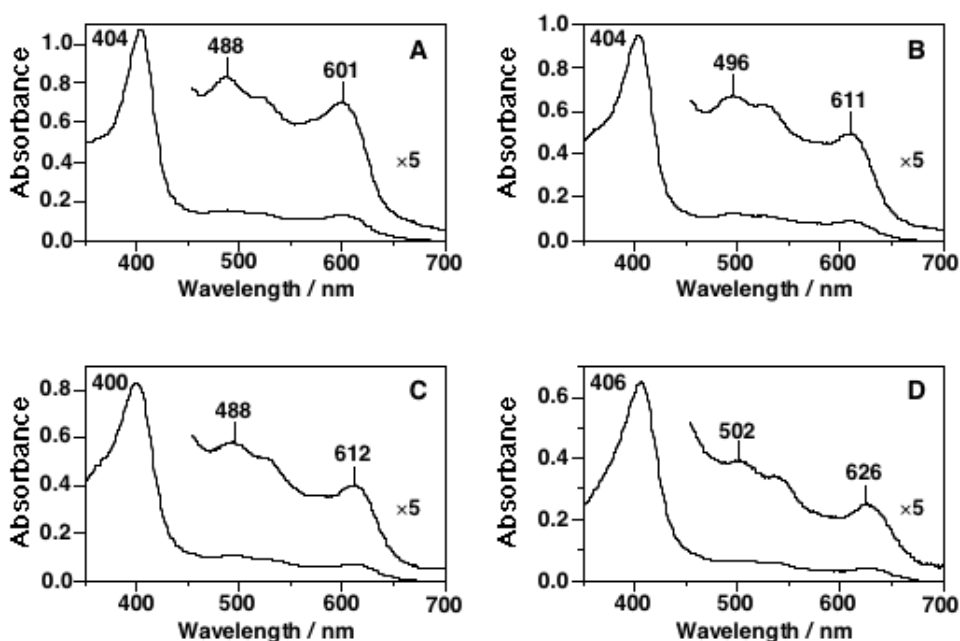


図 3-3. H64A/H93Y (A)、H64A/L89Q/H93Y (B)、H64A/L89R/H93Y Mb (C) および MLC (D) の可視吸収スペクトル。測定条件: Mb の変異体は 100 mM リン酸カリウム緩衝液中 (pH 9.0)、室温。MLC は 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液中 (pH 7.0)、室温。

EPR スペクトル

5 K における Mb 変異体の EPR スペクトルを図 3-4 に示す。g 値は、H64A/L89Q/H93Y Mb で 6.54, 5.99, 5.73, 1.97、H64A/L89R/H93Y Mb で 5.99, 5.88, 1.99、H64A/H93Y Mb で 6.81, 5.99, 5.17, 1.99 を示し、ヘム面に対する鉄のずれの指標である rhombicity はそれぞれ、10.9, 7.5, 0.9 となった (表 3-2)。

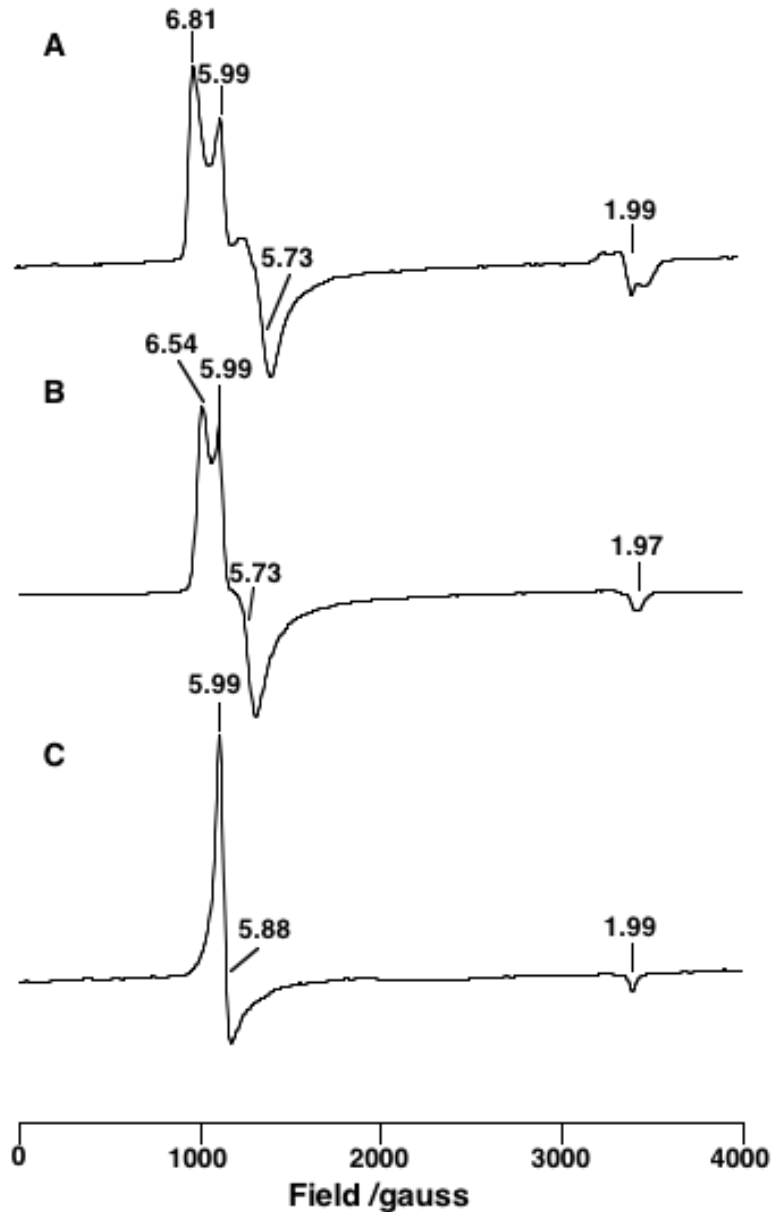


図 3-4. H64A/H93Y (A)、H64A/L89Q/H93Y (B) および H64A/L89R/H93Y Mb (C) の EPR スペクトル。測定条件：100 mM リン酸カリウム緩衝液中 (pH 9.0)、5K。

表 3-1. Mb 変異体の可視吸収スペクトル

Protein	Fe ³⁺			
	Soret		visible	
H64A/H93Y Mb	404	488	524	601
H64A/L89R/H93Y Mb	400	494	529	612
H64A/L89Q/H93Y Mb	404	496	530	611
Protein	Fe ²⁺			
	Soret		visible	
H64A/H93Y Mb	424		568	
H64A/L89R/H93Y Mb	429		560	
H64A/L89Q/H93Y Mb	429		561	
Protein	Fe ²⁺ CO			
	Soret		visible	
H64A/H93Y Mb	420	540		566
H64A/L89R/H93Y Mb	421	539		568
H64A/L89Q/H93Y Mb	421	540		568

測定条件：100 mM リン酸カリウム緩衝液中 (pH 9.0)、室温。

表 3-2. ヘムタンパク質の rhombicity

Protein	rhombicity
ferrimyoglobin	0.8
H64A/L89R/H93Y Mb	0.9
H64A/L89Q/H93Y Mb	7.5
Beef liver catalase (type I)	7.5
H64Y Mb	7.5
H64A/H93Y Mb	10.9
Cytochrome P-450 _{cam}	26.0

Egeberg ら (1990)の表を改変した。

ラマンスペクトル

Mb 変異体のラマンスペクトル (図 3-5) から、488 nm の励起波長による測定では水素結合の Fe-O の結合への影響を検討した。その結果、水素結合の導入により 584 cm⁻¹ 付近の散乱が低波数側にシフトし、その強度が徐々に弱くなるという現象がみられた。また、Fe-ポルフィリン由来の ν_2 のピークが 674 cm⁻¹ に観測された。Mb 変異体については 406.7 nm の励起波長による測定から、ヘム鉄の配位状態を検討した。 ν_3 及び ν_{10} の散乱が 1491 cm⁻¹ 及び 1629 cm⁻¹ にピークがあることから五配位高スピン構造をとっていると結論された。

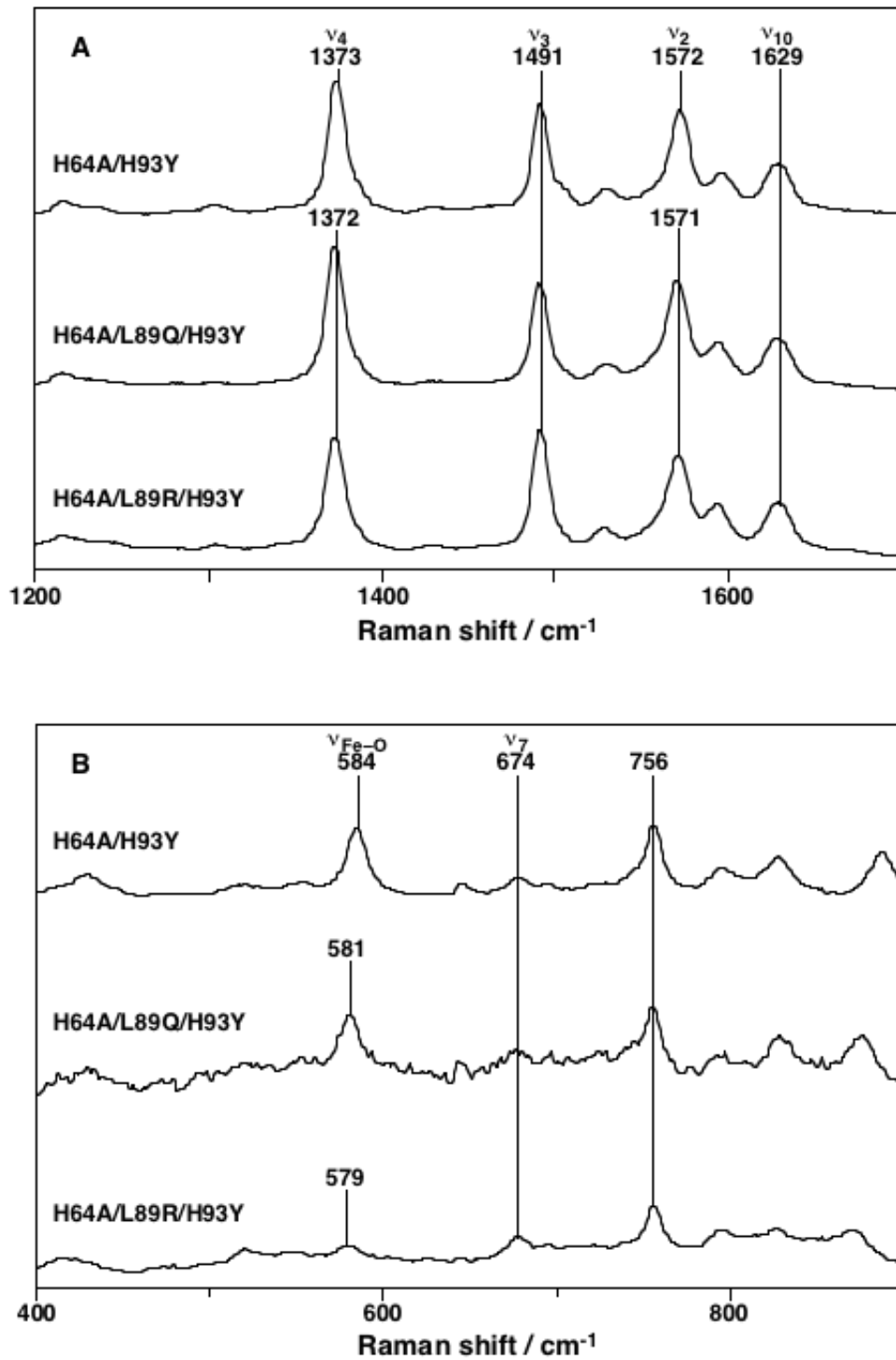


図 3-5. Mb 変異体のラマン分光スペクトル。測定条件：100 mM リン酸カリウム緩衝液中（pH 9.0）、室温。406.7 nm 励起波長（A）。488 nm 励起波長（B）。

酸素発生

Mb 変異体と過酸化水素の反応による酸素生成速度の結果を表 3-3 に示す。H64A/H93Y、H64A/L89Q/H93Y および H64A/L89R/H93Y Mb はそれぞれ 0.23, 0.77, 0.91 の酸素発生 (turnover/min) となり、水素結合を導入することで反応性が 3 ~4 倍向上した。

Mb 変異体による ABTS の酸化反応

酸素発生能が反応サイクル全体のオーバーオール活性を示しているのに対し、ABTS カチオンラジカルの生成速度は、cpd I の生成速度を示している。Mb 変異体による ABTS カチオンラジカルの生成速度はいずれの変異体でも $2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 前後となり 変異体の違いによる優位な差はほとんど見られなかった (表 3-3)。

