

氏 名	よし おか し ろう 吉 岡 資 郎
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 2019 号
学位授与の日付	平 成 13 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	ACTIVATION MECHANISM OF DIOXYGEN BY CYTOCHROME P450cam (チトクロム P450cam による酸素分子活性化機構)
論文調査委員	(主 査) 教 授 森 島 績 教 授 船 引 卓 三 教 授 齋 藤 烈

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、ヘム酵素であるチトクロム P450 による酸素分子活性化と、チトクロム cd_1 による亜硝酸イオンの活性化のメカニズムに着目したもので、活性中心の電子的効果が小分子活性化に及ぼす影響について詳細に調べた結果についてまとめられており、5 章 8 節からなる。

第 1 章では序論として、チトクロム P450 とチトクロム cd_1 による酸素分子や亜硝酸イオンなどの小分子活性化における、活性中心の電子的効果の影響について解明されていない点を指摘し、これを明らかにすることの意義を明示している。さらに、チトクロム P450 における酸化活性種としての高原子価ヘム鉄の電子構造が、これまでに詳細に検討されていない点を指摘し、その電子構造を決定することが、チトクロム P450 による酸化反応のメカニズムを明らかにする上で、非常に重要であることを指摘している。

第 2 章では、チトクロム P450 の活性中心に含まれる、チオレート基の高い電子供与性が、酸素 - 酸素結合切断に与える影響を解明することを目的としている。第 1 節では、チオレート基の電子的効果を検討するために不可欠な活性中心近傍のアミノ酸置換体の合成を可能にするため、P450cam を大腸菌中で大量に合成し、簡便に精製する工夫を行った。本方法では、活性型チトクロム P450cam を得るために、インクルージョンボディと呼ばれる不溶体をヒスチジンを含む溶液に溶解し、蛋白質構造の自発的な立体形成を行うことが必須であることを示した。その結果、従来法より約 10 倍の収量で活性型 P450cam を得ることに初めて成功した。同時に、本方法の開発は、活性中心近傍の変異体合成を可能にした。第 2 節では、チオレート基が酸素分子活性化過程に及ぼす影響を調べるため、チオレート基より電子供与性の小さいヒスチジンに置換した変異体 (C357H) を合成し、その変異体の構造と機能を調べた。その結果、軸配位子を置換することで、ヘムが 6 配位構造を形成し、基質結合部位を失うことを示した。すなわち P450 の軸配位子チオレート基は、ヘム近傍構造を保ち、酸素分子の結合部位を保持するために重要な役割を果たしていることが初めて明らかにされた。第 3 および 4 節では、チオレート基に対して水素結合を形成し、かつ、そのアニオン性を制御していると考えられている 358 番と 360 番残基のアミノ酸主鎖のアミドプロトン、プロリンに置換して除いた L358P と Q360P を合成した。これらの変異では、ヘム近傍構造を壊さないまま、チオレート基の電子供与性を高め、それが酸素分子活性化に及ぼす影響について調べることを目的とした。その結果、水素結合切断により、チオレート基のアニオン性が増加することを、酸化還元電位の測定から初めて実験的に示した。さらに L358P では π 電子供与性が増加すること、Q360P では σ 電子供与性が増加することを明らかにした。炭化水素を基質として酸化反応を行った結果、L358P における π 電子供与性の増加のみが、酸素 - 酸素結合切断を促進することを見いだしている。本章の結果は、酸素分子活性化における因子の一つとして、ヘム鉄の電子状態に及ぼす軸配位子チオレート基の重要性とその π 電子供与性の増加が、酸素分子活性化を促進する因子であることを初めて実験的に明らかにしたものである。

第 3 章では、チトクロム P450cam の酸化活性種の電子構造を決定すること、およびその炭化水素との反応性を明らかに

することを目的とし、有機過酸 *m*-クロロ過安息香酸との反応を行っている。1 ミリ秒の不感時間を持つ高速液体混合装置を用いて反応を混合・凍結し、これを EPR 分光法を用いて解析したところ、これまでに推定されているポルフィリン π -カチオンラジカル由来のシグナルではなく、アミノ酸残基であるチロシン上のラジカルを検出した。さらに、ヘムポケット内のアミノ酸残基の系統的な変異により、このラジカルとなるチロシンを同定することができた。本章の結果は、P450 酸化活性種の反応性が非常に高く、ヘム近傍に存在するチロシンを特異的に酸化するために、たとえ 1 ミリ秒で反応を凍結・停止しても、それを観測することができないことを初めて明確に指摘している。

