

Title	触媒サイトでの多点制御機能を活用する人工酵素の開発
Author(s)	川瀬, 敬啓
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47627
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 かわ せ 川 瀬 たか 敬 ひろ 啓

博士の専攻分野の名称 博 士 (理 学)

学 位 記 番 号 第 20859 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 19 年 3 月 23 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当
理学研究科化学専攻

学 位 論 文 名 触媒サイトでの多点制御機能を活用する人工酵素の開発

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 笹 井 宏 明
(副査)
教 授 村 田 道 雄 教 授 加 藤 修 雄 助 教 授 鈴 木 健 之

論 文 内 容 の 要 旨

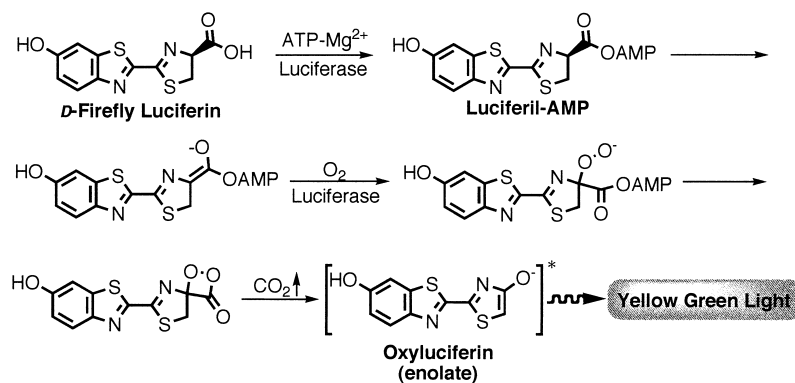
生体内において多くの反応は酵素によって、選択的にかつ効率的に進行している。しかし一般に酵素は pH や温度に対する依存性が大きく失活しやすい、また大きな分子量にも関わらず反応に関与する触媒サイトは酵素分子中にか所のみであるといった欠点もある。

そこで酵素類似の機能を低分子量で安定な人工の触媒に付加することができれば、酵素の欠点を補う人工酵素の実現も可能と考えられる。

そこで私はホタルの発光酵素ルシフェラーゼ、及びカテコラーゼを目的酵素に人工酵素化を目指した。

ホタルの発光反応は Scheme 1 に示すような機構で進行すると考えられている。しかし本反応はルシフェラーゼ存在下でのみ進行し、現在までルシフェラーゼがどのような機構で本反応の発光収率を向上させているか明らかとなっていない。

2003 年 Branchini らはルシフェラーゼの重要部位の特定を試みている¹⁾。その結果から、私はリジンのアミノ基、アルギニンのグアニジノ基が反応を進行させるために必要であると考えた。またルシフェリン周りに存在するフェニルアラニンも疎水性環境を構築するために必要であると考察した。そこで



Scheme 1. Luminescent Mechanism of Firefly

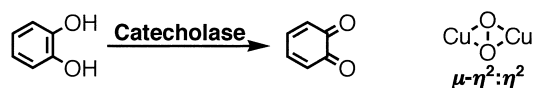
Table 1. Bioluminescence Activity of 1

enzyme	ATP	count of luminescencer
luciferase	+	2500000
luciferase	-	51
none	+	31
1	+	159

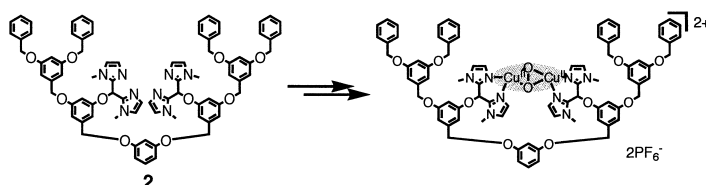
私は **1** を人工ルシフェラーゼとしてデザイン、合成した。

1 を用いてホタルルシフェリンとの発光反応を行いその発光強度を測定したところ、天然のルシフェラーゼが 250 万という値を示すのに対し、**1** は 159 とわずかではあるものの有意な値を示した (Table 1)。しかし、**1** では活性サイトの保護のために働く部位の導入はされておらず、また化合物が種々のコンホメーションをとるためにコンビナトリアルケミストリーを利用してもその改良は困難である。

そこで次にデンドロンを利用したカテコラーゼの人工酵素化を検討した。カテコラーゼはカテコールを酸化させる酵素であり、 $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-}$ ペルオキシ二核銅錯体を形成していると考えられている。