表 3-3. Mb の変異体と過酸化水素の反応による酸素生成速度と ABTS 酸化反応速度定数

Protein	O ₂ evolution ^a Turnover/min	ABTS oxidation ^b M ⁻¹ s ⁻¹
H64A/H93Y Mb	0.23 ± 0.02	1.94 ± 0.10
H64A/L89Q/H93Y Mb	0.77 ± 0.01	2.24 ± 0.01
H64A/L89R/H93Y Mb	0.91 ± 0.08	2.05 ± 0.02

a : 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) 中、5°C で測定を行なった。

b : 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 中、5°C で測定を行なった。

mCPBA による Mb 変異体の酸化反応

mCPBA による Mb 変異体の酸化に伴うスペクトル変化を図 3-6 に示す。水素結合を導入していない変異体である H64A/H93Y Mb ではスペクトルの変化はほとんど見られなかったのに対し、水素結合を導入した H64A/L89Q/H93Y Mb、H64A/L89R/H93Y Mb ではいずれも休止状態とは異なる状態へのスペクトル変化の後、ヘムが壊れていく現象が見られた。また、Gln を導入したものと Arg を導入した変異体では Arg を加えた変異体の方がより速やかにスペクトルの変化が起こった。

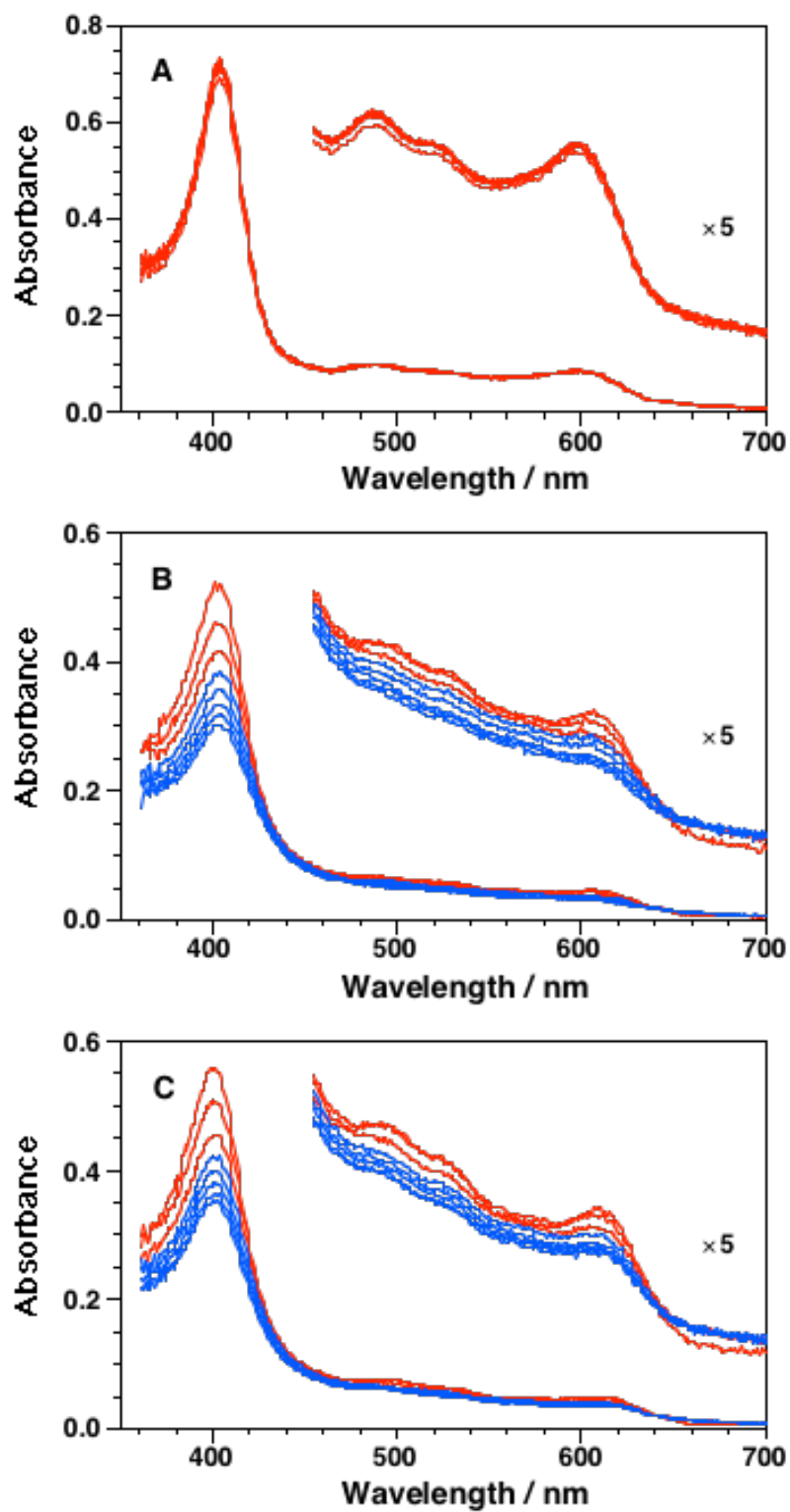


図 3-6. H64A/H93Y (A)、H64A/L89Q/H93Y (B) および H64A/L89R/H93Y Mb (C) と 20 モル当量 *m*CPBA の反応によるラピットスキャン可視吸収スペクトルの変化。測定条件：50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 中、5°C。

3.4 考察

Mb 変異体の水素結合の形成

Fe^{III} 状態の可視吸収スペクトルの比較から、水素結合を導入した変異体である H64A/L89Q/H93Y、H64A/L89R/H93Y Mb は H64A/H93Y に比べ 600 nm および 488 nm 付近の吸収で 10 nm、5 nm の短波長シフトが確認された (図 3-3, 表 3-1)。600 nm の吸収帯は鉄-ポルフィリンの $p_{\sigma}-d_{\sigma}$ 電子遷移吸収帯であり、488 nm の吸収帯は鉄-フェノレートの $p_{\sigma}-d_{\sigma}$ 電子遷移吸収帯であることがわかっている^{27,30}。このことから、Mb 変異体の Leu89 への Gln や Arg の導入により水素結合が形成され、鉄原子に対し影響を及ぼしていると考えられる。また、今回作成した 3 つの変異体はいずれも Na₂S₂O₄ と反応して Fe^{II} 状態を生成するものの、CO を付加することによりヘミンの吸収が観測されることから、Fe^{II} 状態ではフェノレートはヘムに配位していないことがわかった。

図 3-4 に EPR の結果を示した。カタラーゼは pH 7.0、2K で g 値が 6.54, 5.99, 5.73, 1.97 のシグナルを示す。今回作成した Mb 変異体の g 値は H64A/H93Y が 6.81, 5.99, 5.17, 1.99、H64A/L89Q/H93Y が 6.54, 5.99, 5.73, 1.97、H64A/L89R/H93Y が 5.99, 5.88, 1.99 にシグナルを示した。ヘムが周辺の環境の影響によりヘムがどれだけ歪んでいるのかを示す指標である rhombicity は、牛肝臓由来のカタラーゼが 7.5 なのに対し、H64A/H93Y、H64A/L89Q/H93Y および H64A/L89R/H93Y Mb でそれぞれ、10.9, 7.5, 0.9 となり、H64A/L89Q/H93Y Mb は牛肝臓由来のカタラーゼとよい一致を示した。また、H64A/L89R/H93Y Mb では rhombicity が 0.9 と非常に小さい値となり、野生型 Mb 近い値を示すことから、ヘム鉄はヘム面に対しほとんど平面になっていると考えられる (表 3-2)^{27,29}。従って、これらの変異体のヘム鉄は、高スピン状態を保ち、水素結合を導入することによりヘムの歪みが小さくなっていることが考えられ、水素結合の導入によって Fe-O の距離が伸びたと考えられる (図 3-7)。

ラマンスペクトルの測定では、ヘムの情報を得るための 406.7 nm の励起波長による測定と、鉄と Tyr の結合に対する情報を得るために 488 nm の励起波長による測定を行なった。ヘムタンパク質では、ラマンスペクトルで ν_b および ν_{10} のピークが 1480~1483、1610~1620 cm⁻¹ に観測されると 6 配位の Fe^{III} 高スピン構造を、1490~1493、1628~1630 cm⁻¹ に観測されると 5 配位の Fe^{III} 高スピン構造をとっている事が知られている³¹⁻³⁴。今回作成した 3 つの変異体、H64A/H93Y、

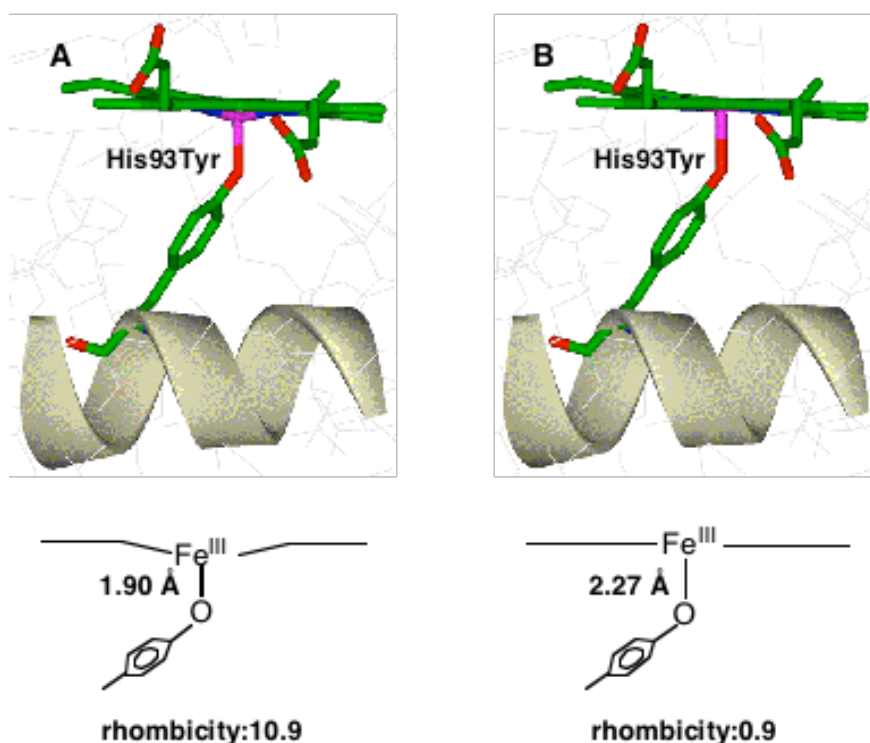


図 3-7. ヘム構造と rhombicity の関係。馬心臓 H93Y Mb 変異体の結晶構造と模式図 (A)。馬心臓 H93Y Mb 変異体のヘム鉄をヘム面まで引き上げた推定構造と模式図 (B)。

H64A/L89Q/H93Y、H64D/L89R/H93Y Mb は、406.7 nm 励起波長による測定で 1491 cm^{-1} と 1629 cm^{-1} にそれぞれ ν_3 および ν_{10} のピークが観測されたことから 5 配位高スピン構造をとっている事がわかった。鉄-フェノレートの $p_{\pi}-d_{\pi}$ 電子遷移吸収帯である 488 nm の励起波長を用い測定を行なうことで、 $580\sim 600\text{ cm}^{-1}$ にヘムに対する Tyr の配位に起因する $\nu_{\text{Fe-O}}$ のピークが観測されることが知られている^{27,33-36}。このピークは H64A/H93Y Mb では 584 cm^{-1} に現われたが、H64A/L89Q/H93Y Mb では 581 cm^{-1} 、H64A/L89R/H93Y Mb では 579 cm^{-1} にシフトした。同時に、このピークは低波数側にシフトするにつれてピーク強度が減少する傾向が見られた。 $\nu_{\text{Fe-O}}$ のピークが低波数側にシフトしていることから Fe-O の結合が弱くなっていると考えられ、このピーク強度の減少から Fe-O 間の距離が伸びていると考えられる。

可視吸収スペクトル、EPR スペクトル、ラマンスペクトルはいずれも作成した変異体が 5 配位高スピン構造をとっていることを示している。EPR スペクトル、ラマンスペクトルでは H64A/H93Y Mb の Leu89 を Gln と Arg に水素結合を導入することにより、Fe-O 間の距離が伸びることが示唆された。この現象は

モデル錯体でも確認が行なわれている¹⁰。例えば、フェノレート配位子を持つ錯体である、Fe^{III}(OEP)(PhO) 錯体の場合、ヘム鉄に配位している酸素に対し NH…O 水素結合を入れることで Fe–O の距離は 1.837 Å から 1.883 Å に変化し、0.046 Å に伸びている。以上のことから、H64A/L89Q/H93Y および H64A/L89R/H93Y Mb はともに軸配位子である 93 位の Tyr の酸素に対して、89 位に導入した Gln や Arg から水素結合が形成されていると考えられる。

