

氏 名	ふじ い さと し 藤 井 敏 司
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 1456 号
学位授与の日付	平成 5 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	Model Studies of Non-Heme Iron Enzymes. EPR Characterization of Reaction Intermediates (非ヘム鉄酵素のモデルによる研究。反応中間体の EPR によるキャラクターゼーション)
論文調査委員	(主 査) 教 授 廣 田 襄 教 授 志 田 忠 正 教 授 齊 藤 軍 治

論 文 内 容 の 要 旨

非ヘム鉄含有酵素は生体内で様々な機能を果たし、特に酵素と関わる反応を触媒するものが多い。しかし、ヘム鉄酵素の場合に比べると、非ヘム鉄酵素は種々の分光学的手法を用いても、その電子状態、構造などについて詳しい情報を得ることが困難で、まだ明らかにされていない問題が多い。申請者は本研究において、非ヘム鉄酵素中での鉄イオンの役割とその反応のメカニズムを明らかにするために、モデル錯体を用い、EPR法を中心とする分光法を用いて研究を行っている。取り上げた酵素は Superoxide Dismutase (SOD) と Catechol Dioxygenase (CTD) である。

1. Fe EDTA 系 (SOD モデル)

SOD はスーパーオキシドラジカルを過酸化水素と酸素に不均化する酵素で、酵素毒性に対する防衛機構として重要な役割を果たしている。Fe EDTA が SOD 様の機能を有することは比較的古くから言われていたが、反応中間体として生成する 520nm に吸収極大をもつ過酸化付加錯体の構造はよく分かっていなかった。申請者は Fe EDTA に過酸化水素とアルキルパーオキシドを反応させることにより、この過酸化付加錯体中の過酸化イオンは side-on 型であることを明らかにし、さらに可視部に吸収をもたない end-on 型の過酸化錯体の存在も明らかにした。また、side-on 型からの電子移動で Fe(II)-superoxo 錯体が生成することも見出している。観測されたスーパーオキシドの g 値より、スーパーオキシドの Fe(II) イオンへの結合が示唆された。

2. Fe NTA, Fe(Salen)Cl, Fe(sal-L-aa)Cl 系 (CTD モデル)

CTD は分子状酸素をカテコール環に取り込み開裂させる反応を触媒する酵素で、芳香族の代謝経路で重要な役割を果たしている。この酵素における問題点は、反応中に活性中心の鉄の価数変化があるかないかと、その酸素取り込みのメカニズムで、特に分子状酸素と直接反応する中間体の構造である。申請者はそれぞれ構造の異なる 3 種 7 錯体をモデル錯体として、それらとカテコールとの反応を検討した。その結果、モデル反応系では 3 種のカテコール配位の中間体が存在していることを明らかにしている。反応中の

鉄の価数変化については、salen 錯体の場合のみ 2 価に還元されている兆候が見られた。これらの錯体の酸化還元電位は -100mV 付近でほとんど同じであるので、salen の場合の鉄の還元は平面性の強い salen がカテコール配位で歪んだことに起因すると考えられている。EPR の測定結果から 3 種類の間体の E/D 値はそれぞれ、 ~ 0.3 、 ~ 0.2 および ~ 0.13 であると決められているが、相対存在比と反応時間の関係より、E/D ~ 0.13 のタイプが酸素に対して活性であることが示唆された。また、sal-L-val 錯体を用いた生成物解析の結果から開裂生成物が同定されている。

3. 非ヘム鉄錯体の構造と EPR スペクトルの相関

これまで非ヘム鉄錯体では様々な配位環境にもかかわらず通常 $g = 4.3$ (E/D = $1/3$) に鋭い信号が見られるとされてきたが、申請者の研究で外因性の配位子の配位と E/D 値の相関が明らかにされた。外因性のオキシアニオンが 1 つ配位した場合 E/D ~ 0.30 、2 つ配位した場合 ~ 0.20 、1 つ配位してもう 1 つが近接している場合 ~ 0.13 であるとの経験則が得られている。

以上のように申請者は非ヘム鉄酵素中の鉄イオンの役割と反応メカニズムについて、種々のモデル錯体を用いて研究を行って有用な知見を得ている。

論文審査の結果の要旨

非ヘム鉄含有酵素は生態内で種々の重要な機能を果たしているが、その電子状態、構造などについてはヘム鉄酵素の場合に比べて未解決の問題が多い。申請者は本研究において非ヘム鉄酵素における鉄イオンの役割と反応のメカニズムを解明するため、Superoxide Dismutase (SOD) と Catechol Dioxygenase による研究を行って興味ある結果を得ている。

まず、SOD モデル錯体を用いた研究においては、 520nm に吸収極大を持つ中間体の過酸化付加錯体の構造に関して、その過酸化物イオンが side-on 型であることを明らかにし、さらに side-on 型からの電子移動で Fe(II) superoxo 錯体が生成する証拠を得て、反応機構解明に向けて意義のある結果を得ている。つぎに CTD モデル錯体の研究では、7 つの異なった錯体を用いてカテコールとの反応を検討し、3 種の異なった構造の中間体が存在することを見出し、その中間体における鉄の酸化状態を検討している。また、これ等の中間体の EPR スペクトルの E/D の値についても詳しい検討を行っている。これ等の結果は CTD 酵素の反応機構に関して有用な示唆を与える結果である。

申請者はさらに、種々の非ヘム鉄錯体の構造と EPR スペクトルの E/D 値の間に相関を見出している。この相関に関してまだ十分な理論的な説明は与えられていないが、これは中間体の錯体の構造を議論するのに有用な知見である。

以上のように申請者は本研究においてモデル錯体を用いて非ヘム鉄酵素の反応機構と中間体を主として EPR 法を用いて研究し、新しい有用な知見を得ており価値の高い論文と判断される。

参考文献 1 はスピントラップに関する研究、2 は好中球中で cyt. b_{558} の EPR 測定に初めて成功してその構造について知見を得たもの、3 は cyt. b_{558} の存在状態を EPR スペクトルから論じたもので、いずれも価値の高いものである。

よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、主論文及び参考論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。