

氏 名 田 中 元 雅
 学位(専攻分野) 博 士 (工 学)
 学 位 記 番 号 工 博 第 1798 号
 学位授与の日付 平成 11 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 工学研究科分子工学専攻
 学位論文題目 THE REGULATION MECHANISM OF CATALYTIC REACTIONS IN
 HEME-PEROXIDASE

(ヘムペルオキシダーゼにおける触媒反応の制御機構)

(主査)

論文調査委員 教授 森 島 績 教授 今 中 忠 行 教授 田 中 渥 夫

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、ヘム酵素の一つであり基質の一電子酸化反応を触媒するペルオキシダーゼに着目し、ヘム近傍アミノ酸による高原子価ヘム鉄の生成・還元過程の制御機構に関する研究についてまとめられたものであり、5章9節からなる。

第1章では序論として、高原子価ヘム鉄がヘム酵素の様々な機能に反応中間体として深く関与していることを指摘した上で、その生成、還元過程の制御機構を解明することが本研究の目的であることを明示し、研究対象としてペルオキシダーゼを用いた理由やその研究の背景、および残されている問題について述べている。さらに本研究の着目点として、従来からその重要性が指摘されながら実験的検討がほとんどなされていなかった、活性中心から延びた水素結合ネットワークや基質結合部位を構成するアミノ酸についての意義を述べ、本研究全体の研究指針を明確に示している。

第2章ではペルオキシダーゼの酵素サイクル中における1つの高原子価ヘム鉄中間体 compound I (鉄4価オキソポルフィリンカチオンラジカル)の生成機構について、ヘム近傍のヒスチジン(遠位ヒスチジン)からアスパラギン、グルタミン酸、カルシウムへ至る水素結合ネットワークに注目している。第1, 2節では、遠位ヒスチジンの一般酸-塩基触媒としての機能を他のアミノ酸と比較している。西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)の遠位ヒスチジン(H)をグルタミン酸(E)へ置換した変異体の compound I 生成速度はグルタミン(Q)へ置換した変異体に比べて約50倍上昇したことから、遠位グルタミン酸は一般酸-塩基触媒として機能することが明らかになった。しかし、その生成速度は野生型に比べると約1/3000に減少した。その原因を明らかにするために、X線結晶構造解析を行い、グルタミン酸の側鎖が野生型のイミダゾール基に比べてヘム鉄から約1.5 Å離れて存在することを指摘している(第3節)。そのために遠位グルタミン酸は compound I の生成に重要な鉄-過酸化水素付加体(compound 0)との水素結合を形成できず、生成速度が野生型に比べて減少したと結論づけられた。そこで第4節では、遠位ヒスチジンを最適な位置に固定していると考えられる、遠位ヒスチジン-アスパラギン間の水素結合の役割について検討している。HRPの70番目アスパラギン(N)をアスパラギン酸(D)へ置換し、その水素結合に摂動を与えると遠位ヒスチジンの配向が変化した。また compound I の生成速度は野生型の約1/10に減少した。したがって、遠位ヒスチジン-アスパラギン間の水素結合は遠位ヒスチジンの位置を制御することで、compound I の生成を促進させていることが明らかになった。第5節では、そのアスパラギンおよびカルシウムと相互作用しているグルタミン酸に着目した。その役割を検討するためHRPの64番目グルタミン酸(E)を他のアミノ酸に置換したところ、compound I の生成速度が野生型に比べて約1/30に減少した。分光学的手法により、この変異体ではカルシウムの解離、遠位ヒスチジン-アスパラギン間の水素結合の切断が明らかになったことから、64番目のグルタミン酸の置換により遠位空間に構造変化が生じ、compound I の生成速度が減少したと考えられた。このように、ペルオキシダーゼは遠位空間に水素結合ネットワークを構築し、遠位ヒスチジンを compound I 生成に最適な位置に固定することで、酸化反応を促進させていることが明らかになった。

