

Title	共鳴ラマン分光法によるペルオキシダーゼ反応中間体の構造化学
Author(s)	橋本, 慎二
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36020
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

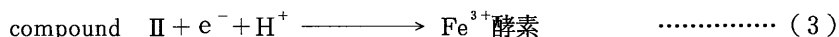
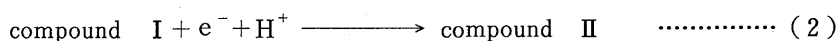
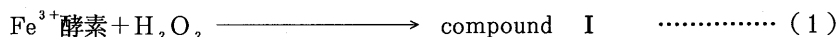
Osaka University

氏名・(本籍)	橋本慎二
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 8092 号
学位授与の日付	昭和 63 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医学研究科生理系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	共鳴ラマン分光法によるペルオキシダーゼ反応中間体の構造化学
論文審査委員	(主査) 教授 谷口 直之 (副査) 教授 岡本 光弘 教授 田川 邦夫

論文内容の要旨

[目 的]

西洋わさびペルオキシダーゼは鉄ポルフィリンを補欠分子族とする酵素で、過酸化水素による種々の基質の酸化を触媒する。その反応サイクルは下に示したような経路を通る。



このうち compound II の分子構造としては、そのヘム鉄に酸素原子が配位した $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ 構造と (2) の反応でとりこまれた H^+ の結合した $\text{Fe}^{4+}-\text{OH}^-$ 構造の 2 通りの可能性があって長く議論されてきた。またこのプロトンの pKa は 8.6 であり、それよりアルカリ側では反応速度が遅くなることが知られている。そこで本研究では compound II の共鳴ラマンスペクトルを測定し、そのヘム近傍の分子構造と反応性との関連についてしらべた。

[方法と成績]

酵素は西洋わさびペルオキシダーゼの isozyme C (東洋紡 RZ=3.2) を用いた。ラマンスペクトルの測定には Kr^+ レーザーの 406.7nm の光を用い散乱光を OMA II で検出した。測定には回転セルを用いレーザー光は可能なかぎり弱く (<10mW) した。積算時間は約 4 分であった。図 1 に pH 7 での共鳴ラマンスペクトルを示す。 H_2^{16}O 中で $\text{H}_2^{16}\text{O}_2$ を用いて compound II をつくり測定すると (b) が得られ、 774cm^{-1} に元の酵素 (a) には見られないラマン線が認められた。このラマン線の帰属をするため $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ を用いると (c) が得られたがこれは (b) とほぼ同じであった。ところが溶媒である水を H_2^{18}O に置換し H_2^{16}

O_2 を用いたところ 774cm^{-1} のラマン線の強度は減少し 740cm^{-1} に新しいラマン線が現れた(d)。 $H_2^{18}O$ と $H_2^{16}O_2$ を用いると完全に 774cm^{-1} のラマン線は消失した(e)。先にアルカリ溶液中でこのラマン線に相当するものは 787cm^{-1} に認められ、それが $H_2^{18}O_2$ と ^{54}Fe 置換に対してそれぞれ -34cm^{-1} 、 $+3\text{cm}^{-1}$ の同位体シフトを示すことから、それを $Fe^{4+}=O$ 結合の伸縮モードに帰属した。pH 7での 774cm^{-1} のラマン線はその振動数が少し低いが ^{18}O 同位体置換により 740cm^{-1} にシフトしており同様に $Fe^{4+}=O$ 伸縮モードに帰属できる。またこの場合、同位体シフトは $H_2^{16}O$ を $H_2^{18}O$ に置換することにより観測されたことから、ヘム鉄に配置した酸素原子がpH 7で溶媒の水と交換することがわかった。さて、pH 7においてヘム鉄には酸素原子と OH^- 基のいずれが配位しているのかを決めるため重水中で測定したところ、そのラマン線は約 2cm^{-1} 高波数へシフトした。これは配位子が OH^- の場合に予想される振動数シフトとは逆の方向である。このこととpH 7では $Fe^{4+}=O$ 伸縮振動数がアルカリ側より 13cm^{-1} 低波数へシフトしているということから、中性条件下ではヘム鉄に配位した酸素原子はdistal位のアミノ酸残基と水素結合していると考えられる。さて、 787cm^{-1} のラマン線の強度を溶液のpHに対してプロットするとその中点pHは約8.8となった。これはcompound IIのheme-linked ionizationとして知られているpKa値(8.6)とよく一致する。従ってdistal位のアミノ酸残基との水素結合が活性に重要な役割を果していることがわかった。これらの事実より反応機構を推測すると図2のようになる。まず酸化型酸素(A)と過酸化水素が反応しcompound Iとなる。中性でcompound Iは基質より電子とプロトンを受け取りcompound II(D)となり、そのヘム鉄には酸素原子が配位しさらにアミノ酸残基と水素結合している。このプロトンはpKa8.8で解離し酵素は不活性型(E)となる。また(D)の状態ではおそらく(C)のような中間状態を経由してヘム鉄に配位した酸素原子と溶媒の水とが交換しており、この交換反応は酵素が活性である時のみ起こることがわかった。

