

| | |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏名 | 小川 諭 おがわ さとし |
| 学位の種類 | 工学博士 |
| 学位記番号 | 工博第 650 号 |
| 学位授与の日付 | 昭和 55 年 3 月 24 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 5 条第 1 項該当 |
| 研究科・専攻 | 工学研究科石油化学専攻 |
| 学位論文題目 | A Physicochemical Study on the Structures, Mechanisms and Functions of Some Heme Enzymes and Heme Proteins (ヘム酵素, ヘム蛋白質の構造と機能に関する物理化学的研究) |
| 論文調査委員 | (主査) 教授 米澤貞次郎 教授 福井謙一 教授 武上善信 |

論文内容の要旨

本論文は主としてプロトン NMR を用いたチトクローム C, ペルオキシダーゼなどのヘム蛋白質, ヘム酵素の構造と機能についての研究結果をまとめたもので, 4 編 16 章よりなる。

第 1 編第 1 章では序論としてヘム酵素の構造と機能における核磁気共鳴法の意義について述べた後, チトクローム C, およびその誘導体について常磁性シフトしたヘム側鎖プロトンなどの NMR シグナルを観測し, 結果よりヘム鉄軸配位子とアポ蛋白質との相互作用が生理活性発現に役割を果たすヘム鉄の電子状態を決定する要因である事を結論している。第 2 章ではプロトン NMR によりチトクローム C の活性中心近傍の構造の pH 依存性を検討し, チトクローム C が pH に依存して種々の構造をとりうること, および活性中心の構造が水素結合など蛋白部アミノ酸残基間の分子内相互作用により保持されている事を結論している。

第 2 編では分子量 4 万 5 千のヘム酵素ペルオキシダーゼの構造と機能に関し, 主としてプロトン NMR を用いた研究結果がまとめられている。第 1 章および第 2 章では, 研究の概観を述べた序論につづき, ペルオキシダーゼとメトミオグロビンの常磁性シフトしたヘム側鎖プロトンの NMR スペクトルの pH 依存性が検討され, ペルオキシダーゼヘム活性中心近傍に遠位ヒスチジン, およびカルボキシレートと推定される二つの解離性アミノ酸残基の存在が明らかにされている。さらにペルオキシダーゼ, メトミオグロビンの酸-アルカリ転移の機構が異なることが指摘されている。

第 3 章と第 4 章ではプロトン NMR, および温度ジャンプ法によるペルオキシダーゼとアザイド (N_3^-) との反応に関する研究結果がまとめられている。すなわち, プロトン NMR 法ではペルオキシダーゼとアザイド (N_3^-) 錯体のスペクトルの pH 依存性が検討され, 温度ジャンプ法ではアザイドの酵素への結合, および解離速度定数がいりいりの温度と pH で測定されている。これらの結果, 酵素とアザイドとの反応がマイクロ秒の程度のきわめて速いリガンド交換反応であることが明らかになり, 遠位ヒスチジン残基がリガンドとの水素結合をとおしこの配位子交換反応に密接に関与していることが示されている。

第5章と第6章ではペルオキシダーゼとクレゾールなど第2基質との酵素—基質複合体のNMRスペクトルが種々のpH, 温度で測定され, 酵素—基質複合体の構造について議論がなされている。すなわち基質の酵素との結合部位が, 活性中心であるヘム鉄第6配位子付近に存在することが明らかにされ, この基質の結合にヒスチジンと, α -アミノ基と推定されるpKaが, 6および8.5の二つの解離性アミノ酸が重要な役割をはたすことが推論された。さらに基質の酵素への結合によるヘム鉄の電子状態の変化についても考察が行なわれている。

第7, 8, 9章ではペルオキシダーゼの酵素反応中間体である中間体I, および中間体IIの常磁性シフトしたヘム側鎖プロトンのNMRスペクトルの測定に成功し, これら反応中間体の構造について議論を行なっている。すなわち中間体Iでは鉄4価, 軸配位子として O_2^- , アミノ酸残基にラジカルをもつ構造が推定され, 中間体IIでは鉄4価, 軸配位子として OH^- をもつ構造が推定された。さらにこれら反応中間体の構造より, 酵素反応機構についての考察も行なわれ, 反応中間体の安定性に関与する解離性アミノ酸残基として遠位ヒスチジンの役割が明らかにされた。

第10章ではペルオキシダーゼが Ca^{2+} -結合酵素であることがNMRの測定より示され, 酵素反応中間体の安定性におよぼす Ca^{2+} の影響が論じられた。

