



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Preparation and Evaluation of Catalytic Properties of Myoglobins Reconstituted with Abiological Prosthetic Groups Toward Development of an Artificial Metalloenzyme |
| Author(s)    | 明眞, 裕之  |
| Citation     | 大阪大学, 2018, 博士論文  |
| Version Type | VoR   |
| URL          | <a href="https://doi.org/10.18910/69550">https://doi.org/10.18910/69550</a>   |
| rights       |   |
| Note         |   |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

|   |   |
|---|---|
| 氏名(明 珢 裕之)  |   |
| 論文題名  | Preparation and Evaluation of Catalytic Properties of Myoglobins Reconstituted with Abiological Prosthetic Groups Toward Development of an Artificial Metalloenzyme<br>(人工生体触媒の開発に向けた非天然金属錯体含有再構成ミオグロビンの調製と触媒反応挙動の解析) |
| 論文内容の要旨   |   |
| <p>金属酵素は、タンパク質マトリクス内部に一つ以上の金属イオンを内包した酵素の一群であり、常温・常圧・水中等の温和な条件下において、有機合成的に困難な化学反応の触媒として働く。近年、天然の金属酵素を模倣・凌駕する、あるいは天然の金属酵素では適応困難な化学反応の触媒として働く人工金属酵素の開発が注目を集めている。本研究では、機能と構造がよく明らかになっているヘムタンパク質の一種であるミオグロビンをタンパク質マトリクスとして選択し、ミオグロビン中に非天然補欠分子族として種々の金属ポルフィリノイド錯体を導入した。ミオグロビン中に導入する金属ポルフィリノイド錯体の設計指針として、ポルフィリン環の骨格構造の変換や中心金属の置換に注目した。</p> <p>初めに第二章では、非天然補欠分子族として、ポルフィリンの一つの窒素原子を酸素原子で置換したオキサポルフィリン鉄錯体を合成した。続いて天然ミオグロビンからヘムを取り除いたアポミオグロビン中に鉄二価のオキサポルフィリン錯体を挿入し再構成ミオグロビンを調製した。調製した再構成ミオグロビン中で鉄二価のオキサポルフィリン錯体は、空気中で自動酸化を受け鉄三価種を生じ、タンパク質マトリクスより解離するユニークな自動酸化反応挙動を示すことを明らかにした。また、天然ミオグロビンとは大きく異なる点として、鉄二価種含有再構成ミオグロビンはシアン化物イオンと反応することを見出した。この反応は天然の鉄三価ミオグロビンとシアン化物イオンの反応と比べて大幅に加速されていることを突き止めた。</p> <p>続いて第三章では、鉄ポルフィセン（ポルフィリン錯体の構造異性体）を有する再構成ミオグロビンのスチレンのシクロプロパン化反応における触媒反応挙動について詳細に評価した。特に、反応速度解析から再構成ミオグロビンは天然ミオグロビンよりきわめて高い触媒活性を示すことを明らかにした。さらに、反応の活性中間体である鉄カルベン錯体を分光学的手法を用いて再構成ミオグロビンの中で検出した。また理論計算から、ポルフィセンは活性なカルベン錯体の生成段階においてポルフィリンより有利に働くことが支持された。</p> <p>第四章では、マンガンポルフィセン含有再構成ミオグロビンを用いたC-H結合の水酸化反応挙動について詳細な評価と再構成ミオグロビンのX線結晶構造解析を行った。まず結晶解析からミオグロビンマトリクス中でマンガンポルフィセンは天然ミオグロビン中におけるヘムと同様の位置に保持されていることを確認した。また、触媒的水酸化反応において、反応活性種としてマンガン五価種が生成していることを分光学的解析により明らかにした。さらに、種々の基質を用いた速度論的解析により、基質からの水素原子引き抜きの段階が触媒反応の律速段階に関与していることを見出した。</p> <p>以上のように、鉄オキサポルフィリン-タンパク質複合体の調製、およびシクロプロパン化反応やC-H結合の水酸化反応を促進する人工金属酵素の開発、活性中間体の分光学的解析、および理論計算に基づく活性錯体の生成機構の評価を行った。本研究で得られた知見と金属錯体の設計指針は、今後種々の非天然反応を促進する人工金属酵素の開発に大いに貢献することと考えられる。</p> |   |

