

Title	Metal Porphyrinoids Having Reaction Scaffolds toward Methyl-coenzyme M Reductase Models and an Active Metal Template System for Rotaxane
Author(s)	宮崎, 雄大
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/76522">https://doi.org/10.18910/76522</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏名 ( 宮崎 雄大 )

## 論文題名

Metal Porphyrinoids Having Reaction Scaffolds toward Methyl-coenzyme M Reductase Models and an Active Metal Template System for Rotaxane  
(金属ポルフィリノイドとその周辺の反応場を有したメチル補酵素M還元酵素モデルおよびロタキサンアクティブメタルテンプレートシステムの構築)

## 論文内容の要旨

ポルフィリンおよびその構造類縁体であるポルフィリノイドの金属錯体は、それらを含む金属タンパク質中において、タンパク質が供与する第一配位圏および第二配位圏により、その物理化学的性質や反応性が制御されることが知られている。このような金属タンパク質の機能の再現や応用を指向し、金属ポルフィリノイドに対して人工的な反応場の構築が報告されてきた。本博士論文では、金属ポルフィリノイドに対して適切な周辺反応場を構築し、天然におけるメタン発生酵素の機能モデル(第一章、第二章)およびActive Metal Template法に基づくロタキサン合成システム(第三章)を開発した。

第一章では、天然において生物学的メタン発生に大きく寄与するメチル補酵素M還元酵素 (MCR)に着目し、モデル錯体のニッケルテトラデヒドロコリン (Ni(TDHC))をアポミオグロビンに挿入することで、タンパク質を基盤とする機能モデルとして再構成ミオグロビンを調製し、その物理化学的性質および反応性を評価した。まず、モデル錯体のNi<sup>II</sup>(TDHC)を温和な還元剤であるジチオナイトにより還元し、ニッケル一価種を調製した。続いて、単純な構造を有し、補因子ヘム (鉄ポルフィリン)が疎水性ポケットに結合したミオグロビンを用い、ミオグロビンからヘムを除去したアポミオグロビンとNi<sup>II</sup>(TDHC)を複合化することで再構成ミオグロビンを調製した。この再構成ミオグロビンまたはタンパク質を含まないNi<sup>II</sup>(TDHC)錯体に対してそれぞれヨードメタンを添加すると、前者においてのみ触媒的なメタン発生が確認され、再構成ミオグロビンがMCRの機能モデルとして作用することを示した。さらに分光電気化学測定によりNi<sup>II</sup>/Ni<sup>I</sup>に対応する酸化還元電位を決定したところ、錯体のみ比べ、タンパク質中では0.11 V 負にシフトすることを明らかにした。これはタンパク質内部において活性中心直下に存在するヒスチジン残基からニッケル中心への軸配位の影響を示唆する結果であり、タンパク質内部の反応場が活性中心の反応性制御に大きく寄与することを実証した。

第二章では、モデル錯体のニッケルジデヒドロコリン (Ni(DDHC))をアポシトクロム $b_{562}$ に挿入することで、再構成シトクロム $b_{562}$ を調製し、より天然の酵素反応に近いメタン発生を実施した。すなわち、シトクロム $b_{562}$ はスルフィド結合を含み、天然の基質モデルとなるメチオニン残基を活性中心直上に有するため、Ni(DDHC)によるメチオニン残基のスルフィド結合の切断を介したタンパク質内部でのメタン発生を試みた。まず、モデル錯体として合成したNi<sup>II</sup>(DDHC)はNi<sup>II</sup>(TDHC)に比べ、ニッケル一価種の反応性の向上が期待され、実際に0.16 V負にシフトしたNi<sup>II</sup>/Ni<sup>I</sup>に対応する酸化還元電位が認められた。そこで、光増感剤存在下、調製した再構成シトクロム $b_{562}$ に対して可視光を照射し、系中にてニッケル二価種を光還元したところ、メタンの発生が認められた。反応前後におけるタンパク質の質量変化、およびメチオニン残基をロイシンへ変換した変異型再構成シトクロム $b_{562}^{ML}$ を用いた場合のメタン発生量の比較より、当該メチオニン残基がメチル基供与体として反応していることを明らかにした。さらに、タンパク質内部の活性中心近傍に天然の基質モデルとしてシステイン残基を導入した変異型再構成シトクロム $b_{562}^{L3C}$ を用いた場合、メタン発生量の増加が見られ、タンパク質内部の反応場における活性中心と、その周辺配位圏の配置の重要性を実証した。