酸化反応における水素結合の効果

軸配位子に対する水素結合の導入による cpd I 生成反応およびカタラーゼ反応への影響を検討するために、過酸化水素と Mb 変異体の反応によって生成する酸素生成速度の決定、過酸化水素と Mb 変異体の反応によって得られる cpd I が ABTS と反応して生成する ABTS カチオンラジカルの生成速度の決定、さらに Mb 変異体と *m*CPBA の反応によるスペクトルの変化の測定を行なった。

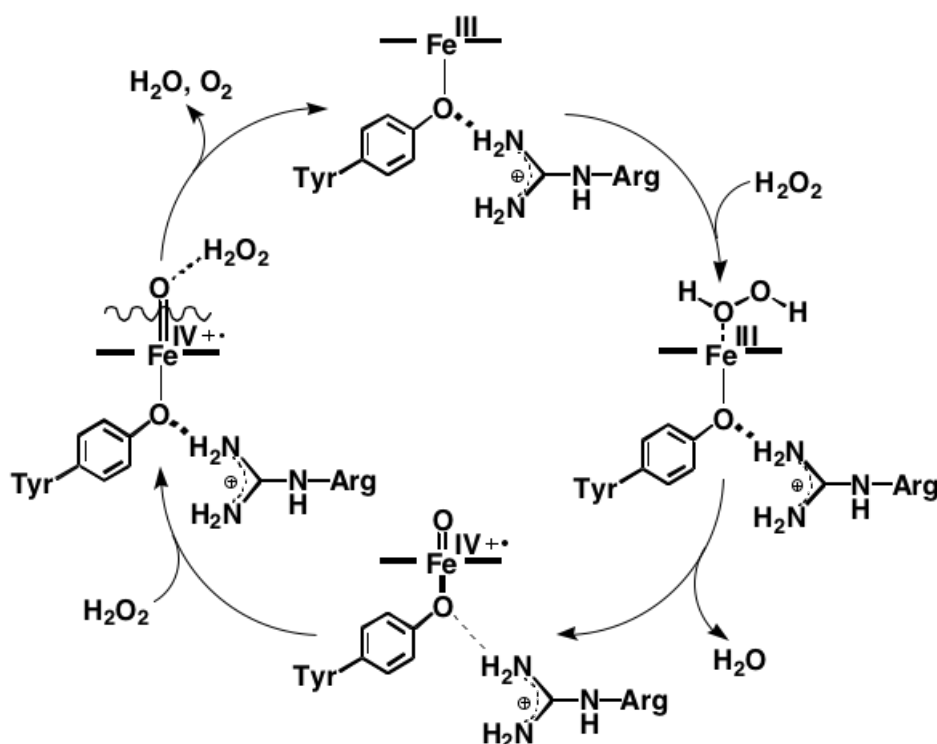
過酸化水素と Mb 変異体の反応による酸素生成量の測定の結果、H64A/H93Y、H64A/L89Q/H93Y、H64A/L89R/H93Y Mb はそれぞれ、0.23、0.77、0.91 turnover/min の酸素生成活性を有していることがわかった。水素結合を入れなかった H64A/H93Y Mb に対し、水素結合を導入した H64A/L89Q/H93Y および H64A/L89R/H93Y Mb は 3~4 倍の酸素生成能の向上が見られた。

過酸化水素と Mb 変異体の反応によって生成する cpd I は直ちに ABTS を酸化する事がわかっている。従って、cpd I の生成速度は ABTS のカチオンラジカルの生成速度から求められ、H64A/H93Y、H64A/L89Q/H93Y、H64A/L89R/H93Y Mb でそれぞれ 1.94, 2.05, 2.24 M⁻¹s⁻¹ となり、差がほとんど見られないことから、cpd I の生成にはヘム鉄に配位している酸素への水素結合はほとんど影響していないことがわかった。

Mb 変異体と 20 モル当量の *m*CPBA を反応させると、軸配位子に対し水素結合を導入しなかった H64A/H93Y Mb ではスペクトル変化がほとんど見られなかったが、軸配位子に対し水素結合を導入した H64A/L89Q/H93Y および H64A/L89R/H93Y Mb はタンパク質が最終的には変性してしまうものの、スペクトルの変化が確認された。これは、本来、ポルフィリン配位子の-2 価の電荷と Fe^{III} の+3 価の電荷の合計で+1 価の電荷を持つヘム（鉄-ポルフィリン錯体）に対し、-1 価である軸配位子の Tyr が配位しているため、H64A/H93Y Mb では配位子を含めた全電荷の総計が 0 価になり、反応が進行しづらい。しかし、軸

配位子に対し水素結合を導入することにより、Tyr の-1 価性が減少し、へム鉄がわずかながら+電荷を帯びることにより、*m*CPBA との反応が促進され、スペクトルの変化が現われると考えられる。

以上の結果をまとめると、Mb 変異体と過酸化水素の反応サイクルにおいて、全体では軸配位子への水素結合賦与の効果が見られるのに対し、cpd I の生成では違いが見られないことから、cpd I と過酸化水素の反応過程に対し、軸配位子への水素結合の効果が現われると考えられる。また、*m*CPBA と Mb 変異体の反応に伴うスペクトル変化から、過酸化水素のへム鉄への配位過程でも軸配位子に対する水素結合の影響が働いていると考えられる。これらのことから Mb 変異体が過酸化水素を水と酸素に分解するカタラーゼ反応に対する水素結合の役割は、まず、鉄三価のへムと過酸化水素が反応する際、水素結合を形成することで過酸化水素の配位を容易にし、cpd I を生成する。Cpd I の生成と同時に水素結合が弱まり Fe-O 距離が短くなり、cpd I が安定化する。そして、二分子目の過酸化水素がオキシ酸素と相互作用すると同時に水素結合が再び強くなり、cpd I を活性化して過酸化水素を酸素分子へと酸化して、へムは鉄三価に戻ると考えられる (スキーム 3-1)。



スキーム 3-1. H64A/L89R/H93Y Mb と過酸化水素の反応の推定機構

カタラーゼの結晶構造に基づく水素結合の役割の考察

Proteus mirabilis 由来のカタラーゼの休止状態と cpd I の結晶構造を図 3-8 に示す^{9,8}。結晶構造から、休止状態と cpd I の Tyr の酸素と Arg の窒素の距離はそれぞれ 2.7 Å と 2.9 Å となり、ヘム鉄が Fe^{IV}=O 状態を取る事によって水素結合の距離が伸びていることがわかる。また、休止状態での軸配位子の Tyr の酸素とヘム鉄間の距離は 2.1 Å であり、一方、cpd I では 1.8 Å と 0.3 Å 短くなっていることがわかる。

この結果は、Mb の変異体で示された現象がカタラーゼでも起きていることを示していると考えられる。すなわち、Mb 変異体の Tyr93 の酸素と Arg89 もしくは Gln89 の窒素の間に水素結合を導入した場合には、分光学的な測定から軸配位子の Tyr93 の酸素とヘム鉄の距離が Fe^{IV}=O に比べて Fe^{III} 状態では伸びていると考えられる。このように、カタラーゼが行なうカタラーゼ反応は Mb の変異体で示されたスキーム 3-1 と同様の反応機構で反応が進行していることが考えられる。

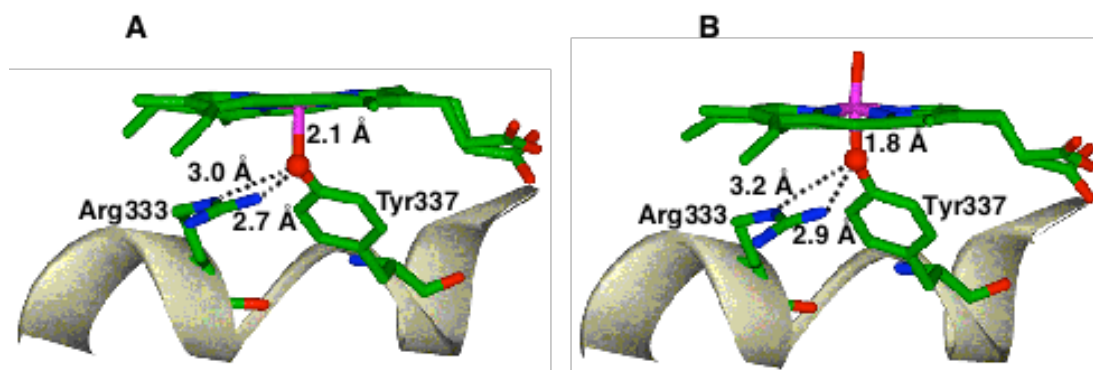


図 3-8. 野生型 *Proteus mirabilis* 由来のカタラーゼのヘム近位側結晶構造。休止状態 (A)。cpd I (B)。

まとめ

本章では Mb の変異体を用い、カタラーゼ反応における軸配位子に対する水素結合の効果を検討した。カタラーゼのヘム近位側構造を参考に設計した H64A/L89Q/H93Y および H64A/L89R/H93Y Mb は、分光学的測定から水素結合の形成と、水素結合に伴うヘム鉄と軸配位子である Tyr の酸素原子の距離の伸長が確認された。また、Mb の変異体と過酸化水素の反応による酸素生成反応、ABTS の酸化反応および Mb の変異体と *m*CPBA との反応によるスペクトル変化の測定から各反応素過程を検証し、基質としての過酸化水素の取込みおよび

cpd I との反応過程に対し、軸配位子の水素結合の有無により反応性に大きな違いが見られた。Mb 変異体による過酸化水素の酸素分子への酸化分解過程に対する水素結合の作用は、1) 鉄三価のヘムと過酸化水素の反応時に、水素結合を形成することで過酸化水素の配位を容易にし、cpd I が生成する。2) Cpd I の生成と同時に水素結合が弱まり Fe-O 距離が短くなり、cpd I が安定化する。そして、3) 二分子目の過酸化水素がオキシ酸素と相互作用すると同時に水素結合が再び強くなり、cpd I を活性化して過酸化水素と反応し、水と酸素分子を生成してヘムを鉄三価に戻すことであると考えられる。野生型 *Proteus mirabilis* 由来のカタラーゼの結晶構造から、カタラーゼでも同様の反応機構で反応が進行していると結論した。

- (1) Gajhede, M.; Schuller, D. J.; Henriksen, A.; Smith, A. T.; Poulos, T. L. *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 1032-1038.
- (2) Finzel, B. C.; Poulos, T. L.; Kraut, J. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 3027-3036.
- (3) Murshudov, G.; Melik-Adamyanyan, W.; Grebenko, A.; Barynin, V.; Vagin, A.; Vainshtein, B.; Dauter, Z.; Wilson, K. *FEBS Lett* **1992**, *312*, 127-131.
- (4) Sundaramoorthy, M.; Terner, J.; Poulos, T. L. *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 461-473.
- (5) Schlichting, I.; Berendzen, J.; Chu, K.; Stock, A. M.; Maves, S. A.; Benson, D. E.; Sweet, B. M.; Ringe, D.; Petsko, G. A.; Sligar, S. G. *Science* **2000**, *287*, 1615-1622.
- (6) Carpena, X.; Loprasert, S.; Mongkolsuk, S.; Switala, J.; Loewen, P. C.; Fita, I. *J Mol Biol* **2003**, *327*, 475-489.
- (7) Murshudov, G. N.; Grebenko, A. I.; Brannigan, J. A.; Antson, A. A.; Barynin, V. V.; Dodson, G. G.; Dauter, Z.; Wilson, K. S.; Melik-Adamyanyan, W. R. *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* **2002**, *58*, 1972-1982.
- (8) Gouet, P.; Jouve, H. M.; Williams, P. A.; Andersson, I.; Andreoletti, P.; Nussaume, L.; Hajdu, J. *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 951-956.
- (9) Gouet, P.; Jouve, H. M.; Dideberg, O. *J Mol Biol* **1995**, *249*, 933-954.
- (10) Yanada, Y. *Doctor of Philosophy* **1998**.
- (11) Poulos, T. L. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1996**, *1*, 356-359.
- (12) Ueno, T.; Kousumi, Y.; Yoshizawa-Kumagaye, K.; Nakajima, K.; Ueyama, N.; Okamura, T.; Nakamura, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12264-12273.
- (13) Thomas, J. A.; Morris, D. R.; Hager, L. P. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 3219.
- (14) Nagy, J. M.; Cass, A. E. G.; Brown, K. A. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 31265-31271.
- (15) Matsui, T.; Ozaki, S.; Liong, E.; Phillips, G. N.; Watanabe, Y. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 2838-2844.
- (16) Hernandez-Ruiz, J.; Arnao, M. B.; Hiner, A. N. P.; Garcia-Canovas, F.; Acosta, M. *Biochem. J.* **2001**, *354*, 107-114.
- (17) Kettle, A. J.; Winterbourn, C. C. *Biochemistry* **2001**, *40*, 10204-10212.
- (18) Johnsson, K.; Froland, W. A.; Schultz, P. G. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 2834-2840.
- (19) Rai, G. P.; Sakai, S.; Florez, A. M.; Mogollon, L.; Hager, L. P. *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 638-645.
- (20) Urayama, P.; Phillips, G. N.; Gruner, S. M. *Structure* **2002**, *10*, 51-60.