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏名(明眞裕之) |             |
|----------|-------------|
|          | (職) 氏名      |
| 論文審査担当者  | 主査 教授 林 高史  |
|          | 副査 教授 桑畠 進  |
|          | 副査 教授 井上 豪  |
|          | 副査 教授 櫻井 英博 |
|          | 副査 教授 南方 聖司 |
|          | 副査 教授 今中 信人 |
|          | 副査 教授 宇山 浩  |
|          | 副査 教授 町田 憲一 |
|          | 副査 教授 能木 雅也 |
|          | 副査 教授 古澤 孝弘 |

## 論文審査の結果の要旨

金属酵素は、タンパク質マトリクス内部に一つ以上の金属イオンを内包した酵素の一群であり、常温・常圧・水等の温和な条件下において、代謝や生合成を形成する化学反応の触媒として働く。一方、天然の金属酵素を模倣・凌駕する、あるいは天然の金属酵素では適応困難な化学反応の触媒として働く人工金属酵素の開発が近年注目を集めている。本研究では、機能と構造が明らかになっているヘムタンパク質の一種であるミオグロビンをタンパク質マトリクスとして選択し、ミオグロビン中に非天然補欠分子族として種々の金属ポルフィリノイド錯体を導入し、人工金属酵素としての創製をめざしている。具体的には、ミオグロビン中に導入する金属ポルフィリノイド錯体の配位子の環骨格構造の変換や中心金属の置換に焦点をあてて、研究を実施した。

第一章では概論として、種々の人工金属酵素の特徴や反応性について記している。

第二章では、非天然補欠分子族として、ポルフィリンの一つの窒素原子を酸素原子で置換したオキサポルフィリン鉄錯体の合成を実施している。続いて天然ミオグロビンからヘムを取り除いたアポミオグロビン中に鉄二価のオキサポルフィリン錯体を挿入し再構成ミオグロビンを調製している。調製した再構成ミオグロビン中で鉄二価のオキサポルフィリン錯体は、空气中で自動酸化を受けて鉄三価種を生じ、タンパク質マトリクスより解離するユニークな自動酸化反応挙動を示すことを明らかにしている。また、天然ミオグロビンと大きく異なる点として、鉄二価種含有再構成ミオグロビンはシアノ化物イオンと反応することを見出している。この反応は天然の鉄三価ミオグロビンとシアノ化物イオンの反応と比べて大幅に加速されていることを突き止めている。

続いて第三章では、鉄ポルフィセン（ポルフィリン錯体の構造異性体）を有する再構成ミオグロビンのスチレンのシクロプロパン化反応における触媒反応挙動について詳細に評価している。特に、反応速度解析から再構成ミオグロビンは天然ミオグロビンよりきわめて高い触媒活性を示すことを明らかにしている。さらに、反応の活性中間体である鉄カルベン錯体を分光学的手法を用いて再構成ミオグロビンの中で検出している。また理論計算から、ポルフィセンは活性なカルベン錯体の生成段階においてポルフィリンより有利に働くことを提唱している。

第四章では、マンガンポルフィセン含有再構成ミオグロビンを用いたC-H結合の水酸化反応挙動について詳細な評価と再構成ミオグロビンのX線結晶構造解析を行っている。まず結晶解析からミオグロビンマトリクス中でマンガンポルフィセンは天然ミオグロビン中におけるヘムと同様の位置に保持されていることを確認している。また、触媒的水酸化反応において、反応活性種としてマンガン五価種が生成していることを分光学的解析により明らかにしている。さらに、種々の基質を用いた速度論的解析により、基質からの水素原子引き抜きの段階が触媒反応の律速段

階に関与していることを見出している。

以上のように、鉄オキサポルフィリン-タンパク質複合体の調製、およびシクロプロパン化反応やC-H結合の水酸化反応を促進する人工金属酵素の開発、活性中間体の分光学的解析、および理論計算に基づく活性錯体の生成機構の評価を行っている。本成果は、今後種々の非天然反応を促進する人工金属酵素の開発に重要な指針を与えていた。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。