Osaka University Knowledge Archive

Title	Role of Hydrophobic Microenvironment at the Active Site of Molybdenum Oxidoreductases
Author(s)	長谷中, 祐輝
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52299
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

様式3

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　長谷中　祐輝　）	
論文題名	Role of Hydrophobic Microenvironment at the Active Site of Molybdenum Oxidoreductases (モリブデン酸化還元酵素活性部位における疎水性微小環境の役割に関する研究)

論文内容の要旨

金属酵素は特定の三次元構造を持つ単分散高分子であり、常温・水中で様々な生体反応を触媒する。その活性部位は、図1に示すように、巨大なタンパク質で覆われた金属錯体とみなすことができる。水溶性のタンパク質であっても、活性部位周辺は疎水的環境にあり、基質の結合や水素結合などの弱い相互作用を安定化している。活性部位のみを人工の金属錯体によって精密に再現しても、その活性は酵素には程遠く、タンパク質が酵素活性に必要であることは言うまでもない。生理学的条件下で高い反応性・基質特異性を有する金属酵素におけるタンパク質の役割を明らかにすることは、金属酵素を深く理解するとともに、効率的で環境に負荷を与えない次世代の触媒開発にもつながる重要課題である。

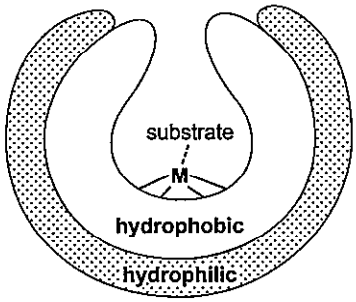

図1. 酵素の概念図

申請者は、酵素タンパク質によって創り出される疎水性微小環境に着目し、酸素原子移動反応を触媒するモリブデン酵素について、構造と反応性の両面からモデル研究を行った。本論文では、モリブデン酵素活性部位における疎水性微小環境の段階的なモデル化を目指し、新規に非常に嵩高い疎水基をもつジチオラート配位子を設計した。

第II章では、非常に嵩高い疎水基を持ち、トルエンに可溶なアニオン性モリブデン(IV)錯体、$(Et_4N)_2[Mo^{IV}O(1,2\text{-}S_2\text{-}3,6\text{-}\{(4\text{-}^t BuC_6H_4)_3CCONH\}_2C_6H_2)_2]$ (図2)を合成し、その性質を調べた。非常に嵩高い置換基によって極性の高い金属中心や対カチオンは完全に覆われ、溶媒であるトルエンを含めた疎水的環境下でモデル錯体の挙動を詳細に調べることが可能となった。極性の高い基質であるMe_3NOは、非極性溶媒中で効率的に活性中心にアクセスでき、反応速度の向上が見られた。

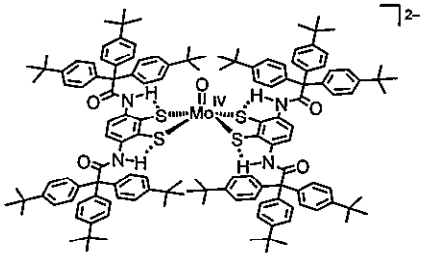
図2. モデル錯体の構造

第III章では、錯体のさらなる反応性の向上をめざし、ジメチルスルホキシド(DMSO)還元酵素モデルとして、オキソ配位子を持たないデソキソモリブデン(IV)錯体$(Et_4N)[Mo^{IV}(OSi^tBuPh_2)(1,2\text{-}S_2\text{-}3,6\text{-}\{(4\text{-}^t BuC_6H_4)_3CCONH\}_2C_6H_2)_2]$を合成した。期待通り錯体の反応性向上が見られ、中性小分子であるDMSOの還元に成功した。極性の高いMe_3NOと異なり、DMSOの還元速度は溶媒極性によらず、基質取り込みに必要な微小疎水性環境が活性中心近傍に構築されたことが示唆された。

第IV章では、トリメチルアミン*N*-オキシド還元酵素のモデルとして、天然でも用いられているNADHの類縁体によりアミン*N*-オキシドを還元する触媒系を構築した。触媒としては、酸化型酵素のモデルである非常に嵩高い置換基をもつジオキソモリブデン(VI)錯体$(Et_4N)_2[Mo^{VI}O_2(1,2\text{-}S_2\text{-}3,6\text{-}\{(4\text{-}^t BuC_6H_4)_3CCONH\}_2C_6H_2)_2]$を用いた。含水トルエン中およびミセル水溶液中で、酸化型錯体は系中でNADH誘導体により一旦還元され、触媒的にアミン*N*-オキシドを還元した。また、溶媒にD_2Oを用いた場合には、大きな速度論的同位体効果が観測され、錯体のプロトン化過程が反応の律速段階に関与していることが明らかとなった。