- (21) Groves, J. T.; Watanabe, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7834-7836.
- (22) Cotton, M. L.; Dunford, H. B. *Canadian Journal of Chemistry.* **1973**, *51*, 582-587.
- (23) Schowen, K. B.; Schowen, R. L. *Methods Enzymol.* **1982**, *87*, 551-606.
- (24) Brill, A. S.; Williams, R. J. P. *Biochem. J.* **1961**, *78*, 253-262.
- (25) Matsui, T.; Ozaki, S.-i.; Watanabe, Y. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32735-32738.
- (26) Springer, B. A.; Egeberg, K. D.; Sligar, S. G.; Rohlfs, R. J.; Mathews, A. J.; Olson, J. S. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 3057-3060.
- (27) Egeberg, K. D.; Springer, B. A.; Martinis, S. A.; Sligar, S. G. *Biochemistry* **1990**, *29*, 9783-9791.
- (28) Morrison, M.; Horie, S. *Analytical Biochemistry* **1965**, *12*, 77-82.
- (29) Peisach, j.; Blumberg, W. E.; Ogawa, S.; Rachmilewitz, E. A.; Oltzik, R. *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 3342-3355.
- (30) Roach, M. P.; Puspita, W. J.; Watanabe, Y. *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *81*, 173-182.
- (31) Spiro, T. G.; Stong, J. D.; Stein, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 2648-2655.
- (32) Kitagawa, T.; Kyogoku, Y.; Iizuka, T.; Saito, M. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 5169-5173.
- (33) Nagai, M.; Yoneyama, Y.; Kitagawa, T. *Biochemistry* **1989**, *28*, 2418-2422.
- (34) Adachi, S.; Nagano, S.; Ishimori, K.; Watanabe, Y.; Morishima, I.; Egawa, T.; Kitagawa, T.; Makino, R. *Biochemistry* **1993**, *32*, 241-252.
- (35) Sharma, K. D.; Andersson, L. A.; Loehr, T. M.; Turner, J.; Goff, H. M. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 12772-12779.
- (36) Chuang, W. J.; Johnson, S.; Vanwart, H. E. *J. Inorg. Biochem.* **1988**, *34*, 201-219.

第四章

□-メチルベンジルアミンを用いたミオグロビン変異体による チオアニソール不斉酸化反応の機構解明

J. Am. Chem. Soc. **2002**, *124*, 8506-8507

Asymmetric Sulfoxidation and Amine Binding by H64D/V68A and H64D/V68S Mb:
Mechanistic Insight into the Chiral Discrimination Step

Shigeru Kato, Hui-Jun Yang, Takafumi Ueno, Shin-ichi Ozaki, George N. Phillips, Jr.,
Shunichi Fukuzumi and Yoshihito Watanabe

4.1 序論

基質の固定および配向の制御は、酵素反応の最大の特徴である基質特異性のために非常に重要である。ヘム酵素における代表的な例として、基質の固定および配向を制御し、部位特異的に *d*-カンファーの水酸化反応を行なうシトクロム P450cam (P450cam) がある。P450cam はヘム遠位側に存在する Tyr96 と水素結合し、Val247 および Val295 と疎水性相互作用することで *d*-カンファーを固定化し (図 4-1)、部位特異的な水酸化反応によって、5-*exo*-ヒドロキシカンファーを生成する¹。また、クロロペルオキシダーゼ (CPO) は酸化剤に過酸化水素を用いることでチオアニソールの酸化反応を 98 %*ee*(*R*)以上の高い不斉選択性で与える^{2,3,4,5}。このような CPO の不斉認識機構は結晶構造 (図 4-2A) を用いたベンジルアルコールや *cis*- α -メチルスチレン複合体のエネルギー最小化

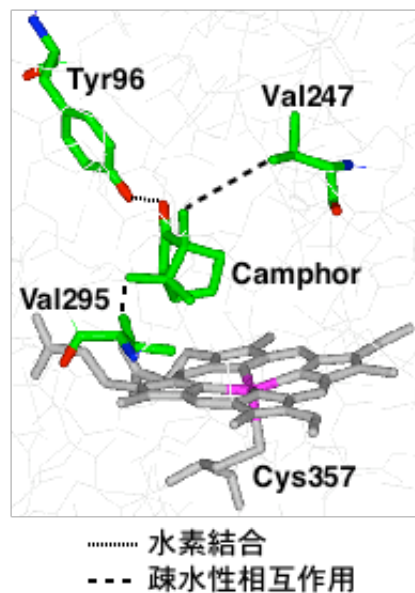


図 4-1. P450cam の活性中心構造。

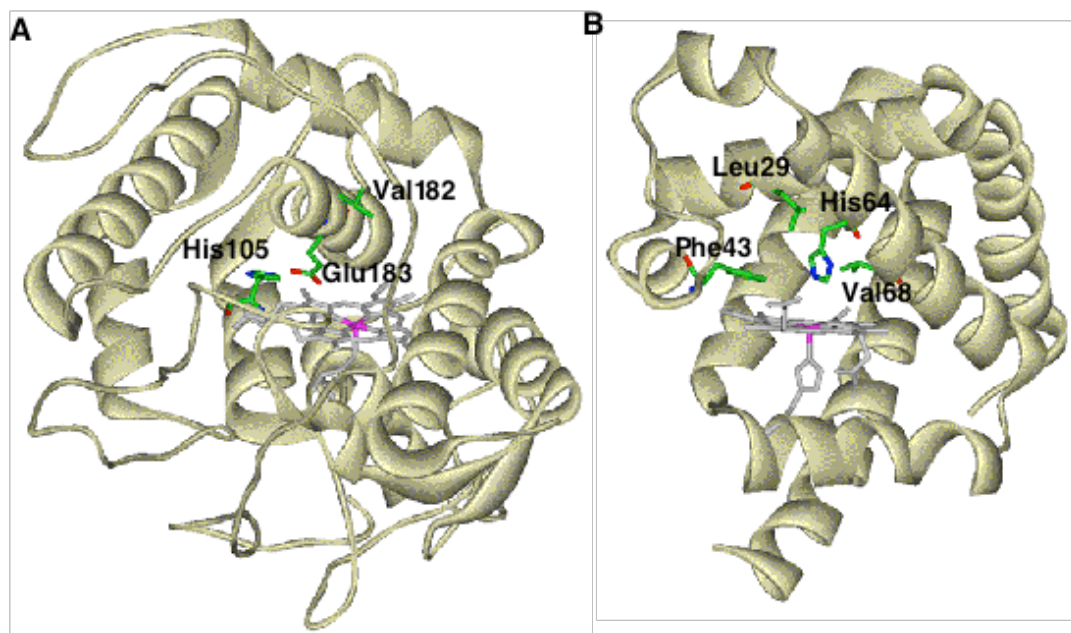


図 4-2. CPO (A) と SW Mb (B) の結晶構造。

計算の研究^{6,7}から基質の取込みで制御されていると推定された。例として CPO へのベンジルアルコールの配位を示すとベンジルアルコールの芳香環および水酸基がそれぞれ CPO の Val182 のメチル基および Glu183 との間で相互作用し、固定化されていると推定されたことから、ベンジルアルコールの cpd I による酸化はベンジルアルコールの取込み段階で制御されることで(S)-[α -D]ベンジルアルコールの酸化反応では97%以上のPhCHOが生成すると考えられている⁶(図4-3)。CPO によるチオアニソールの酸化反応でもベンジルアルコールの酸化反応と同様に考えることが可能である。つまり、チオアニソールの取込み段階で方向が制御され、98%ee(R)という高い不斉選択性が得られると考えられる。しかし、基質を取り込んだ結晶が得られるケースは稀であり、計算による推定構造は貴重な情報を与えるが推定の域を出ることはできない。従って、不斉を認識した反応の遷移状態のエネルギーを評価するための何らかの方法論の開拓が望まれている。

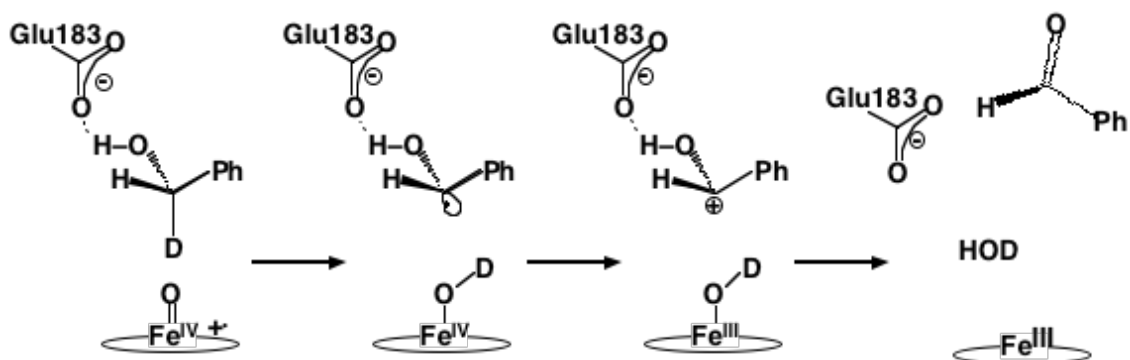


図4-3. CPOによる(S)-[α -D]ベンジルアルコールの酸化反応の推定機構

一方、ミオグロビン (Mb) (図 4-2B) は、ヘム遠位側のアミノ酸残基に変異を加えることで、過酸存在下で、スルホキシ化やエポキシ化をはじめとする様々な酸化反応を触媒することが知られている⁸⁻¹⁵。最近の研究で、マッコウクジラ由来 Mb の遠位側に存在する 64 位の His が反応中間体である Mb の compound I (Mb-I) の不安定化の要因となっていることが明らかとなった¹¹。例えば、64 位の His を Asp に置換した変異体 (H64D Mb) では、過酸化水素によるスルホキシ化とエポキシ化は野生型と比べて、それぞれ 580 倍、820 倍の反応活性を示した¹⁵。H64D Mb と過酸化水素によるチオアニソールの酸化反応におけるエ

ナンチオ選択性はほとんど観測されず、メチルフェニルスルホキシドがほぼラセミ体で得られる。これに対し、F43/H64L および L29H/H64L Mb による酸化反応では、それぞれ 85 %ee(*R*)¹³、97 %ee(*R*)¹²という高い選択性を示した。そこで高い反応性を示す H64D Mb に対し、高いエナンチオ選択性を賦与する試みが行なわれた。具体的には、小分子の取込みに重要な役割を果たしていると考えられている Val68¹⁶に変異を加えた H64D/V68A Mb では、チオアニソールの酸化反応速度には H64D Mb と大きな差は見られなかったが、エナンチオ選択性が 6 %ee(*R*)から 84 %ee(*R*)に上昇した¹⁵。しかし、まだこれら Mb 変異体のスルホキシ化のエナンチオ選択性が酸化反応のどの段階で制御され、決定されるのか詳細な反応機構の理解はされていない。

そこで、本章では過酸化水素によるチオアニソールの酸化反応で高いエナンチオ選択性を持つ Mb 変異体 (H64D/V68A と H64D/V68S、F43H/H64L Mb) について、チオアニソールの酸化反応の遷移状態モデルとして α -メチルベンジルアミンを用い (図 4-4)、アミンのヘム鉄への結合について、反応速度論的に検証した。それはどういう事かといえ、 α -メチルベンジルアミンはチオアニソールの酸化生成物であるメチルフェニルスルホキシドと構造が非常に近似しており、 α -メチルベンジルアミンが Mb 変異体のヘム鉄に配位した構造は、スルフィド酸化の遷移状態とみなすことができる。従って、*R*-アミンと *S*-アミンのヘム鉄への配位のし易さは、*R*-スルホキシドと *S*-スルホキシドを与える遷移状態のエネルギーの高低を反映すると考えられる。こうした考察に基づいて、Mb 変異体に対する α -メチルベンジルアミンの配位をスペクトル変化から決定し、不斉認識のプロセスを明らかにすることにした。