第11章ではペルオキシダーゼ酵素溶液の溶媒の水分子プロトンのNMR緩和時間が磁場, および温度に大きく依存することが示され, 結果の解析より酵素の第6配位子として水分子が鉄に弱く配位していることが結論された。

第3編では前編に引き続き, ラクトペルオキシダーゼ, カタラーゼなど H_2O_2 分解酵素の活性中心近傍の構造と, その反応機構に関するNMRによる研究結果がまとめられている。すなわちこれらヘム酵素のヘム鉄の電子状態, 活性中心の構造と機能上の差異との相関について議論されている。

第4編ではミオグロビン, ヘモグロビンなど, 種々のヘム蛋白質のNMRスペクトルにおよぼす圧力の効果についての検討結果が述べられている。すなわち第1および2章において圧力のヘム近傍構造におよぼす影響が検討され, この結果圧力がヘム蛋白質のスピン平衡系を低スピンの側に変化させることが明らかにされた。またヘム鉄第5配位子とヘム鉄との相互作用が中心鉄の電子状態を大きくコントロールし, これらのもつ機能発現にきわめて重要であることが指摘されている。

論文審査の結果の要旨

酵素の分子構造を明らかにし, その機能との関連を検討することは, 基礎と応用のいずれの立場からもしきわめて重要と考えられる。本論文は主としてプロトン核磁気共鳴法を用いて鉄ポルフィリンを活性中心にもつ種々のヘム酵素の構造と機能について行なった研究結果をまとめたもので4編16章からなる。その主な成果は次のごとくである。

(1) ヘム蛋白質, ヘム酵素の常磁性シフトしたヘム側鎖プロトンのNMRスペクトルの測定より, ヘム鉄軸配位子の塩基度が生理活性発現に中心的な役割を担うヘム鉄(中心鉄イオン)の電子状態を規定する重要な要因であることを明らかにした。とくにチトクロームCにおいては, 軸配位子—アポ蛋白質のアミノ酸残基の水素結合などの相互作用が, 軸配位子の塩基度を規制し, 生理活性発現に寄与することが示さ

れた

(2) 過酸化水素による有機物質の酸化反応を触媒するヘム酵素西洋わさびペルオキシダーゼが、軸配位子として水分子をもつカルシウム結合ヘム酵素であることが明らかにされた。さらに酵素ヘム近傍に遠位ヒスチジン残基が存在し、この遠位残基が軸配子の水分子との水素結合を通じて、ヘム鉄の電子状態を制御しており、このヘム酵素における遠位ヒスチジン残基の重要性が示された。

(3) 西洋わさびペルオキシダーゼとアザイドの反応の温度ジャンプ法を用いる速度論的研究により、 N_3^- と H_2O との配位子交換反応がマイクロ秒程度のきわめて速い反応であることが明らかになり、この場合にも遠位ヒスチジン残基が、この配位子交換反応に重要な役割を果していることが示された。

(4) ペルオキシダーゼとクレゾールなどの第2基質の酵素-基質複合体のNMR測定より、活性中心のヘム近傍に、第2基質の結合に関与するアミノ酸残基が存在することが示され、ペルオキシダーゼ酵素反応が酵素- H_2O_2 -第2基質の3者複合体を経て進行することが指摘された。

(5) ペルオキシダーゼと H_2O_2 との反応における二つの反応中間体、すなわち中間体 I、中間体 II の分子構造について新しい知見を加えた。まずペルオキシダーゼと H_2O_2 との反応の段階でえられる中間体 I については鉄4価、軸配位子として O_2^- 、蛋白部にラジカルを持つ構造が、また中間体 I に芳香族アミン類などの第2基質を加えることによって得られる中間体 II では鉄4価、軸配位子として OH^- をもつ構造が推定され、酵素反応がこれらの高酸化状態を経て進行するとの結論を導いた。

(6) ペルオキシダーゼ、メトヘモグロビンなどヘム蛋白質の高圧高分解NMRスペクトルの測定より、外圧がヘム鉄の高スピン-低スピン平衡系を低スピン側に移動させることを見出し、スピン平衡が軸配位子とヘム鉄との結合に関連を有することを指摘しえた。

以上要するに本論文はいくつかの大きな分子量(1.5万~4.5万)をもつヘム蛋白質、ヘム酵素の構造と機能との関連についてNMRスペクトルにもとづいて考察を行ない、生理活性発現に中心的役割を担うヘム鉄の電子状態を規定するいくつかの構造上の要因を明らかにするとともに、ペルオキシダーゼの酵素反応の中間体の構造を明らかにし、機構解明に有力な知見を加えたものであって、これらの結果は学術上ならびに実際上寄与するところが少なくない。

よって、本論文は工学博士の学位論文として価値あるものと認める。