

審査の結果の要旨

氏名 鈴木 紀 行

シトクロム P450 は細菌から哺乳類に至る広範囲の生物種に分布している普遍的な代謝酵素であり、700 種を越える著しい分子多様性を有している。その機能については、ステロイドホルモンやプロスタノイド類の生合成、薬物類の代謝にみられる不活性な基質への一原子酸素添加活性が主に注目を集めてきたが、その他にも aromatase や isomerase 活性を有するものや、NO を合成する NO synthase などもあり、きわめて多彩である。

P450 の活性中心はヘム酵素としては特異なシステイン由来のチオレート軸配位子とする鉄ポルフィリンであり、更にそのチオレート軸配位子は周囲のアミノ酸残基からの水素結合を受けている。多くの P450 では第 6 配位子側は疎水的な基質認識部位があるのみで、他のヘム酵素とは全く異なる P450 の性質と反応性は、第 5 配位子側のチオレート配位子とその近傍のアミノ酸残基によってコントロールされていると考えられる。しかし、酵素自身を用いた検討では、チオレート軸配位子やその軸配位子への水素結合の効果を詳細に解析する事は困難である。

鈴木は構造的に安定であり、触媒的酸化反応にも耐えうる唯一の合成ヘム-チオレート錯体である鉄ポルフィリン (SR) を用いて、上記の問題点である第 5 配位子及びその近傍のアミノ酸の反応性に及ぼす効果を精緻に検討した。さらに、P450 の特有な反応性を引き起こす活性種についても検討を行い、P450 反応活性中間体について従来の説とは異なる新たな知見を得た。具体的成果は以下の 2 点に要約できる

1. P450 の構造及び反応性に及ぼすチオレート軸配位子と NH-S 水素結合の効果

(i) 錯体の合成と同定

ヘム-チオレートの構造及び反応性に及ぼす水素結合の効果を明らかにするために、軸配位子近傍に水素結合を導入した水素結合型 SR-HB をデザイン・合成した。その SR-HB の電子的效果や立体的効果のコントロールとなる錯体群も合成した。

(ii) 構造と物性の検討

SR-HB の X 線結晶構造解析を行った。これは合成 alkanethiolate-heme 錯体として初めてである。水素結合を確認するとともに、その Fe-S 結合距離が予想とは逆に、NH-S 水素結合により短くなっているという非常に興味深い結果を得た。詳細にこの点を検討するため、結合距離の変化が鋭敏に反映される共鳴ラマン分光も行った。Fe-S 伸縮を帰属するために軸配位子に ^{34}S を導入した SR 及び SR-HB も合成した。この錯体を用いることにより、合成 alkanethiolate-heme として初めて $\nu\text{Fe-S}$ を帰属する事に成功した。帰属された $\nu\text{Fe-S}$ は、SR-HB の方が SR よりも 28 cm^{-1} 高波数であり、確かに水素結合により Fe-S 結合の短縮が起こっていることが示された。この Fe-S 結合の短縮については、Fe-S 反結合相互作用が水素結合によって減少し、その結果結合次数が増加していると考えられる。

次に、水素結合による thiolate-heme の電子状態の変化を検討を行った。その結果、酸化還元電位、Mössbauer スペクトル、共鳴ラマンスペクトルから SR-HB の中心鉄が電子欠損であることを示す結果が得られた。P450 の酸化反応は reductase からの電子移動が律速

であるため、この水素結合による正のシフトは P450 の触媒効率を向上に寄与すると考えられる。実際に合成錯体を用いて電子移動速度の測定を行った結果、SR-HB への電子移動は SR に比べ確かに速く、これは Fe-S 近傍に電子吸引性の水素結合が存在することにより電子移動に伴う再配向エネルギーが減少していることによると考えられる。またこの SR-HB は他の SR 誘導体にくらべ、錯体の安定性も大きく向上していた。これも水素結合による酸化還元電位の正のシフト及び Fe-S 結合次数の増加のためと考えられる。

(iii) 反応性の検討

次に、実際の触媒的酸化反応に与える水素結合の効果を検討するために、SR 及び新規錯体群と P450 の酸化反応特性をアルカン・アルケン競争酸化反応により検討した。一般的に、アルカン酸化は水素原子引き抜きを初発とし、アルケン酸化はアルケンから酸化活性種への電子移動を初発として反応が進行すると考えられており、反応機構が異なる。競争酸化反応の結果、SR 類は他の配位子を持つヘムとくらべてラジカル的反応性が高く、P450 と同じ傾向であることが分かった。SR-HB は SR 類の中ではラジカル的反応性はやや低く、求電子性が高まっていた。以上から、P450 の最大の特徴といえるラジカル反応性はチオレート配位子に由来するものであり、NH-S 水素結合はその活性種のラジカル性と求電子性をコントロールし、また錯構造の安定化・電子移動の促進に寄与しているということが示された。

2. ヘム-チオレートを用いた P450 酸化活性種の検討

P450 の酸化活性種がどのような構造であるかということはこの分野で最も興味もたれている点である。鈴木はチオレート配位ヘムでは他のヘム酵素のような鉄オキソ中間体は生成せず、peroxy 中間体が直接反応しているのではないかと考えた。この機構により反応が進行しているのであれば、基質・酸化剤・触媒が相互に影響しあい、反応に影響を与えるであろう。検討の結果、基質の反応性・酸化剤の置換基に依存した反応選択性に変化が見られた。このような酸化剤と基質との相互作用は、鉄オキソ種を唯一の中間体とするスキームでは起こり得ないことから、SR による触媒的酸化反応においては、基質酸化は SR-acylperoxy 中間体を經由して進行しているということが示された。

以上、鈴木は薬物代謝酵素として重要な位置を占める P450 の反応性・反応機構を詳細に検討し、従来考えられていた説とは異なる新たな機構を提唱した。本結果は P450 の反応機構を考える上で重要な知見であり、薬物代謝酵素研究に新たなページを開いた。これらの成果は博士（薬学）の学位論文として十分に価値があるものと認められる。