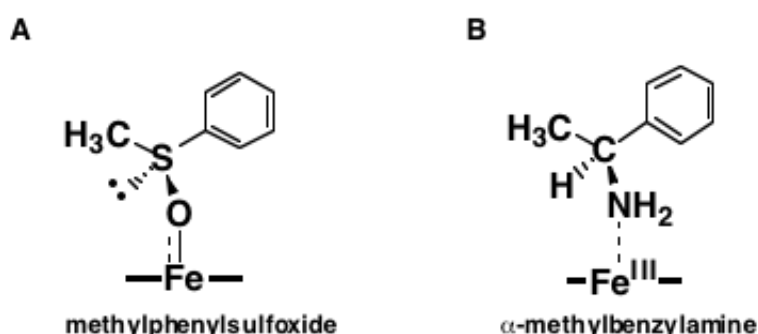


図 4-4. チオアニソールの酸化反応の遷移状態 (A) とそのモデル (B)。

4.2 実験

試薬

標準的な試薬は和光とナカライテスクで購入した。メチルベンジルアミンは東京化成から入手した。反応に使用する過酸の濃度は、過剰に存在するヨウ化カリウム中で HRP が触媒する I_3^- ($\epsilon_{533} = 2.62 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) の生成濃度を測定することで決定した^{17,18}。

Caldariomyces fumago 由来 CPO は Hager から頂いたものを使用し、モル吸光係数 $\epsilon_{699} = 9.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ から濃度を決定した¹⁹。F43H/H64L、H64D/V68A および H64D/V68S マッコウクジラ (SW) Mb の遺伝子は松井らが作成したものを使用し^{13,15}、変異体の発現および精製は Springer らの方法²⁰に従って行った。Mb 変異体の濃度は Mb の CO 体のモル吸光係数 $\epsilon_{423} = 1.87 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ から決定した²¹。

分光分析

吸収スペクトルは UV-2400 spectrophotometer (島津製作所) を用いて測定を行った。スペクトルの変化は、RSP-601 stopped-flow rapid-scan spectrometer (ユニソク) を用いて測定をおこなった。

Mb 変異体と α -メチルベンジルアミンの反応

Mb の変異体と α -メチルベンジルアミンの反応は、ヘム鉄へのアミンの配位によるソーレー帯の減少のストップトフローによる速度論的な解析と、可視吸収スペクトルの変化の測定を 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) を使用し、それぞれ 20 °C および室温で行なった。

速度論的解析は Mb の変異体(H64D/V68A および H64D/V68S Mb) (9.5~11.7 μM) に 30 モル当量以上のメチルベンジルアミンを反応させることで行なった。Mb 変異体とメチルベンジルアミンの反応における吸収変化は 408 nm の吸光度の減少を追った。二次反応速度定数は測定された擬一次反応速度定数対メチルベンジルアミンの濃度をプロットすることで決定した。

可視吸収スペクトルの変化は CPO および F43H/H64L Mb (9.7 μM) に 10 モル当量以上のメチルベンジルアミンを混合後 1 分間静置し、可視吸収スペクトルを測定した。平衡定数は差スペクトルを取り McMillan 等の方法²²で決定した。

4.3 結果

ストップフローによる解析

Mb 変異体に対する α -メチルベンジルアミンの配位に伴うソーレー帯の吸光度の減少から得られた結合速度定数 (k_1)、解離速度定数 (k_{-1}) および平衡定数 (K) を表 4-1 に示す。Mb 変異体のチオアニソールの酸化反応の遷移状態モデルとして用いた (*R*)-および (*S*)- α -メチルベンジルアミンの k_1 は H64D/V68A Mb で *R*-体、*S*-体共に $1.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった。一方、H64D/V68S Mb の (*R*)-および (*S*)- α -メチルベンジルアミンの k_1 はそれぞれ、 $2.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $2.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ だった。それに対し、H64D Mb は *R*-体、*S*-体で $30 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と非常に小さな値を示し、*R*-体の方が 7.5 倍速い。一方、H64D/V68A Mb の k_{-1} は *R*-体、*S*-体でそれぞれ 16 s^{-1} 、 0.59 s^{-1} となり、*R*-体の方の解離速度が 27 倍であった。H64D/V68S Mb では *R*-体、*S*-体でそれぞれ 22 s^{-1} 、 0.24 s^{-1} となり、*R*-体の方が 92 倍速い。H64D Mb の k_{-1} は *R*-体、*S*-体で $0.096 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $0.057 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と非常に小さな値を示し、その差も *R*-体の方が 1.7 倍速い程度であった。

表 4-1. Mb 変異体へのメチルベンジルアミン結合の速度論的パラメーター

	$k_1 (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$		$k_{-1} (\text{s}^{-1})$		$K (\text{M}^{-1})$	
	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>S</i>
H64D/V68A	$1.3 \pm 0.1 \times 10^4$	$1.3 \pm 0.1 \times 10^4$	16	0.59	8.1×10^2	2.2×10^4
H64D/V68S	$2.2 \pm 0.3 \times 10^3$	$2.7 \pm 0.1 \times 10^3$	22	0.24	1.0×10^2	1.1×10^4
H64D	30 ± 10	4 ± 2	0.096	0.057	3.1×10^2	70

反応条件: 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) 中、20°C

可視吸収スペクトルによる解析

F43H/H64L Mb のヘム鉄への α -メチルベンジルアミンの結合による可視吸収スペクトルの変化を図 4-5 に示す。F43H/H64L Mb の可視吸収スペクトルは (*R*)- α -メチルベンジルアミンの結合により、344 nm、418 nm、479 nm、532 nm、613 nm に等吸収点を持つスペクトル変化が見られた。F43H/H64L Mb と (*S*)- α -メチルベンジルアミンの結合によるスペクトル変化では、344 nm、481 nm、525 nm、606 nm に等吸収点が見られ、大過剰 (32.8 mM) のアミンを加える事で 416 nm 付近に等吸収点を持たない吸収の変化が示された。同量のアミン添加によるスペクトルの変化は、*R*-体が *S*-体に比べ大きく、ソーレー帯の吸光度変化が特に

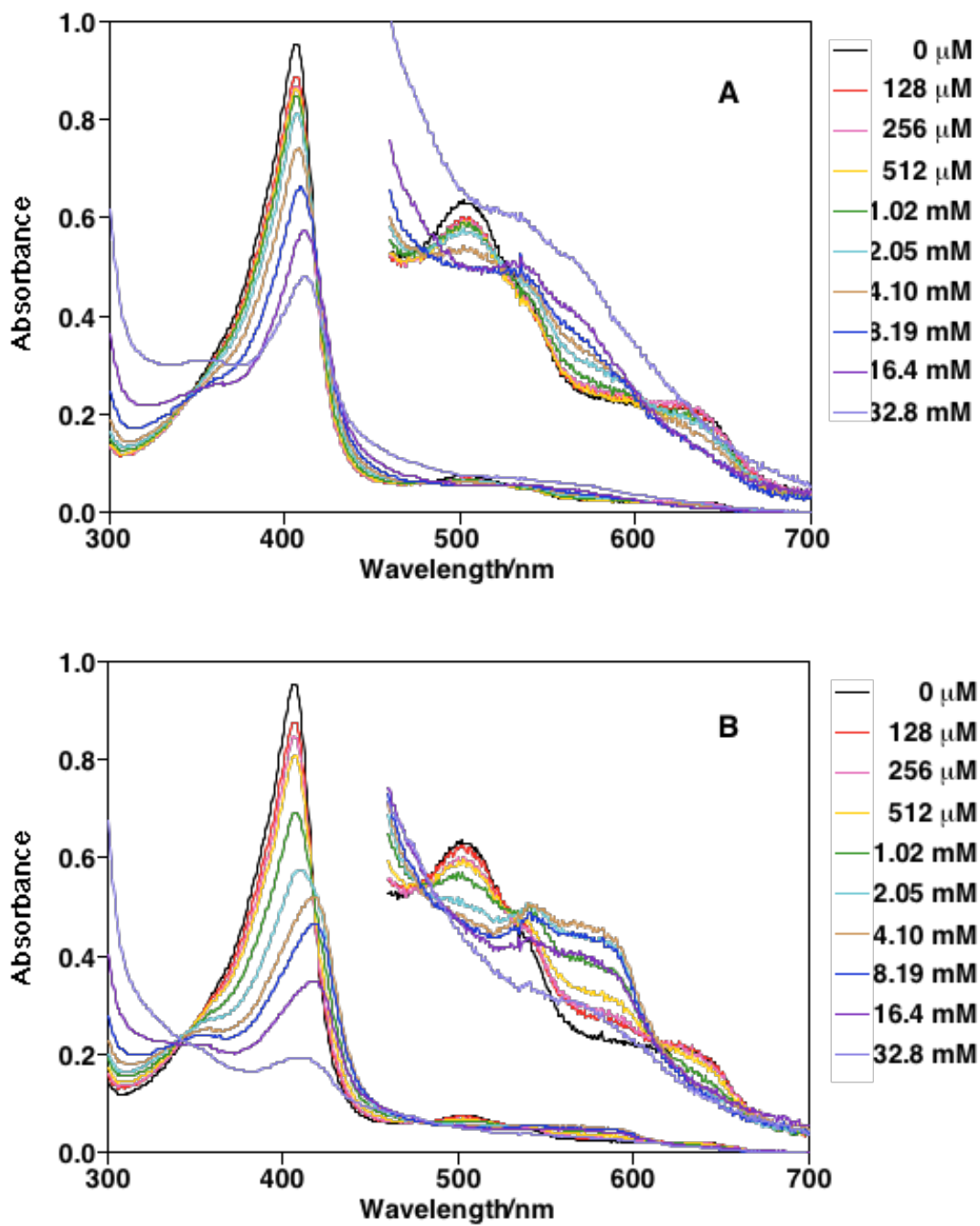


図 4-5. \square -メチルベンジルアミンの結合による F43H/H64L Mb の可視吸収スペクトルの変化. (S)- \square -メチルベンジルアミン (A) (R)- \square -メチルベンジルアミン (B) 反応条件: [F43H/H64L Mb] = 9.7 μ M、50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) 中、20°C

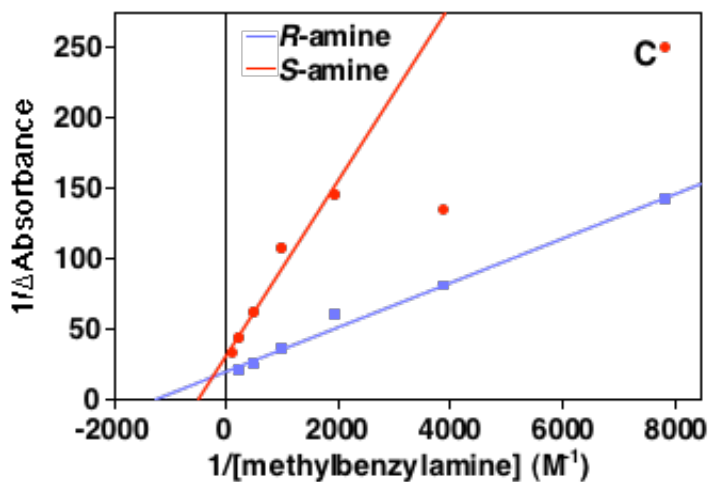
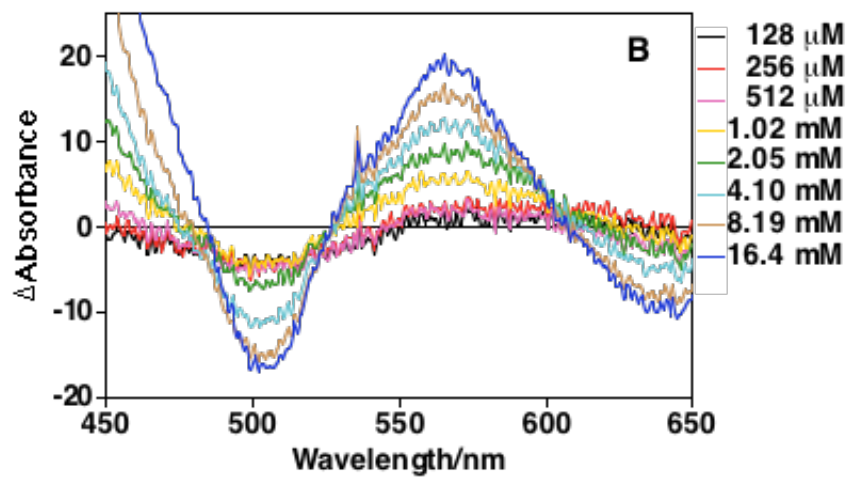
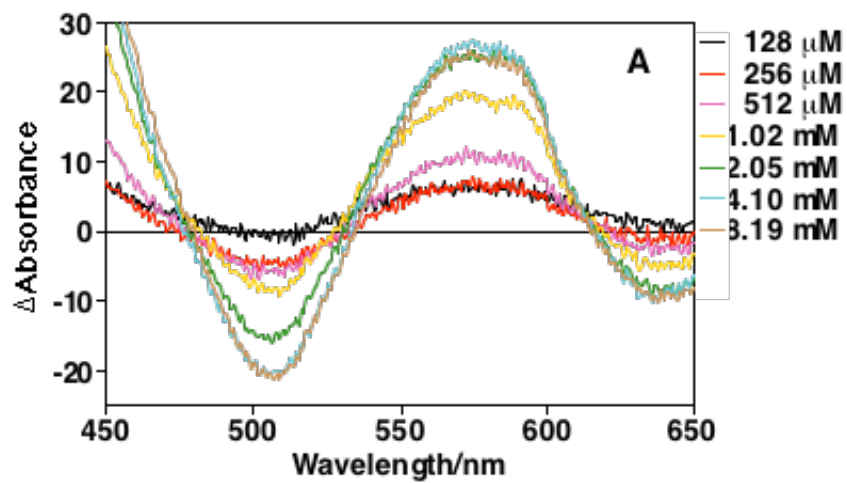