第 4 章では、チオレート基が配位していなくても、P450 と同様に酸素分子や亜硝酸イオンなどの小分子の活性化を行う酵素としてチトクロム cd_1 に着目し、ヘム d_1 の電子状態が小分子活性化に及ぼす影響を明らかにすることを目的としている。二酸化炭素 (CO)、シアニイオン (CN⁻) 結合型ヘム d_1 における 2 原子分子の伸縮振動を共鳴ラマン分光法を用いて調べ、小分子活性化におけるヘム d_1 の電子的効果を詳細に検討した結果、チトクロム cd_1 で観測された C-O および C-N 伸縮振動は、通常のヘムに結合した値より 20~30 cm⁻¹ 程度、高波数側に観測された。この結果から、ヘム d_1 からヘム鉄に結合した小分子への π 電子の逆供与は通常のヘム蛋白質に比べてかなり小さく、ヘム d_1 は亜硝酸や酸素分子の活性化において、大きな電子的影響を与えていないことを示している。つまり、チトクロム cd_1 では軸配位子やヘムからの電子供与ではなく、むしろヘム遠位空間に存在するアミノ酸からのプロトン化の方が重要な役割を果たしていると結論づけている。

第 5 章では、本論文での研究結果の要旨と全編を通じての総括がまとめられている。

論文審査の結果の要旨

本論文は、酸素分子を用いて炭化水素の本酸化反応を行うヘム酵素であるチトクロム P450cam と亜硝酸イオンを NO に還元する反応を触媒するチトクロム cd_1 の反応メカニズムを明らかにしたいいくつかの研究をとりまとめたものである。特に、活性部位の電子的効果が、小分子活性化に及ぼす影響に着目し、以下の成果を得ている。

1. バクテリア由来チトクロム P450cam の研究を円滑に進めるために、P450cam の新規合成法を開発し、従来法では得られない活性中心近傍のアミノ酸置換体の合成を可能にした。
2. P450 に保存された軸配位子チオレート基をヒスチジンに置換した変異体およびチオレート基に対する水素結合を切断した 2 種類の変異体を合成した。これら変異体の構造と酸化活性について調べ、チトクロム P450cam の立体構造維持におけるチオレート基の重要性を明らかにした。さらに、チオレート基のヘム鉄への π 電子供与性の増加が酸素分子活性化を促進することを実験的に初めて明らかにした。
3. P450 酸化反応の酸化活性種の電子構造を明らかにするため、P450cam と有機過酸を高速で混合・凍結させ、反応を 1 ミリ秒で停止させる装置を開発した。ヘム近傍に存在するいくつかのチロシン変異体について検討した結果、ヘムポケットに存在するチロシンに特異的にラジカルが生成することを明らかにした。また、この反応が低温下でも進行するため、酸化活性種を同定することが非常に困難であることを明らかにした。
4. チトクロム cd_1 における亜硝酸イオンの窒素-酸素結合開裂過程に着目し、ヘム d_1 がそのリガンドに与える電子的影響について、共鳴ラマン分光法を用いて検討した。ヘム d_1 に結合したリガンドへの π 電子逆供与が小さいことを見だし、亜硝酸イオン活性化においてヘム d_1 の電子効果は重要ではないことを示した。

以上、本論文は、チトクロム P450cam と cd_1 におけるチオレート基とヘム d_1 がそれらの活性中心に及ぼす電子的効果を明らかにし、その結果はヘム酵素による小分子活性化機構において重要な知見を与えるのみでなく、工業的に有用な新規触媒設計に指針を与えるものである。したがって、本論文は、博士 (工学) の学位論文として価値あるものとして認める。また、平成13年1月22日、論文内容とそれに関連する試問を行った結果、合格と認めた。