

# 博士学位論文審査要旨

2014年2月17日

論文題目： 水中で機能する超分子ペルオキシダーゼモデルに関する研究

学位申請者： 上田 卓典

審査委員：

主査： 理工学研究科 教授 加納 航治

副査： 理工学研究科 教授 東 信行

副査： 理工学研究科 教授 小寺 政人

要 旨：

本論文では、ヘム酵素の1つであるペルオキシダーゼの超分子化学的モデル化とその反応性につき研究した結果が述べられている。ペルオキシダーゼは過酸化水素を酸化剤とする酸化酵素の1つであり、従来から活発な研究がなされている。しかし、水を媒体としかつタンパク質の機能を加味したモデル研究はこれまでほとんど行われてこなかった。論文提出者はこの不備を補うべく、アポタンパク質モデルとしてパーメチル化 $\beta$ -シクロデキストリン二量体 (Py3CD) を、補欠分子族モデルとして水溶性鉄(III)ポルフィリン (Fe(III)TPPS) を用い、それらの超分子錯体 (met-hemoCD1) と過酸化水素との反応につき詳細に調べた。その結果、生体系における化合物0に対応する鉄(III)ヒドロペルオキシ錯体が第一の中間体として生じ、このもののホモリシスにより化合物 II に相当する鉄(IV)オキシ錯体が極めて安定に生成することを見出した。この錯体はアポタンパク質モデルである Py3CD により著しく安定化されるため、ゲルカラムクロマトグラフィーによる精製が可能であった。活性な高原子価鉄ポルフィリンを精製した例は極めてめずらしく、このため活性中間体の反応性を、過剰の酸化剤 (過酸化水素) の不在下で正確に検討することが出来るようになった。精製された鉄(IV)オキソポルフィリンは分子内の Py3CD のリンカー一部に位置するスルフィド結合を二電子酸化し、スルホキシド化するというこれまで知られていなかった反応が起こることを明確に証明した。さらに酸化剤に *m*-クロロ過安息香酸あるいは過酢酸を用い、Py3CD とは異なるシクロデキストリン二量体 Py2CD と Fe(III)TPPS とが形成する 1:1 超分子錯体 (met-hemoCD2) との反応を行い、鉄(III)ペルオキシ錯体のヘテロリシスにより鉄(IV)オキソポルフィリン $\pi$ -カチオンラジカル (生体系における化合物 I に対応) が生じ、このものは極めて酸化活性が高いために、シクロデキストリンの脱 *O*-メチル化反応を引き起こすことを明らかにした。本研究は、生体模倣化学に超分子化学の概念を導入した先駆的な内容を含んでおり、導かれた結論は新規性が高く、学術的に重要である。よって、本論文は、博士 (工学) (同志社大学) の学位論文として十分な価値を有するものと認められる。

## 総合試験結果の要旨

2014年2月17日

論文題目： 水中で機能する超分子ペルオキシダーゼモデルに関する研究

学位申請者： 上田 卓典

審査委員：

主査： 理工学研究科 教授 加納 航治

副査： 理工学研究科 教授 東 信行

副査： 理工学研究科 教授 小寺 政人

要 旨：

本論文提出者は、工学研究科博士課程（後期）に在学中である。本論文の主たる内容は、J. Am. Chem. Soc. Vol. 132, 2010年、Chem. Asian J. Vol. 6, 2011年、Org. Biomol. Chem. Vol. 10, 2012年、Chem. Lett. Vol. 42, 2013年および Inorg. Chem. Vol. 53, 2014年に掲載され十分な評価を受けている。2014年1月11日午後1時30分から約1時間半にわたり学術講演会が開かれ、種々の質疑討論が行われたが、提出者の説明により十分な理解が得られた。講演会終了後、審査委員により学位論文に関連した専門的な諸問題につき口頭試問を実施した結果、十分な学力を確認できた。提出者は、英語による論文発表や語学試験にも合格しており、十分な語学能力を有すると認められる。よって、総合試験の結果は合格であると認める。