図 4-6. □-メチルベンジルアミンの結合による F43H/H64L Mb の差スペクトルの変化 (S-アミン: A, R-アミン: B) と結合定数の決定 (C). 反応条件: [F43H/H64L Mb] = 9.7 μM , 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) 中、20°C

顕著であるが、結合定数の決定はメチルベンジルアミンの末端吸収の影響の少ない 450~650 nm の差スペクトルから求めた (図 4-6A, B)。この差スペクトルから求めたスペクトルの変化量 ($A_{566}-A_{504}$) とアミンの添加量を逆数に取り、その X 軸切片から F43H/H64L Mb と(R)- \square -メチルベンジルアミンの結合の結合定数(1.3 ± 0.2) $\square 10^3 \text{ M}^{-1}$ 、(S)- \square -メチルベンジルアミンの結合の結合定数(4.8 ± 1.2) $\square 10^2 \text{ M}^{-1}$ を決定した (図 4-6C)。

CPO でも同様の反応を行なったが R-体、S-体共に添加することによる CPO の吸収スペクトルの変化は全く見られなかった。

4.4 考察

ストップフローによる解析

Mb の変異体 (H64D/V68A、H64D/V68S、H64D Mb) と過酸化水素によるチオアニソールの酸化反応は、H64D/V68A、H64D/V68S および H64D Mb でエナンチオ選択性がそれぞれ、84、88、6 %ee(R) (表 4-2) であることがわかっている。

表 4-2. Mb 変異体と過酸化水素によるチオアニソールのエナンチオ選択的スルホキシ化

	Rate (turnover/min)	ee% (R)
H64D/V68A	121	84
H64D/V68S	64	88
H64D	145	6

反応条件: 50mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中、25°C

これら Mb 変異体への(R)-および(S)- \square -メチルベンジルアミンの配位に関するストップフローによる速度論的解析の結果、エナンチオ選択性の高い H64D/V68A、H64D/V68S Mb では結合速度定数 (k_1) にはほとんど差は見られなかったのに対し、解離速度定数 (k_{-1}) がそれぞれ R-体が S-体の 27 倍、92 倍の速度で解離していることが示され、平衡定数 (K) は S-体が R-体の 27 倍、112 倍だった。エナンチオ選択性の低い H64D Mb では k_1 および k_{-1} は R-体が S-体の 7.5 倍、1.7 倍の速さであり、 K は R-体が S-体よりも 4 倍程の値を示したが、これら H64D Mb の速度論的パラメーターの比の値は他の二種類の Mb 変異体に比べ小さく、従ってスルホキシ化でほとんど不斉選択性が見られない事と良く一致する。一方、Mb 変異体に配位した(R)-および(S)- \square -メチルベンジルアミンの解離速度定数から求めたエナンチオ選択性は、H64D/V68A、H64D/V68S Mb

で 93、98 %ee(*R*)という大きな値となった。

R-および *S*-アミンの結合速度が同じで、解離速度は *R*-体が圧倒的に速いことから、チオアニソールの酸化反応の遷移状態 (図 4-4A) における *R*-体、*S*-体の相対的エネルギーは *S*-体の方が安定であると結論される。従って、スルフィドの酸化反応における不斉選択が遷移状態の安定性で決定されているとすれば、*S*-スルホキシドが得られる事になるが、これは実験結果と反対の結論となる。以上の結果はスルホキシドの不斉を決めるステップが酸化に至る遷移状態ではなく、その後の Fe–O–S(Me)Ph からの O–S(Me)Ph の脱離の容易さに帰因する事を示している。すなわち、ヘム鉄に配位した *R*-アミンの解離速度が *S*-体に比して大きい事から、図 4-4A の遷移状態から *S*-スルホキシドの生成が *R*-体に比して優位であり、高い *R*-選択的スルホキシ化反応が進行するものと結論される (図 4-7)。

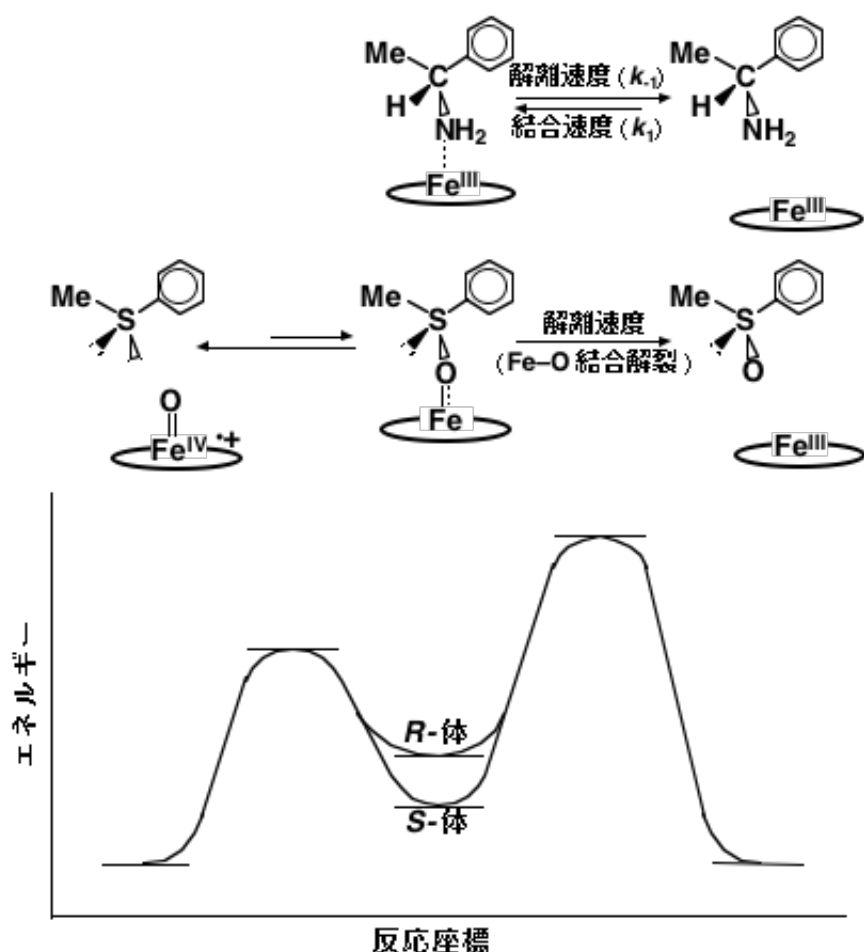


図 4-7. H64D/V68A および H64D/V68S Mb のチオアニソールのスルホキシ化とアミンの結合の推定エネルギー関係図

可視吸収スペクトルによる解析

F43H/H64L Mb に触媒されたチオアニソールの酸化反応およびメチルベンジルアミンのへムへの配位に伴う吸光度の変化に基づいて決定された平衡定数を比べると、F43H/H64L Mb によるチオアニソールの酸化反応では 85 %*ee*(*R*)のエナンチオ選択性で *R*-スルホキドを生成し、アミン配位の平衡定数は、*R*-体が $1.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 、*S*-体が $4.8 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ となり *R*-体の方が優位に配位体を生成することがわかる。つまり、F43H/H64L Mb によるチオアニソールの酸化生成物は

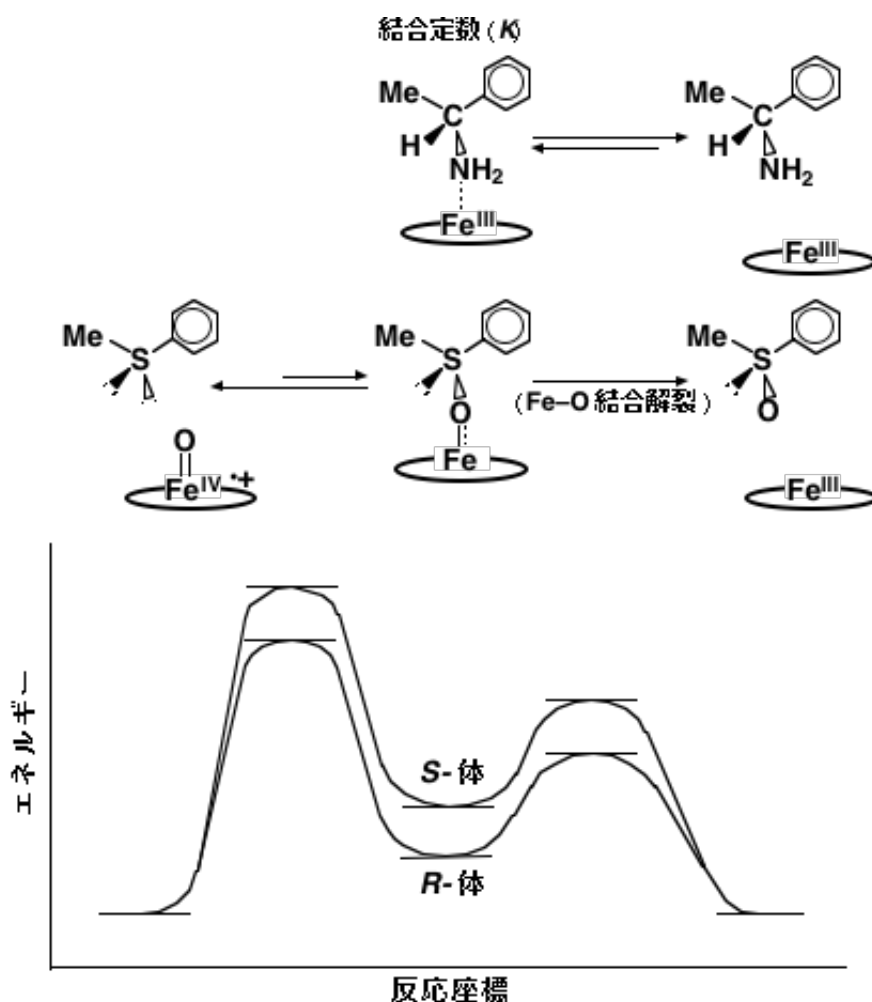


図 4-8. F43H/H64L および H64D Mb のチオアニソールのスルホキシ化とアミンの結合の推定エネルギー関係図

H64D/V68A や H64D/V68S Mb と等しく *R*-スルホキシドを生成するものの、 \square -メチルベンジルアミンの結合定数は H64D/V68A や H64D/V68S Mb と異なり *R*-アミンにより高い親和性を示す。この結果から、F43H/H64L Mb による不斉発現は CPO の *cis*- \square -メチルスチレンのエポキシ化反応⁷やベンジルアルコールのベンジルアルデヒドへの酸化⁶と同様にアミンは解離段階ではなく、基質がへムに近づき遷移状態を与える段階でエナンチオ選択性を決定していると考えられる。従って、Fe-O 結合の解裂過程の活性化エンタルピーは、遷移状態に至る活性化エンタルピーよりも小さいと結論される (図 4-8)。

H64D/V68A および F43H/H64L Mb の結晶構造による比較

H64D/V68A および F43H/H64L Mb の結晶構造を図 4-9 に示す。へムを上から見た図 (図 4-9C, F) から、H64D/V68A や F43H/H64L Mb では、へム上部にメチルフェニルアミンを取り込むことが可能な空間が存在することがわかる。横から見た図では、H64D/V68A Mb の場合 (図 4-9B)、タンパク質表面からへム鉄まで完全に大きな空洞が存在していることから、メチルフェニルアミンは自由にへム鉄まで到達し配位することが可能であるとわかる。対照的に F43H/H64L Mb の場合 (図 4-9E)、メチルフェニルアミンのへム鉄への配位では配位ルート上に Leu64 が存在することでメチルフェニルアミンのアクセスを制限していると考えられる。同様の考察はチオアニソールについても成立し、H64D/V68A Mb では自由にチオアニソールのアクセスが可能であるのに対し、F43H/H64L Mb では Leu64 がチオアニソールのアクセスを制御していると考えられる。