本研究では、非極性溶媒に可溶なモリブデン錯体を合成し、その構造や反応性を調べた。極性の高い活性中心や対カチオンは嵩高い置換基で覆われ、非極性溶媒中では基質であるMe_3NOの取り込みが加速されることが分かった。錯体のオキソ配位子をシリル化することにより、反応性の大幅な向上が達成され、反応性の低い中性基質であるDMSOの還元が可能となった。この高い反応性は極性溶媒中でも見られ、活性中心近傍に疎水性の基質ポケットが構築されたことが示唆された。さらに、錯体をミセル水溶液中に可溶化することにより、水系溶媒中で触媒的にアミン*N*-オキシドを還元することに成功した。本論文では、非常に嵩高い疎水基を用い、酵素活性部位が置かれた疎水性微小環境の段階的な再現を達成した。活性部位だけでなく、周囲の疎水的環境まで含めて再現するという概念は、酵素モデル研究に新たな知見を与えると考えている。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　長谷中　祐輝　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	鬼塚　清孝
	副 査	教授	原田　明
	副 査	教授	栗栖　源嗣
	副 査	准教授	岡村　高明

論文審査の結果の要旨

金属酵素は特定の三次元構造を持つ単分散高分子であり、常温・水中で様々な生体反応を触媒する。その活性部位は、巨大なタンパク質で覆われた金属錯体とみなせる。水溶性のタンパク質であっても、活性部位周辺は疎水的環境にあり、基質の結合や水素結合などの弱い相互作用を安定化している。活性部位のみを金属錯体で人工的に精密に再現しても、その活性は酵素には程遠く、タンパク質が酵素活性に必要であることは言うまでもない。生理学的条件下で高い反応性・基質特異性を有する金属酵素におけるタンパク質の役割を明らかにすることは、金属酵素を深く理解するだけでなく、効率的で環境に負荷を与えない次世代の触媒開発にも繋がる重要課題である。

本学位申請者は、酵素タンパク質によって創り出される疎水性微小環境に着目し、酸素原子移動反応を触媒するモリブデン酵素について、構造と反応性の両面からモデル研究を行った。即ち、モリブデン酵素活性部位における疎水性微小環境の段階的なモデル化を目指し、非常に嵩高い疎水基をもつジチオラート配位子を新規に設計し、この配位子を持つトルエンに可溶なアニオン性モリブデン(IV)錯体を合成し、その性質を調べた。本錯体は疎水的空間内にイオン的相互作用を閉じ込める事により、静電的な相互作用を制限し、非極性溶媒への可溶化を達成した。非常に嵩高く疎水的な置換基は、極性の高い金属中心と対カチオンを完全に覆い、溶媒であるトルエンを含めた疎水的環境下でモデル錯体の挙動を詳細に調べることを可能にした。極性の高い基質であるトリメチルアミン *N*-オキシド（Me_3NO）は、非極性溶媒中で効率的に活性中心に近づいて還元され、反応速度が向上した。

次に、錯体のさらなる反応性の向上をめざし、ジメチルスルホキシド(DMSO)還元酵素の活性部位のセリン残基側鎖のアルコキソ配位を模したモデルとして、オキソ配位子をシロキソ配位子に変換したデソキソモリブデン(IV)錯体を合成した。期待通り錯体の反応性は高くなり、中性小分子である DMSO の還元に成功した。極性の高い Me_3NO とは異なり、DMSO の還元速度は溶媒の極性によらず、基質の取り込みに必要な疎水性微小環境が活性中心近傍に構築されたことが示された。

さらに、生体内で使用される還元剤である NADH の類縁体によりアミン *N*-オキシドを還元する触媒系を構築した。触媒としては、酵素の酸化型モデルであるジオキソモリブデン(VI)錯体を用いた。含水トルエン中およびミセル水溶液中で、酸化型モデル錯体は NADH 誘導体により一旦還元され、触媒的にアミン *N*-オキシドを還元した。また、溶媒に重水を用いた場合には、大きな速度論的同位体効果が観測され、錯体のプロトン化過程が反応の律速段階に関与していることが明らかとなった。

本研究は、非常に嵩高い疎水基を用い、非極性溶媒に可溶なモリブデン酸化還元酵素モデル錯体を合成する事で酵素活性部位の疎水性微小環境の再現を行った。独自の発想によるモデル研究により、活性部位周辺の疎水性微小空間が基質の取り込みを容易にし、反応を加速させる事を明らかにした。また、より酵素に近い水溶性ミセル中での触媒反応系の構築にも成功した。活性部位だけでなく、周囲の疎水的環境まで含めて再現する本研究手法は、モリブデン酵素に限らず、酵素一般に広く、多くの知見を与えるものであり、波及効果と今後の研究分野の発展が期待できる。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。