第三章では、異種金属配位能を有するストラップポルフィリンを用いたActive Metal Template法に基づくロタキサン合成法の開発を実施した。まず、ポルフィリン骨格の上部にフェナントロリン部位を有するストラップポルフィリンにおいて、ポルフィリン部位に配位不飽和な亜鉛二価イオン、フェナントロリン部位に銅一価イオンを含む複合体を構築した。続いて、本複合体に対し、アルキン、アジド化合物を添加することで反応場における分子ユニットの選択的認識とそれに続くアジドアルキンクリック反応により、効率的なロタキサン合成を達成した。さらに、得られたロタキサンに対する金属イオン導入によりロタキサンの構造制御を達成した。

以上、本博士論文では、タンパク質との複合化および三次元状置換基の導入により金属ポルフィリノイドの周辺反応場を構築し、その機能拡張を達成した。本研究において得られた結果は様々な生体機能解明や超分子化学に基づいた構造体構築における指針となるものである。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 宮 崎 雄 大 )			
論文審査担当者		(職)	氏 名
	主 査	教授	林 高史
	副 査	教授	桑畑 進
	副 査	教授	宇山 浩
	副 査	教授	南方 聖司
	副 査	教授	今中 信人
	副 査	教授	櫻井 英博
	副 査	教授	町田 憲一
	副 査	教授	能木 雅也 (産業科学研究所)
	副 査	教授	古澤 孝弘 (産業科学研究所)

## 論文審査の結果の要旨

本論文は申請者が大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻博士前期課程、及び博士後期課程在学中に実施した金属ポルフィリノイドの周辺反応場構築に伴う機能開発に関する研究成果をまとめたものであり、全三章から構成されている。本論文では特に、タンパク質との複合化による天然酵素の機能モデルの構築と評価、及び三次元状置換基の導入によるActive Metal Template法に基づいたロタキサン合成法の開発について報告している。

第一章では、天然において生物学的メタン発生に大きく寄与するメチル補酵素 M 還元酵素 (MCR)に着目し、モデル錯体のニッケルテトラデヒドロコリンとアポミオグロビンを複合化することで、タンパク質を基盤とする機能モデルをめざした再構成ミオグロビンを調製し、その物理化学的性質および反応性を評価している。特に、再構成ミオグロビンへのヨードメタンの添加により、触媒的なメタンの発生を確認しており、本系が MCR の機能モデルとして作用することを示している。さらに分光電気化学測定より、 $Ni^{II}/Ni^I$  に対応する酸化還元電位が錯体のみに比べてタンパク質中では負にシフトすることを明らかにしている。これはタンパク質内部において活性中心直下に存在するヒスチジン残基からニッケル中心への軸配位の影響を示唆する結果であり、タンパク質内部の反応場が活性中心の反応性制御に大きく寄与することを明らかにしている。

第二章では、モデル錯体のニッケルジデヒドロコリンとアポシトクロム $b_{562}$ を複合化することで、機能モデルとして再構成シトクロム $b_{562}$ を構築し、より天然の酵素反応に近いタンパク質内部でのスルフィド結合開裂に伴うメタン発生を実施している。特に、光増感剤存在下、再構成シトクロム $b_{562}$ に対して可視光を照射したところ、シトクロム $b_{562}$ 内において活性中心直上に存在するメチオニン残基を由来としたメタンの発生を確認している。さらに、タンパク質内部の活性中心近傍に天然の基質モデルとしてシステイン残基を導入した変異型再構成シトクロム $b_{562}$ を用いてメタン発生量の向上を達成しており、タンパク質内部の反応場における活性中心と各基質の近接した配置の重要性を明らかにしている。

第三章では、異種金属配位能を有するストラップポルフィリンを用いたActive Metal Template法に基づくロタキサン合成法の開発を実施している。ポルフィリン骨格の上部にフェナントロリン部位を有するストラップポルフィリンにおいて、ポルフィリンおよびフェナントロリンそれぞれに異なる金属を配位させた複合体を構築し、続いてアルキン、アジド化合物を添加することで反応場における分子ユニットの選択的認識と、それに続くアジドアルキンクリック反応により、ロタキサン合成を達成している。

以上のように、本論文は、金属ポルフィリノイドに対し、適切な周辺反応場を構築することで生体機能解明や超分子構造体構築のための指針となる新たな知見を得ている。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。