チオアニソールの酸化反応における遷移状態モデルである Mb の変異体への \square -メチルベンジルアミン配位体の親和性を検討するために、Insight II / Discover3 (esff force field) を用いてエネルギー最小化計算を行ない Mb

の変異体とメチルベンジルアミンの間の非共有結合エネルギー (表 4-3) とその配位体の構造 (図 4-10) を求めた。

H64D/V68A Mb の場合、メチルベンジルアミンとこの変異体の間の非共有結合エネルギーは *R*-アミンで -16.9 kcal/mol、*S*-アミンで -20.3 kcal/mol となった。

表 4-3. Mb 変異体とメチルベンジルアミン複合体の Mb-アミン間の非共有結合エネルギー

	<i>R</i> -アミン kcal/mol	<i>S</i> -アミン kcal/mol
H64D/V68A	-16.9	-20.3
F43H/H64L	-9.95	-8.50

Insight II / Discover3 (esff force field)

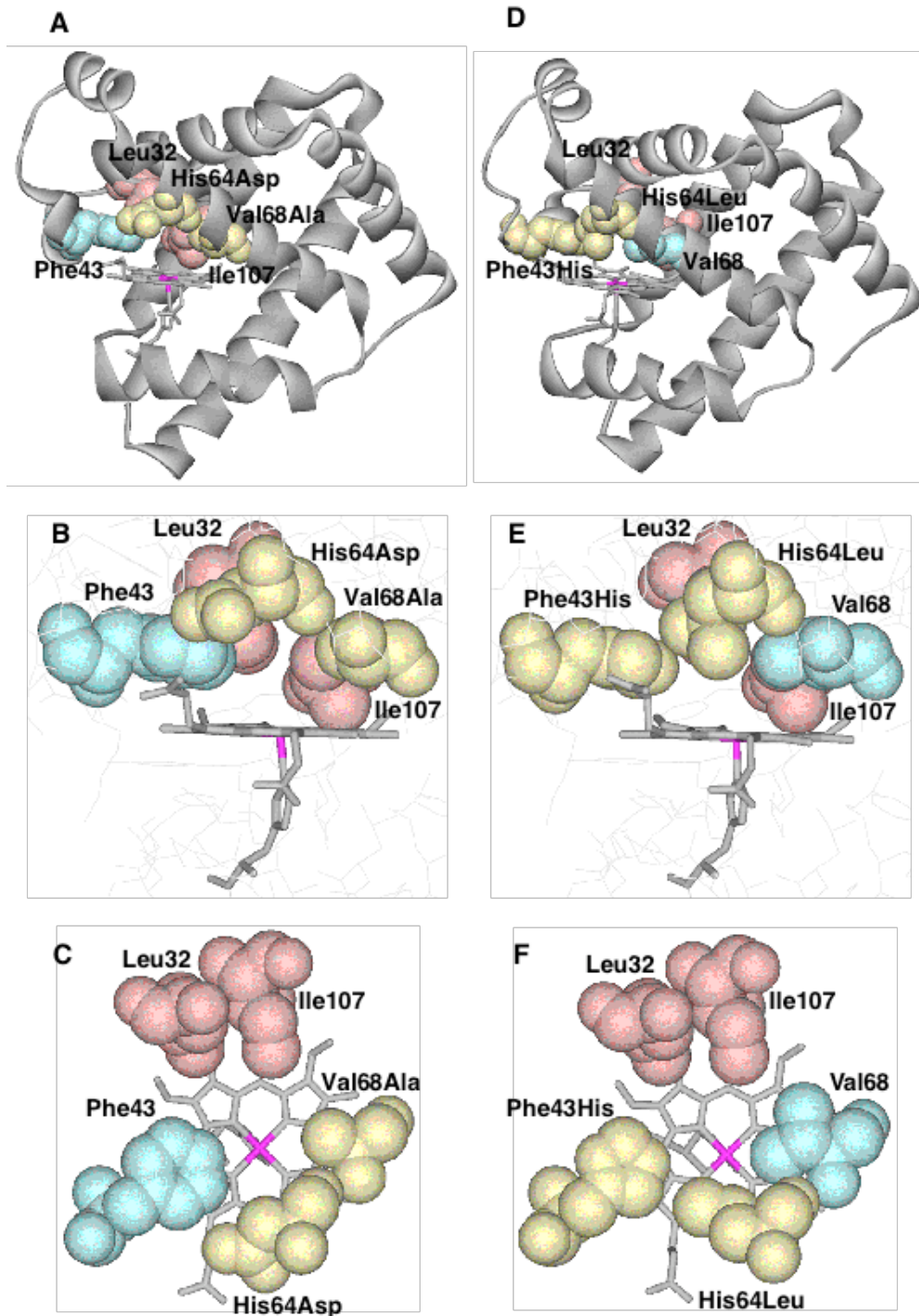


図 4-9. H64D/V68A (A~C) および F43H/H64L Mb (D~F) の結晶構造。横から見た (B, D) および上から見た (C, F) ヘム近傍の拡大図。赤色で示したアミノ酸は H64D/V68A、F43H/H64L Mb の両変異体で変異を入っていないアミノ酸残基。黄色で示したアミノ酸は変異を入れているアミノ酸残基。青色で示したアミノ酸はその変異体では変異を入っていないがもう一方では変異を入れたアミノ酸残基。

このように *S*-アミンが *R*-アミンに比して小さな非共有結合エネルギーを示すことは、実験的に求められた平衡定数から考えた推定エネルギー関係図 (図 4-7) を支持する結果を示した。計算により得られた H64D/V68A Mb とメチルベンジルアミンの複合体の推定構造 (図 4-10B, C) を見ると *R*-アミンと *S*-アミンの両方で疎水性度の高いフェニル基を蛋白質内部に向け、周辺アミノ酸残基間との立体的反発を誘起すること無く、ヘム空間に挿入されている。このことから H64D/V68A Mb ではアミンのアクセスに対するゲートの役割を担うアミノ酸残基が存在せず、その結果 *R*-アミン、*S*-アミンのアクセス速度に差が見られなかったと考えられる。さらに、アミンの配位構造を見ると、*S*-アミンが *R*-アミンに比して反発の少ない構造をとっていることがわかる。従って、*S*-アミンの配位体が *R*-アミンに比して安定であるという実験結果とよい一致を示す。

F43H/H64L Mb に対しても同様に π -メチルベンジルアミンとの配位体の構造を推定した。F43H/H64L Mb では、Leu64 による基質のアクセス制御が存在するため、フェニル基の方からヘム空洞内に侵入することは出来ず、アミノ基の側から侵入すると考えられ、その推定構造は図 4-10E, F のようになった。*R*-アミンと F43H/H64L Mb の配位体の場合、アミンのフェニル基がヘムに対し斜になりどのアミノ酸残基とも相互作用を形成していないのと考えられる。一方、*S*-アミンとの配位体の場合、アミンのフェニル基とヘムの間の π - π 相互作用によって固定されているように見えるが、*S*-アミンのメチル基と Val68 のメチル基の距離が非常に近く互いに反発していると考えられる。このことから、Insight II / Discover3 (esff force field) により非共有結合エネルギーを求めると *R*-アミン配位体では -9.95 kcal/mol、*S*-アミン配位体では -8.50 kcal/mol と *R*-アミンの方が配位体として安定して存在できると推定された。よって、メチルベンジルアミンと F43H/H64L Mb の反応でも H64D/V68A Mb の場合と同様に可視吸収スペクトルの変化から得られた F43H/H64L Mb とメチルベンジルアミンの平衡定数から見積もられたエネルギー関係図 (図 4-8) を支持する結果が得られた。

まとめ

本章では、Mb 変異体によるチオアニソールの酸化反応の遷移状態のモデルとして π -メチルベンジルアミンを用い、Mb のヘム鉄に対する配位体形成反応を速度論的に検討し、Mb 変異体によるチオアニソールの酸化反応の不斉誘起の原因を推定した。H64D/V68A や H64D/V68S Mb に対するアミン配位の速度

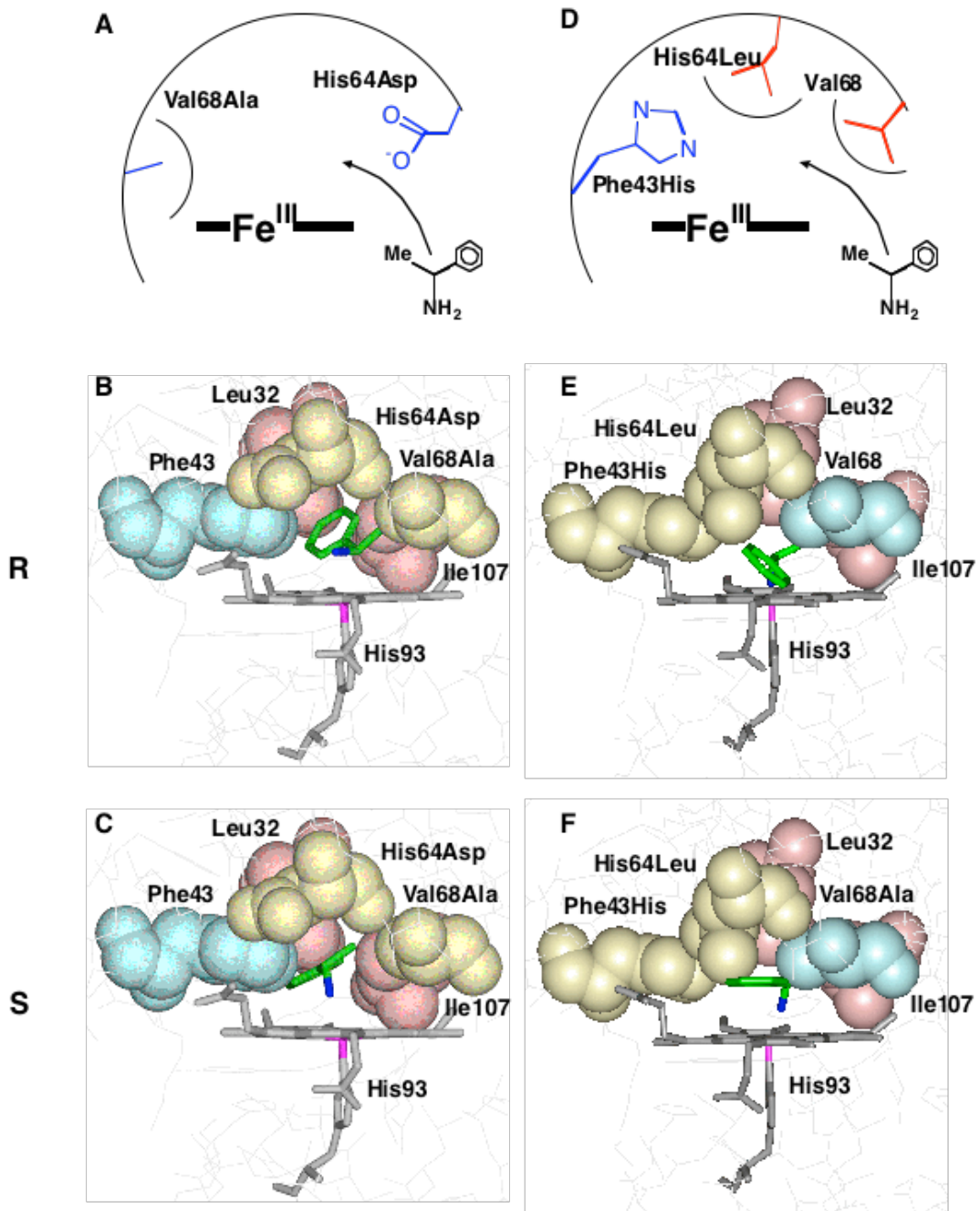


図 4-10. H64D/V68A(A~C)および F43H/H64L Mb(D~F)とメチルベンジルアミンの複合体の推定構造。アミン挿入の模式図 (A, D)。R-アミン複合体 (B, E)。S-アミン複合体 (C, F)。赤色で示したアミノ酸は H64D/V68A、F43H/H64L Mb の両変異体で変異を入れていないアミノ酸残基。黄色で示したアミノ酸は変異を入れているアミノ酸残基。青色で示したアミノ酸はその変異体では変異を入れていないがもう一方では変異を入れたアミノ酸残基。