# 博士學位論文要旨

論文題目： 水中で機能する超分子ペルオキシダーゼモデルに関する研究

氏名： 上田 卓典

## 要旨：

生体内ではさまざまな化学反応が行われることによって生命活動を維持している。これらの生体内反応はタンパク質、核酸、脂質などが補欠分子族や補酵素と連携することにより構築される高度な化学システムによって達成されている。生体内で行われる化学反応は、水中、室温、大気圧下という穏やかな反応条件で進行している。一方で、同じような反応をフラスコ内で行う場合には高温、高圧などの厳しい条件で行わなければならないことが多い。さらに生体内反応の高い選択性や効率をフラスコ内で再現することは容易ではない。そこでバイオメティックケミストリー(生体模倣化学)ではこれら高度な生体内反応に注目して、その反応のエッセンスのみを抽出し人工的に再現することにより、人類に有用な化学を開発する学問分野である。バイオメティックケミストリーでは生体内反応を再現するだけでなく、そのメカニズムを解明することで生体内現象を凌駕する新たな機能を生み出すことも可能である。これからの化学工業は環境への負荷の低減が必要とされている。そのような観点からも水中、室温、大気圧下でのバイオメティックケミストリーがもつ可能性は非常に大きいといえる。

生体内において行われる化学反応でシトクロム P450 やペルオキシダーゼが行う酸化反応は長年にわたって研究対象とされている。これらの酵素の活性中心には共通点があり、ヘムと呼ばれる鉄ポルフィリンをタンパク質内部の疎水空間に有することである。ペルオキシダーゼは過酸化水素を用いて酸化反応を触媒するヘム酵素で、研究には西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)がよく用いられており、その反応や反応メカニズムが広く調べられている。酵素を用いた系では活性中心付近にさまざまなアミノ酸残基が存在し、それらが複雑に関与して酸化反応のメカニズムの検討を困難にしている。このような系はバイオメティックケミストリーに基づいた研究を行うことでその詳細な反応メカニズムの検討が容易になると思われる。さらに酸化酵素の反応を人工の分子で模倣することは酸化酵素の反応機構の解明に役立つばかりではなく、新たな酸化触媒の開発による合成化学や工業化学への寄与の面での期待が持たれる。そのため人工的に合成されたポルフィリンを用いたヘム酵素のモデル化合物に関する研究が古くから行われてきた。

生体内における反応はすべて水を媒体としていることから、より生体に近い人工モデル系を構築し、その水中における化学現象を理解する必要がある。ヘムタンパク質はヘムをタンパク質マトリックスで取り囲むことにより、水中でありながら活性中心周辺を疎水的な雰囲気としている。ヘムタンパク質のモデルを構築するためにはポルフィリン周辺に疎水的な環境を作る必要があると思われる。Kano らは 2 分子のパーO-メチル化- $\beta$ -シクロデキストリンが水溶性ポルフィリンを包接した際にポルフィリン環内部窒素へのプロトン化が著しく抑制されることを見だし、TMe- $\beta$ -CD の包接によってポルフィリン周辺に疎水的な空間を作り出すことができることを明らかにした。Kano らはさらにこの系を発展させ、2 分子の TMe- $\beta$ -CD をピリジン配位子で連結した TMe- $\beta$ -CD 二量体(Py3CD)を合成し、アニオン性鉄(II)ポルフィリンである 5,10,15,20-テトラキス(4-スルホナトフェニル)ポルフィリン鉄(II)錯体(Fe<sup>II</sup>TPPS)との包接錯体(hemoCD1)の開発に成功した。hemoCD1 は水中でミオグロビンモデルとして機能し、可逆的に酸素錯体を形成すると報告している。hemoCD1 において Py3CD の環状オリゴ糖がポルフィリンを取り囲んでいる構造はペルオキシダーゼなどのヘム周辺の活性中心の構造を連想させる。そのため鉄(III)の met-hemoCD1 の系を用いた水中におけるヘム酵素モデルの研究に興味を持たれる。そこで著者

