

博士論文審査報告書

論文題目：高酸化型ヘムタンパク質モデル化合物の振動分光学的研究

申請者：石丸裕士

1. 論文内容の要旨

ヘムを活性中心に持つヘム酵素は、生体内で様々な反応を触媒し重要な役割を果たしている。それはヘム鉄がヘム酵素内で 2 価や 3 価だけでなく 4 価や 5 価に相当する高酸化状態を取り得ることによる。このような高酸化型ヘムは、ヘム酵素の機能発現のために不可欠であり、ヘム酵素の反応機構を明らかにするためには、その構造と反応性を調べる必要がある。

本論文では高酸化型ヘム ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) のモデル化合物の構造をおもに共鳴ラマン分光法を用いて詳しく調べた。共鳴ラマン分光法により $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ 型ヘムを特徴付ける $\nu_{\text{Fe}=\text{O}}$ ($\text{Fe}-\text{O}$ 伸縮振動) モードを観測することができる。

ペルオキシダーゼは過酸化水素を酸化剤として有機化合物を酸化する反応を触媒する。その反応において、ヘム鉄が 3 価の Native ペルオキシダーゼは過酸化水素と反応して Compound I、Compound II と呼ばれる Native 型より酸化当量がそれぞれ 2 および 1 だけ高い高酸化型反応中間体を経て Native 型に戻るあいだに有機化合物を酸化する。Compound II は $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ 型ヘムを持ち、 $\nu_{\text{Fe}=\text{O}}$ モードを 787 cm^{-1} に与える。この値はミオグロビンの Compound II の 800 cm^{-1} に比べ 13 cm^{-1} だけ低い。この理由としてペルオキシダーゼでは軸配位子であるヒスチジンが近傍にあるアスパラギン酸と強く水素結合してアニオン化しているため、と推定されており「Proximal 効果」と呼ばれている。しかし、モデル化合物による証明が待たれていた。申請者は、モデル化合物を用いてこのことを証明した。

すなわち、申請者はテトラメシチルポルフィリナト鉄(IV)酸化物(以下、 $\text{TMP}(\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O})$ と書く。)に軸配位子としてイミダゾレート (Im^-) を配位させたモデル錯体を調製した。その-40 における 413.1 nm 励起の共鳴ラマンスペクトルは 792 cm^{-1} にラマン線を与えたが、それは ^{18}O 体では 760 cm^{-1} に 32 cm^{-1} だけ低波数シフトを示した。これをもとに 792 cm^{-1} のラマン線を $\nu_{\text{Fe}=\text{O}}$ モードに帰属した。この振動数は軸配位子が 1-メチルイミダゾール (1MeIm) のときの 815 cm^{-1} に比べて 23 cm^{-1} だけ低い。また、両者のポルフィリン骨格振動モードの振動数は一致したので、ポルフィリンの π 電子系に与える影響は軸配位子が 1MeIm の場合と Im^- の場合で違いがない。ゆえに、これらの軸配位子の違いは $\nu_{\text{Fe}=\text{O}}$ モードにのみ反映されることがわかった。すなわち、軸配位子が Im^- の場合はそれが 1MeIm の場合と比べて配位子から Fe への電子供与が増大し、その結果 O から Fe への電子供与が減少して $\nu_{\text{Fe}=\text{O}}$ モードの低波数シフトを引き起こすと考えられる。以上のことから、申請者はペ

ルオキシダーゼ Compound II における Proximal 効果の理由を明らかにした。

さらに軸配位子を 1-ビニルイミダゾールにすると $\nu_{\text{Fe=O}}$ は 1MeIm の時の 815 cm^{-1} に比べて 3 cm^{-1} だけ高波数シフトし 818 cm^{-1} に現れることを見出した。また、1MeIm の 2 位にメチル基、エチル基、イソプロピル基など嵩高い置換基を導入した軸配位子の効果を調べた。

2. 論文審査結果

本論文では、高酸化型ヘムタンパク質のモデル化合物の $\nu_{\text{Fe=O}}$ を観測し、軸配位子からヘム鉄への電子供与性と $\nu_{\text{Fe=O}}$ の振動数との関係を明らかにし、ペルオキシダーゼにおける「Proximal 効果」を説明することに成功した。

すなわち、 $\text{TMP(Fe}^{\text{IV}}=\text{O)}$ に電子供与性の異なるいくつかの軸配位子を配位させ、 $\nu_{\text{Fe=O}}$ モードの振動数を詳しく調べた。その結果、電子供与性が高ければ $\nu_{\text{Fe=O}}$ モードは低下し、電子供与性が低ければ $\nu_{\text{Fe=O}}$ モードは上昇することを明らかにした。これはペルオキシダーゼのみならず一般の高酸化型ヘムタンパク質の構造研究をも進展させるものであり、反応機構の解明に繋がることが期待される成果である。

さらに、ポルフィリン面との間に立体障害を生じるような嵩高い置換基を持つ軸配位子を用いた実験により、 $\nu_{\text{Fe=O}}$ の振動数を指標として、ポルフィリン面の平面性と軸配位子から Fe への電子供与度の間の関係を調べた。その結果は、ヘム酵素中でタンパク構造変化が起きヘム面が歪んだりヒスチジンが傾いたりした時の $\nu_{\text{Fe=O}}$ の振動数の変化の程度を示す。これはヘム酵素の反応機構を調べる上で重要な知見である。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。

また、平成 22 年 4 月 21 日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

主査： 小倉尚志 印

副査： 吉川信也 印

： 渡辺憲二 印

： 伊東 忍 印

（大阪大学大学院工学研究科、教授）