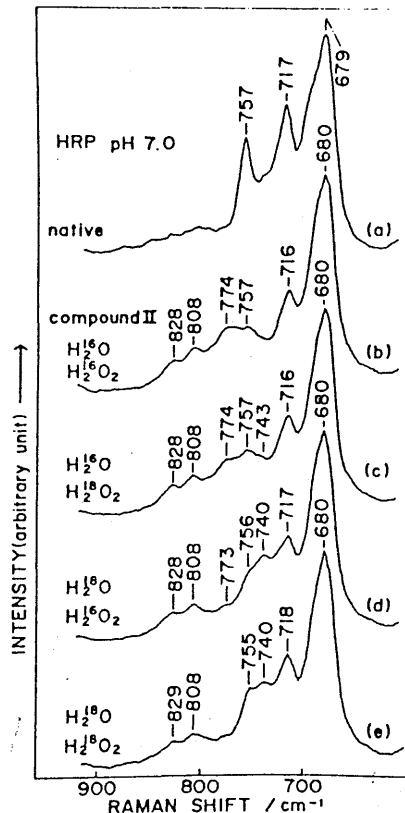


図1 Compound IIの共鳴ラマンスペクトル

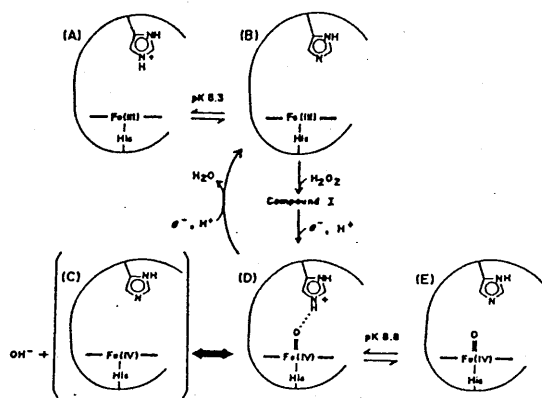


図2 西洋わさびペルオキシダーゼの反応メカニズム

図2の反応機構を推測すると、まず酸化型酸素(A)と過酸化水素が反応しcompound Iとなる。中性でcompound Iは基質より電子とプロトンを受け取りcompound II(D)となり、そのヘム鉄には酸素原子が配位しさらにアミノ酸残基と水素結合している。このプロトンはpKa8.8で解離し酵素は不活性型(E)となる。また(D)の状態ではおそらく(C)のような中間状態を経由してヘム鉄に配位した酸素原子と溶媒の水とが交換しており、この交換反応は酵素が活性である時のみ起こることがわかった。

[総括]

中性条件下で compound II のヘム鉄には酸素原子が配位しており distal 側のアミノ酸残基と水素結合している。このプロトンは $pK_a 8.8$ で解離し酵素は不活性となることから、この水素結合は活性に重要な役割を果していることが明らかになった。

論文の審査結果の要旨

本論文は、西洋わさびペルオキシダーゼや、チトクローム *c* ペルオキシダーゼの共鳴ラマンスペクトルを測定し、ペルオキシダーゼに特徴的なヘム近傍の分子構造を詳細に解明したものであり、特にその高酸化反応中間体のヘムの分子構造に関する結果は従来指摘されていた $Fe(IV)=O$ の構造に対し決定的な証拠を与え、ペルオキシダーゼの分子構造的な酵素反応機構を明らかにした。また、これらの結果は一連のヘム蛋白質による酸素活性化機構の解明に大きく貢献するものであり、独創的な研究として高く評価される。