は、met-hemoCD1 と過酸化水素との反応を用いるペルオキシダーゼモデルに関する研究を行った。

第一章では、序論としてバイオミメティックケミストリーおよび酸化酵素モデルについての背景と本研究に至った経緯を述べるとともに、その意義ならびに各章の要旨について述べた。

第二章では、中心鉄が 3 価の met-hemoCD1 と過酸化水素との反応について検討を行った。Py3CD が存在しない水溶液中では鉄(III)ポルフィリン( $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ )は過酸化水素と反応することでポルフィリン環開裂が速やかに起こるとは対照的に、met-hemoCD1 と過酸化水素との反応ではポルフィリンの分解が顕著に抑制された。met-hemoCD1 は過酸化水素と反応すると Cpd 0 に対応する不安定中間体の鉄(III)ヒドロペルオキシ錯体( $\text{HOO-Fe}^{\text{III}}\text{P}$ )を形成し、この中間体を EPR スペクトルにより検出することに成功した。met-hemoCD1 のヒドロペルオキシ種は第五配位子の違いにより  $\text{HOO-Fe}^{\text{III}}(\text{Py})\text{P}$  および  $\text{HOO-Fe}^{\text{III}}(\text{OH})\text{P}$  の 2 種類が存在することを確かめた。met-hemoCD1 のヒドロペルオキシ種は速やかに分解して、Cpd II に対応する鉄(IV)オキソポルフィリン( $\text{O=Fe}^{\text{IV}}\text{P}$ , oxoferryl-hemoCD1)に変化することを分光学的に明らかにした。鉄(III)ヒドロペルオキシ種が完全な水中のモデル系において観測されたという報告例はこれまでになく、シクロデキストリン/鉄ポルフィリン包接錯体によるヘムタンパク質モデルは酵素反応の中間体や活性種の反応性を探る有用なモデル系であることが示された。

第三章では、met-hemoCD1 と過酸化水素との反応により生成する  $\text{O=Fe}^{\text{IV}}\text{P}$  の生成メカニズムについて検討を行った。ラジカルスピントラップ法を用いた EPR スペクトルの測定結果から、 $\text{HOO-Fe}^{\text{III}}\text{P}$  の酸素-酸素結合がラジカル開裂することがわかった。 $\text{HOO-Fe}^{\text{III}}\text{P}$  のホモリシスにより生じる  $\cdot\text{OH}$  ラジカルは、メチル化シクロデキストリンが作るカプセルの中において  $\text{O=Fe}^{\text{IV}}\text{P}$  と再結合する平衡によって安定化されるものと考えた ( $[\text{HOO-Fe}^{\text{III}}\text{P}] \rightleftharpoons [\cdot\text{OH} + \text{O=Fe}^{\text{IV}}\text{P}]$ , [ ] はシクロデキストリンの包接を示す)。この平衡により  $\cdot\text{OH}$  ラジカルによるポルフィリン環の分解反応が抑制されるものと考えられる。カプセル内で安定化された  $\cdot\text{OH}$  ラジカルはラジカル同士のカップリングにより  $\text{H}_2\text{O}_2$  を生じて消失する ( $2[\cdot\text{OH} + \text{O=Fe}^{\text{IV}}\text{P}] \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + 2[\text{O=Fe}^{\text{IV}}\text{P}]$ ) と考えられる。高分子を修飾して hemoCD1 の分子間の反応を抑制すると  $\text{HOO-Fe}^{\text{III}}\text{P}$  を安定化されることが EPR スペクトルの測定結果から明らかにした。高分子修飾で分子間反応を制御することによる不安定中間体の安定化は、hemoCD1 以外の他の錯体においても適用できる可能性がある。