論的解析の結果、結合速度は *R*-アミン、*S*-アミンでほとんど差が見られなかったものの、解離速度では *R*-アミンが *S*-アミンの 25 倍以上の値を示し、平衡定数は *S*-アミンが *R*-アミンの 25 倍以上の値を示した。このことから、H64D/V68A や H64D/V68S Mb によるチオアニソールの酸化反応では、Fe-O 結合の解裂速度の差でエナンチオ選択性が現われたと考えられる。一方、F43H/H64L Mb では *R*-アミンの配位に対する平衡定数が *S*-アミンより 2.5 倍大きい値を示した。従って、F43H/H64L Mb の場合にはスルフィドへの酸素添加の遷移状態の安定性が不斉選択を規定していると考えられる。これらの現象は H64D/V68A および F43H/H64L Mb の結晶構造に基づくエネルギー最少化計算の結果からも示された。

参考文献

- (1) Montellano, P. R. O. d. *Cytochrome P450 : structure, mechanism, and biochemistry*; Plenum: New York, 1995.
- (2) Colonna, S.; Gaggero, N.; Casella, L.; Carrea, G.; Pasta, P. *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3*, 95-106.
- (3) Colonna, S.; Sordo, S. D.; Gaggero, N.; Carrea, G.; Pasta, P. *Heteroatom Chem* **2002**, *13*, 467-473.
- (4) Deurzen, M. P. J. v.; Rantwijk, F. v.; Sheldon, R. A. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 13183-13220.
- (5) Rantwijk, F. v.; Sheldon, R. A. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 554-564.
- (6) Baciocchi, E.; Fabbrini, M.; Lanzalunga, O.; Manduchi, L.; Pochetti, G. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 665-672.
- (7) Sundaramoorthy, M.; Ternner, J.; Poulos, T. L. *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 461-473.
- (8) Goto, Y.; Matsui, T.; Ozaki, S.; Watanabe, Y.; Fukuzumi, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9497-9502.
- (9) Hara, I.; Ueno, T.; Ozaki, S.-i.; Itoh, S.; Lee, K.; Ueyama, N.; Watanabe, Y. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 36067-36070.
- (10) Herold, S.; Matsui, T.; Watanabe, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4085-4086.
- (11) Matsui, T.; Ozaki, S.-i.; Watanabe, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9952-9957.
- (12) Ozaki, S.; Matsui, T.; Watanabe, Y. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 9784-9785.
- (13) Ozaki, S.; Matsui, T.; Watanabe, Y. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 6666-6667.
- (14) Ozaki, S.; Yang, H. J.; Matsui, T.; Goto, Y.; Watanabe, Y. *Tetrahedron-Asymmetry* **1999**, *10*, 183-192.
- (15) Yang, H.-J. *Doctor of Philosophy* **2000**.
- (16) Quillin, M. L.; Li, T.; Olson, J. S.; George N. Phillips, J.; Dou, Y.; Ikeda-Saito, M.; Regan, R.; Carlson, M.; Gibson, Q. H.; Li, H.; Elber, R. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 416-436.
- (17) Cotton, M. L.; Dunford, H. B. *Canadian Journal of Chemistry.* **1973**, *51*, 582-587.
- (18) Schowen, K. B.; Schowen, R. L. *Methods Enzymol.* **1982**, *87*, 551-606.

- (19) Hollenberg, P. F.; Hager, L. P. *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 2630-2633.
- (20) Springer, B. A.; Egeberg, K. D.; Sligar, S. G.; Rohlfs, R. J.; Mathews, A. J.; Olson, J. S. *Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264*, 3057-3060.
- (21) Antonini, E.; Brunori, M. *Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands*; North-Holland Publishing Co: London, 1971.
- (22) Mcmillan, K.; Masters, B. S. S. *Biochemistry* **1993**, *32*, 9875-9880.

第五章

まとめ

本研究ではヘム酵素による酸化反応機構の基礎的理解を目的として、Mb の変異体を用い速度論的解析を行なった。

ヘム酵素の大きな特徴は、反応活性種近傍に基質を取り込むことで選択的触媒反応を行なうことである。特に、酸化反応を特異的に触媒するペルオキシダーゼやカタラーゼ、P450 等のヘム酵素は、いずれも酸化活性種である cpd I を生成し、酸化反応を行なっていることが知られている。こうしたヘム酵素の活性中心構造は平面的な鉄錯体であるヘムを挟んで、ヘムの軸配位子が存在するヘム近位側と、基質が作用するヘム遠位側に分けて考えられるが、実際は近位側と遠位側の間には水素結合のネットワークが存在することから、相互に影響を及ぼし合い反応を円滑に進めていると考えられる。

酸化酵素活性を持たない Mb でも、変異体を作成することによって酸化活性種である cpd I が観測されるだけでなく、ペルオキシダーゼやカタラーゼ、P450 が行なう様々な酸化反応を触媒することがわかっている。そこで本研究では、酸化反応を行なうヘム酵素の蛋白質モデルとして Mb を用い、ヘム酵素における (1) ヘム遠位側に存在する一般酸塩基触媒の役割、(2) 反応における軸配位子に対する水素結合の影響、(3) 不斉酸化を進める要因の基礎的理解を目的として、(1) ~ (3) の各々に対し反応解析、特に速度論的取扱いによる反応機構の解明を試みた。以下にその結果と詳細を簡単にまとめる。

第二章では、ヘム酵素による基質酸化過程に対する一般酸塩基触媒の役割を検討するために、カタラーゼ反応に注目し、カタラーゼおよび Mb 変異体 (F43H/H64L, L29H/H64L, H64A, H64S, H64D Mb) を用い速度論的重水素同位体効果を検討し、一般酸塩基触媒の役割と反応機構を明らかにした。同位体効果の結果から、cpd I による過酸化水素分解反応は大きく分けて 2 種類の反応機構が存在することがわかった。一つは、カタラーゼ自身や一般酸塩基触媒を有する Mb の変異体である F43H/H64L Mb で観測された「cpd I による過酸化水素分解反応の同位体効果が 2.1~4.0」という値を与える反応である。この場合は、基質である過酸化水素のプロトンの引き抜きが一般酸塩基触媒の His によって行なわれるイオニックな反応機構である。もう一つは、一般酸塩基触媒を持たない変異体 (H64A, H64S, H64D, L29H/H64L Mb) が行なう反応で、「トンネル効果によって 10~29 という大きな同位体効果の値を示す」過酸化水素の酸化的分解反応である。これは、cpd I により過酸化水素の水素原子が引き抜かれるラジカル的な反応機構であることを明らかにした。

第三章では、酵素反応における軸配位子に対する水素結合の影響を検討するために、軸配位子として Tyr を導入し、Tyr から 4 残基離れた位置に Arg や Gln を導入することで水素結合を形成させた Mb の変異体を作成した。酵素反応として、軸配位子に Tyr を持つ酵素であるカタラーゼの反応に焦点を当て、過酸化水素の配位（第 1 ステップ）、cpd I 生成（第 2 ステップ）、cpd I の安定化（第 3 ステップ）、cpd I の活性化（第 4 ステップ）のどのプロセスに対して水素結合が作用しているのかを検討した。作成された Mb 変異体の可視吸収スペクトル、EPR スペクトル、ラマン分光の測定から、Tyr が配位した Mb 変異体の生成と軸配位子に対する水素結合の形成を確認した。過酸化水素との反応による酸素発生速度、過酸化水素との反応によって得られた酸化活性種による ABTS の酸化速度、*m*CPBA との反応によるスペクトル変化の測定を行なった結果、Mb 変異体によるカタラーゼ反応では軸配位子への水素結合の作用は過酸化水素の配位（第 1 ステップ）と cpd I の活性化（第 4 ステップ）で優位に働いていることが明らかとなった。

第四章では、Mb 変異体が行なう不斉選択的酸化反応が基質の酸化プロセスのどの段階で決定されるのかを検討するために、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(*R*)-および(*S*)- \square -メチルベンジルアミンを Mb 変異体 (F43H/H64L, H64D/V68A, H64D/V68S Mb) に配位させ、配位に伴う吸収スペクトルの変化から速度論的解析を行ない、どのような反応プロセスで不斉選択性が生まれるのか明らかにした。H64D/V68A Mb の結晶構造の検討から、この変異体は活性中心に(*R*)-および(*S*)- \square -メチルベンジルアミンが十分に出入りできる空間を有しており、アミン配位構造でのエネルギー最小化計算の結果、(*S*)- \square -メチルベンジルアミンの方が安定に存在することが示された。一方、アミンの H64D/V68A および H64D/V68S Mb に対する配位の速度論的解析の結果から、*R*-および *S*-アミンの配位速度定数 (k_1) に差はほとんど見られなかったのに対し、解離速度定数 (k_{-1}) および平衡定数 (K) に大きな差が見られ、平衡定数から *R*-アミンより *S*-アミンの方がヘム鉄に高い親和性で配位することを示した。こうした結果から、H64D/V68A および H64D/V68S Mb ではチオアニソールの酸化反応による不斉選択性はスルフィドへの酸素添加後の解離段階、すなわち Fe-O 結合の解裂の段階で決まることを明らかにした。一方、F43H/H64L Mb では結晶構造から 64 位の Leu によって基質のアクセスが阻害されることが示され、アミンの配位に伴う吸収スペクトルの変化から得られた平衡定数は *S*-

アミンより *R*-アミンの方がヘム鉄によく配位することを示した。チオアニソールの酸化反応でも *R*-スルホキシドが優先的に得られることから、F43H/H64L Mb ではチオアニソールの酸化反応による不斉選択性は、チオアニソールの酸化の遷移状態の安定性によって制御されていることが推定された。

謝辞

本研究は、総合研究大学院大学在学中に分子科学研究所ならびに名古屋大学理学研究科において渡辺芳人教授の御指導のもと行なったものです。長きにわたり御指導、御教鞭を頂きました渡辺芳人教授に心から感謝申し上げます。また、本研究を行なうに当たり直接御指導頂きました上野隆史博士に心から感謝申し上げます。

本研究の速度論に関して適切な御助言を与えて下さった大阪大学工学部の福住俊一教授に厚くお礼申し上げます。第三章におけるラマン分光の測定および解釈に関して御助言を頂きました廣田俊博士（現：京都薬科大学 助教授）、測定器を貸していただいた統合バイオサイエンスセンターの北川禎三教授ならびに北川グループの皆様にも厚くお礼申し上げます。また、EPR の測定に当り分子科学研究所の酒井雅弘博士には大変お世話になりました。ここに、お礼申し上げます。

研究を進めるにあたり貴重な御助言を与えて下さいました分子科学研究所の小江誠司博士（現：大阪大学 助教授）、中井英隆博士（現：カルフォルニア大学）、柳瀬学博士（現：東ソー株式会社）、吉岡資郎博士（現：ヴァンダービルト大学）、名古屋大学理学研究科の小谷明助教授、中島洋助教授、藤本ゆかり博士（現：大阪大学）に感謝申し上げます。また、様々な事務手続きを行なって下さいました分子科学研究所の谷澤三佐子さん、太田明代さん、名古屋大学理学研究科物質理学専攻事務室および主任室の荒山弘子さん、山田道子さん、吉村志緒里さん、井上和枝さん、杉浦理子さんに感謝申し上げます。

最後に本研究が分子科学研究所相関領域研究系相関領域第一研究室の職員、諸先輩、同級生ならびに名古屋大学理学研究科物質理学専攻生物無機化学研究室の職員、後輩諸君の多くの方の支えの上に成し遂げられたことを銘記し、お世話になりました皆様に感謝いたします。

2003年 9月

加藤 茂

発表論文リスト

1. Asymmetric Sulfoxidation and Amine Binding by H64D/V68A and H64D/V68S Mb:
Mechanistic Insight into the Chiral Discrimination Step
Shigeru Kato, Hui-Jun Yang, Takafumi Ueno, Shin-ichi Ozaki, George N. Phillips, Jr.,
Shunichi Fukuzumi and Yoshihito Watanabe
Journal of The American Chemical Society, **2002**, Vol. 124, pp.8506-8507

その他の論文リスト

2. Rat Tripeptidyl Peptidase I: Molecular Cloning, Functional Expression, Tissue Localization and Enzymatic Characterization
Pei-Ge Du, Shigeru Kato, Yao-Hua Li, Toshinaga Maeda, Takuya Yamane, Shigeto Yamamoto, Manabu Fujiwara, Yoshio Yamamoto, Katsuji Nishi and Iwao Ohkubo
Biological Chemistry, **2001**, Vol. 382, pp. 1715-1725
3. Molecular Engineering of Myoglobin: Influence of Residue 68 on the Rate and the Enantioselectivity of Oxidation Reaction Catalyzed by H64D/V68X Myoglobin
Hui-Jun Yang, Toshitaka Matsui, Shin-ichi Ozaki, Shigeru Kato, Takafumi Ueno, George N. Phillips, Jr., Shunichi Fukuzumi and Yoshihito Watanabe
Biochemistry, **2003**, Vol. 42, pp.10174-10181