

Title	Molecular Design and Preparation of Artificial Reductases with Polynuclear Metal Clusters
Author(s)	佐野, 洋平
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59157
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	佐野洋平
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第24925号
学位授与年月日	平成23年9月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科応用化学専攻
学位論文名	Molecular Design and Preparation of Artificial Reductases with Polynuclear Metal Clusters (多核金属クラスターを含有する人工還元金属酵素の分子設計および調製)
論文審査委員	(主査) 教授 林 高史 (副査) 教授 平尾 俊一 教授 井上 豪 教授 桑畑 進 教授 大島 巧 教授 南方 聖司 教授 今中 信人 教授 宇山 浩 教授 町田 憲一 教授 安藤 陽一 教授 古澤 孝弘

論文内容の要旨

本論文は、天然に存在するシステイン含有タンパク質の高次構造およびアミノ酸配列に着目した新しい人工還元金属酵素の構築に関する研究成果をまとめ、序論および総括を含む全5章から構成される。

第1章は本論文の序論であり、研究の背景および目的、戦略、概要について論じた。

第2章では、天然に存在する金属結合タンパク質の一つであるメタロチオネインの α -ドメインを配位子として用いて、天然には見られない四核の二価鉄クラスターを構築し、完全水中における多電子還元反応を達成した。システイン残基を多数含むメタロチオネインの α -ドメインは Fmoc 固相法により合成し、鉄イオン、またはコバルトイオンをそれぞれ添加することで、四核金属クラスター含有ペプチドの構築をおこなった。また、四核二価鉄クラスター含有ペプチドを使って、含窒素化合物であるアゾベンゼン誘導体メチルレッドの還元反応を実施し、紫外可視吸収スペクトル変化およびHPLC分析により、それぞれ化学量論的な反応が観測された。以上より、アゾ化合物の多電子還元を担う非天然金属クラスター含有ペプチドが得られた。

第3章では、天然に存在する電子伝達タンパク質であるシトクロム *c* のアポ体を使って、二核鉄ヘキサカルボニルクラスター含有タンパク質を構築し、完全水中における触媒的な光駆動水素発生反応を達成した。具体的には、二つのシステイン残基をもつシトクロム *c* のアポ体は既報の硫酸銀法により調製し、鉄カルボニル錯体をタンパク質マトリクス中に導入して、二核鉄ヘキサカルボニルクラスター含有タンパク質を合成し、その同定を実施した。また、得られた二核鉄ヘキサカルボニルクラスター含有タンパク質を使って、完全水中における光駆動水素発生反応をおこなったところ、ガスクロマトグラフィーによる定量分析により、25 °C, pH 4.7の条件下で3時間反応させた際の触媒回転数は82であった。一方、二核鉄ヘキサカルボニルクラスターをシステイン残基で固定したヘプタペプチドを別途調製し、同様に光駆動水素発生反応を検討したところ、触媒回転数は12に減少した。以上、二核鉄ヘキサカルボニルコアをシトクロム *c* のタンパク質マトリクス中に挿入することにより、タンパク質のマトリクスが支援する効率的な水素発生触媒としての新規ヒドロゲナーゼ機能モデルが得られた。

第4章では、シトクロム *c* 群の一つであるシトクロム *c*₅₅₆ がもつ部分アミノ酸配列オリゴペプチド内に光増感

部位と触媒活性部位をそれぞれ導入した分子内で機能する光駆動水素発生システムを構築し、分子内光誘起電子移動を伴う触媒的水素発生反応を達成した。具体的には、シトクロム *c*₅₅₆の部分構造ペプチドは Fmoc 固相法により合成し、二核鉄ヘキサカルボニルペプチド錯体の調製に続いて(2,2'-ビピリジン)(2,2':6',2"-ターピリジン)ルテニウム錯体をペプチド内に配位結合で導入することで、分子内光誘起電子移動-水素発生システムの構築を行った。次に、得られた分子内光誘起電子移動-水素発生システムを使った水素発生反応を実施したところ、25 °C, pH 8.5の条件下で2時間反応させた際の触媒回転数は9であった。一方、コントロール実験として光増感剤をペプチド鎖に導入しない分子間光誘起電子移動を伴うシステムを使った水素発生反応の際には、水素ガスの発生は検出されなかった。したがって、本系において水素発生に対する光増感剤から触媒活性部位への分子内光誘起電子移動の有効性が認められた。

最後に第5章は本論文の総括であり、天然に存在するシステイン含有タンパク質を利用した新たな人工還元金属酵素の構築法の有用性を結論づけた。

論文審査の結果の要旨

本論文は、天然に存在するシステイン含有タンパク質の高次構造およびアミノ酸配列に着目した新しい人工還元金属酵素の構築に関する研究成果をまとめたものである。主な結果を要約すると以下の通りである。

1. 天然に存在する金属結合タンパク質であるメタロチオネインの α -ドメインを利用して、非天然な四核二価鉄クラスター含有ペプチドを構築し、完全水中における多電子還元反応系を試みた。システイン残基を多数含むメタロチオネインの α -ドメインはペプチド合成により調製し、さまざまな金属イオンをそれぞれ導入することで、四核金属クラスター含有ペプチドの構築に成功している。さらに、四核二価鉄クラスター含有ペプチドを使って、含窒素化合物であるアゾベンゼン誘導体の還元反応をおこない、紫外可視吸収スペクトル変化および HPLC 分析によりそれぞれ化学量論的な反応が進行することを明らかにしている。
2. 天然に存在する電子伝達タンパク質であるシトクロム *c* のアポ体を利用して、二核鉄カルボニルクラスター含有タンパク質を構築し、完全水中における触媒的な光駆動水素発生反応をめざした。まず、二つのシステイン残基をもつシトクロム *c* のアポ体を既報の手法により調製し、さらに得られるアポ体タンパク質へ鉄カルボニル錯体を導入することに成功している。次に、得られる二核鉄カルボニルクラスター含有タンパク質を用いた完全水中における光駆動水素発生反応をおこない、ガスクロマトグラフィーによる定量分析で触媒的な水素発生を確認している。一方、二核鉄カルボニルクラスターを二つのシステイン残基で固定したペプチドによる光駆動水素発生反応では触媒回転数の低下が見られたことから、二核鉄カルボニルコアをタンパク質マトリクス中に挿入することによる効果が示され、効率的な水素発生を促す人工還元金属酵素の構築を達成している。
3. 分子内で機能する光駆動水素発生システムの構築をめざし、シトクロム *c* 群の一つであるシトクロム *c*₅₅₆ 中の部分アミノ酸配列オリゴペプチド内に光増感部位と触媒活性部位をそれぞれ導入し、分子内光誘起電子移動を伴った触媒的水素発生反応が可能な人工還元金属酵素の調製を達成している。具体的には、シトクロム *c*₅₅₆の部分構造ペプチドを ペプチド合成により調製し、二核鉄カルボニルペプチドの調製に続き、ポリピリジンルテニウム錯体を導入することで、分子内光誘起電子移動システムの構築を行った。さらに、得られた分子内光誘起電子移動システムを使った水素発生反応を追跡し、触媒的な水素発生反応を確認している。一方、コントロール実験として分子間光誘起電子移動システムを使った水素発生反応では、反応の進行が認められないことから、水素発生に対する分子内光誘起電子移動の有効性が認められた。

以上のように、本論文はタンパク質の特異的なアミノ酸配列に着目して、天然に存在するシステイン含有タンパク質を利用した新たな人工還元金属酵素の構築を達成している。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。