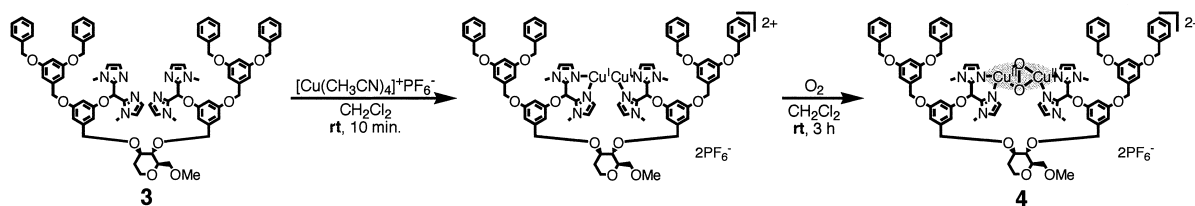


しかしこれまでに人工的に合成された $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-}$ ペルオキシ二核銅錯体は、低温下でのみ安定、または、触媒活性に乏しいといった問題を有している。酵素が安定な $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-}$ ペルオキシ二核銅錯体を形成する要因は、反応に関与しないアミノ酸残基が錯体周りを取り囲み、活性部位を保護するためと考えられる。そこで当研究室の Jayaprakash 博士、Rashid 修士らと共同で保護部位としてデンドロンを用いた **2** をデザイン、合成した。**2** は室温下安定な $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-}$ ペルオキシ二核銅錯体を形成し、種々の酸化反応の触媒となり人工酵素としての働くことが明らかとなった。安定かつ高活性な $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-}$ ペルオキシ二核銅錯体の初めての例である。

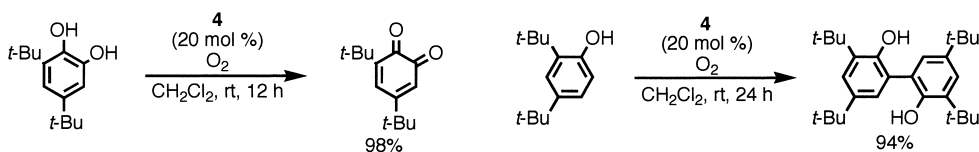


私は更なる $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-}$ ペルオキシ二核銅錯体の汎用性を開発するために **2** のコア部位を光学活性体である糖誘導体に変換することとした。コアを変換することにより二つのビスイミダゾール部位間の距離が変化し、安定性、反応性等の異なる錯形成が期待でき、その結果より汎用性に富む錯体となりうる。

グルカールをコアとして用い、新規光学活性配位子 **3** を合成した。**3** は室温下 $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]^+\text{PF}_6^-$ と銅錯体を形成し、更に酸素を導入することで $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-}$ ペルオキシ二核銅錯体 **4** を与えた。本錯体 **4** の生成は UV スペクトル、及び PPh_3 との反応性から確認した。



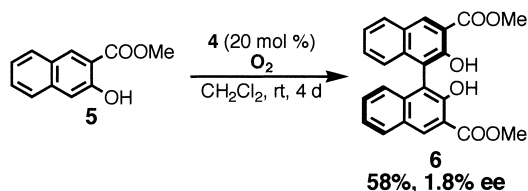
また本錯体 **4** はカテコラーゼ活性を有しており (Scheme 2)、またフェノールの酸化カップリング反応において高活性な触媒となることを見出した (Scheme 3)。



Scheme 2. Catecholase Activity

Scheme 3. Oxidative Coupling of Phenols

更に本錯体は光学活性体であるため、不斉反応への応用を検討した。その結果 **5** の不斉酸化カップリング反応において、生成物 **6** を 1.8% ee と低いながらも今後の応用の期待できる結果が得られた。



本研究は人工酵素開発の基礎になりうると考えられる。

1) Branchini, B.R.; Southworth, T.L.; Murtiashaw, M.H.; Boije, H.; Fleet, S.E. *Biochemistry* **2003**, *42*, 10429

論文審査の結果の要旨

本論文の著者は、触媒分子中の複数の官能基が協調して反応を促進する新規な人工酵素の創製研究を行った。標的となる酵素としては、酵素機能活性を容易に評価できるホタルの発光酵素ルシフェラーゼと、酸化酵素として重要なカテコラーゼを取り上げている。合成した人工ルシフェラーゼでは顕著な活性を確認できなかったものの、人工のカテコラーゼの創製研究では、天然のカテコラーゼと同様な $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-}$ ペルオキシ二核銅錯体を、ベンゼン環をコアとするデンドロンに導入することで、種々の酸化反応の触媒となることを明らかとした。室温下安定かつ酵素様の活性を有する $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-}$ ペルオキシ二核銅錯体として初めての例である。この人工酵素において、デンドロンは、活性部位の安定化と $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-}$ ペルオキシ二核銅錯体の可溶性に寄与していると考えられる。本論文の著者は、汎用性の高い $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-}$ ペルオキシ二核銅錯体を創製するために、デンドロンのコア部位を光学活性体である糖誘導体に変換した。コアを変換することにより二つのビスイミダゾール部位間の距離を調節可能で、安定性や反応性等の異なる錯形成が期待できる。グルカールをコアとして用い、二分子のビスイミダゾール型配位子を導入した人工酵素も、室温下 $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]^+\text{PF}_6^-$ と銅錯体を形成し、更に酵素を導入することで安定な $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-}$ ペルオキシ二核銅錯体となることを見いだした。本錯体の生成は UV スペクトル、及び PPh_3 の酸化活性から確認している。

本錯体は、カテコラーゼ活性を有しており、またフェノール類の酸化カップリング反応において高活性な触媒となることも見出している。更に本錯体が光学活性体であることから、不斉反応への応用についても検討し、ナフトール誘導体の不斉酸化カップリング反応において、低いながらも不斉誘起を確認している。本研究は人工酵素開発の新たなアプローチとして独創的であるばかりでなく、室温で酵素活性を再現した初めての人工カテコラーゼとしても意義深い。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。