第四章では、Cpd II モデルとしての oxoferryl-hemoCD1 の反応性につき検討を行った。クメンヒドロペルオキシド(CHPO)と met-hemoCD1 との反応から oxoferryl-hemoCD1 を調整した後、ゲルろ過による精製を行うことで過剰の酸化剤とその分解物を除去した oxoferryl-hemoCD1 の溶液を調整した。oxoferryl-hemoCD1 は 2 種類存在すると考えられ、met-hemoCD1 とヒドロペルオキシド( $\text{R-OOH}$ ;  $\text{R} = \text{H, cumyl}$ )が反応する段階でポルフィリン平面のピリジン側で反応する錯体とその反対側で反応する錯体の 2 種類が生じるものと考えた。それぞれが反応することで、ヒドロペルオキシ錯体を経て 2 種類の鉄(IV)オキソ種( $\text{O=Fe}^{\text{IV}}(\text{OH})\text{PCD}$  および  $\text{O=Fe}^{\text{IV}}(\text{Py})\text{PCD}$ )を生成し、それぞれ異なる後続反応を起こした。 $\text{O=Fe}^{\text{IV}}(\text{OH})\text{PCD}$  はリンカー部位に存在するスルフィド結合に直接酸素原子移動することで鉄(II)錯体( $\text{Fe}^{\text{II}}\text{PCD}$ )を生成した(二電子酸化)。一方、 $\text{O=Fe}^{\text{IV}}(\text{Py})\text{PCD}$  は hemoCD1 周囲を一電子酸化することで、met-hemoCD1 へと戻った。鉄(IV)オキソポルフィリンを酸化剤から分離し精製することができる鉄ポルフィリン/シクロデキストリン(met-hemoCD1)の系は酸化活性種の反応性を研究する有用なモデル系といえる。

第五章では、met-hemoCD2 を用いてヘムタンパク質で触媒される生体内酸化反応において重要な活性種である Cpd I (鉄(IV)オキソポルフィリン  $\pi$ -カチオンラジカル、 $\text{O=Fe}^{\text{IV}}\text{P}^{+\cdot}$ )の観測を試みた。鉄(III)ペルオキシ錯体の酸素-酸素間の結合のヘテロリシスを誘発する酸化剤として、*m*-クロロ過安息香酸(mCPBA)および過酢酸(PAA)を用いた。met-hemoCD2 は過酸との反応により Cpd I に対応する化学種( $\text{O=Fe}^{\text{IV}}\text{P}^{+\cdot}$ )を生成した。生成した  $\text{O=Fe}^{\text{IV}}\text{P}^{+\cdot}$  は近くに位置するシ

クロデキストリンダイマーの3位のO-メチル基に酸素添加することで脱O-メチル化反応を起こした。この反応は鉄オキシの近くで進行するため、鉄オキシの近くにある2つのO-メチル基のみが脱メチル化反応を起こす。また、1つのO-メチル基を脱O-メチル化したPy2CD (Py2CD<sup>OH</sup>)を単離し、そのFe<sup>III</sup>TPPSとの包接錯体の機能をhemoCD2と比較した。Py2CD<sup>OH</sup>/Fe<sup>III</sup>TPPSの鉄中心のアクア配位子のp*K*<sub>a</sub>はmet-hemoCD2のp*K*<sub>a</sub>よりも1p*K*<sub>a</sub>単位高い値となった。中心鉄を還元したPy2CD<sup>OH</sup>/Fe<sup>II</sup>TPPSの酸素結合挙動は、hemoCD2と異なる挙動を示した。Py2CD<sup>OH</sup>/Fe<sup>II</sup>TPPSの酸素親和性はmet-hemoCD2よりも10倍高いことがわかった。Py2CD<sup>OH</sup>/Fe<sup>II</sup>TPPSの自動酸化反応の半減期は4時間となり、水による自動酸化が加速された。p*K*<sub>a</sub>や酸素親和性の変化は鉄に配位した水や酸素にPy2CD<sup>OH</sup>のヒドロキシ基が相互作用(水素結合相互作用)することで理解でき、ヘムタンパク質における遠位側のヒスチジンの役割を果たしていると考えられる。

第六章では、本研究の総括として、今回得られた知見並びに今後の改良点、展望について述べ、結論とした。