第3章では、compound I の前駆体について検討するために、HRPと過酸化水素溶液を高速で混合・凍結させ、反応をこれまでの分光法では不可能であった1ミリ秒以内に停止できる装置を新たに開発した。その反応混合物の分光学的特性がcompound I と同じであったことから、compound I の前駆体であるcompound 0 の酸素-酸素結合が1ミリ秒以内に開裂することを初めて明らかにした。したがって、ヘム近傍残基は極めて速い酸素-酸素結合の開裂を行うように構築されており、それによってペルオキシダーゼは触媒活性を高めると同時に、毒性の高い過酸化水素が細胞内に蓄積するのを防いでいると指摘している。

第4章ではcompound I とcompound II（鉄4価オキソポルフィリン）の還元過程を制御する因子の一つである基質結合部位に着目し、蛋白質やDNAの検出反応に重要なルミノール活性が極めて高い *Arthromyces ramosus* peroxidase (ARP) を用いてルミノールの結合部位を分光学的手法により推定した。その結果、ヘムの7-プロピオン酸、8-メチル基、遠位ヒスチジン、リシン49、グルタミン酸190の近傍にルミノールが結合することが示唆された。そこで実際に汎用されているHRPのルミノール反応の感度を高めるために、リシン、グルタミン酸をHRPの対応する位置にそれぞれ導入したHRP変異体を合成した。グルタミン酸導入変異体の触媒効率は野生型と変わらなかったのに対して、リシン導入変異体では野生型の約1.5倍に上昇した。この上昇は速度論的解析から、ルミノールに対する結合能の増大によることが示され、ルミノール活性の向上には、アミノ酸の正電荷とルミノールの負電荷との静電的な相互作用が重要であると結論づけている。

第5章では全編を通じての総括と、研究結果の要旨がまとめられている。

論文審査の結果の要旨

本論文は、ヘム酵素の一つであり基質の一電子酸化反応を触媒する西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) に着目し、ヘム近傍アミノ酸による高原子価ヘム鉄 (compound I : 鉄4価オキソポルフィリン π カチオンラジカル, compound II : 鉄4価オキソポルフィリン) の生成・還元過程の制御機構に関する研究を行ったものである。得られた主な成果は以下の通りである。

1. ヘム鉄の近くに位置する触媒残基、遠位ヒスチジンからアスパラギン、グルタミン酸、カルシウムイオンへと延びた水素結合ネットワークは遠位空間の構造を保持し、遠位ヒスチジンの位置と塩基性を制御することで遠位ヒスチジンの一般酸-塩基触媒としての機能を高め、compound I の生成を促進させていることを実験的に初めて明らかにした。

2. compound I の前駆体について検討するために、HRPと過酸化水素溶液を高速で混合・凍結させ、反応をこれまでの分光法では不可能であった1ミリ秒以内に停止できる装置を開発した。この装置を用いて、compound I の前駆体であるcompound 0 のO-O結合が1ミリ秒以内に開裂することを明らかにし、ヘム近傍アミノ酸がcompound I を極めて速く生成させるように構築されていることを示した。

3. DNAや蛋白質の検出や定量に広く利用されているルミノール反応に着目し、その活性が極めて高い *Arthromyces ramosus* peroxidaseにおけるルミノールの結合部位を分光学的手法から推定した。そのルミノールの結合部位を模倣した変異型HRPの機能、構造的解析から、アミノ酸の正電荷とルミノールの負電荷との静電的な相互作用が高原子価ヘム鉄のルミノールに対する反応性に重要であることを提唱した。

以上、本論文はヘムペルオキシダーゼの触媒反応における高原子価ヘム鉄を用いた活性制御機構に関する重要な知見を与えるだけでなく、DNAや蛋白質に対して高い分析能力をもつペルオキシダーゼの設計に指針を与えるものである。したがって、本論文は、学術上、実際に寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成11年1月22日、論文内容とそれに関連した試問を行った結果、合格と認めた。