

平成21年4月20日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007年度～2008年度
 課題番号：19750142
 研究課題名（和文） 非天然テトラピロール系補因子に対するヘムオキシゲナーゼの作用機構の詳細な解明
 研究課題名（英文） Investigation on the reaction mechanism of heme oxygenase having non-natural tetrapyrrolic cofactors
 研究代表者
 松尾 貴史（MATSUO TAKASHI）
 大阪大学・大学院工学研究科・講師
 研究者番号：50432521

研究成果の概要：生体内でヘム補因子の酸化分解に関与するヘムオキシゲナーゼについて、非天然合成ヘム類縁体を結合させたときの作用機構について、反応速度論および結晶構造解析によって検討した。その結果、補因子の化学構造および補因子とタンパク質の相互作用が、タンパク質機能に大きな役割を果たしていることが判明した。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 2,100,000 | 0 | 2,100,000 |
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 390,000 | 3,790,000 |

研究分野：生物無機化学、錯体化学

科研費の分科・細目：複合化学、生体関連化学

キーワード：ヘムオキシゲナーゼ、ポルフィセン、非天然補因子、速度論、酸化分解、血相構造解析

1. 研究開始当初の背景

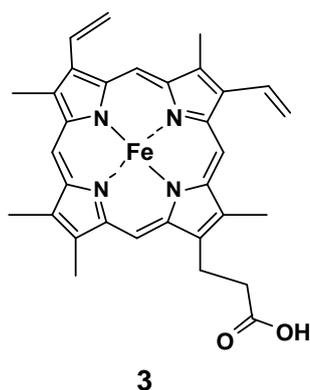
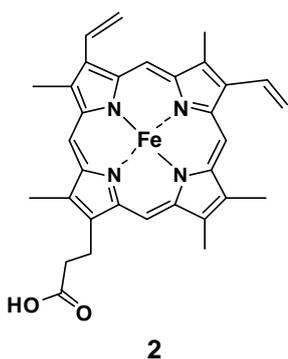
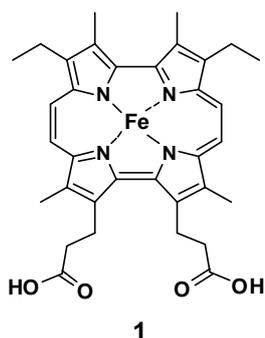
ヘムオキシゲナーゼは、生体内に存在するヘム分解酵素であり、生体内における鉄のリサイクルおよび抗酸化活性の発揮に関与していると考えられている。しかし、この酵素が過剰に機能すると、黄疸などの生体にとって好ましくない状態になると言われており、特に、乳幼児におけるヘムオキシゲナーゼの過剰発現は致死的要因とも言われている。そこで、阻害剤の開発も重要なテーマとなっていた。

2. 研究の目的

上記の事情を受けて、合成化学的見地より、ヘムオキシゲナーゼの阻害剤開発および機能制御の一方法として、ポルフィリン誘導体の1つであるポルフィセンやプロピオン酸欠損ヘムなどの非天然テトラピロール鉄錯体を開発し、酵素内に取り込まれたときの本酵素の作用機構について速度論実験による検証と、非天然補因子-複合体の構造の詳細な解明を目指した。

3. 研究の方法

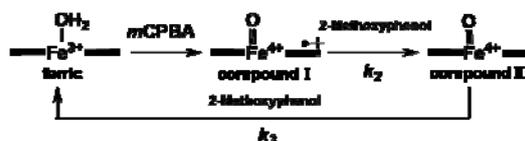
カルボン酸を2つ装着したポルフィセン鉄錯体 **1** およびプロピオン酸を欠損させたヘム **2** および **3** を合成し、この合成補因子を、大腸菌より発現させたラット由来ヘムオキシゲナーゼに導入し、ポルフィセン含有ヘムオキシゲナーゼ複合体を調製した。さらに、この複合体に対して、還元酵素、NADPH 存在下での還元速度の測定、分解挙動、生成物解析を実施し、天然補因子を結合させた場合との比較を試みた。さらに、非天然ヘムを結合させたときの外部基質の酸化反応についても検討し、「酸化酵素」としての機能評価を行った。



4. 研究成果

ポルフィセン鉄錯体を結合させたヘムオキシゲナーゼに対して、CO 雰囲気中、

CPR-NADPH による還元反応について反応速度を測定したところ、天然補因子と比較して、還元速度が 1/10 程度であることが判明した。このことは、酵素内に取り込まれたときの鉄のスピンの状態に起因しているものと考えられる。また、好気条件下で、紫外可視吸収スペクトルにより還元反応を追跡したところ、新たな吸収バンドの出現が認められ、メソ位のないポルフィセンにおいても酸化分解が進行することがわかった。しかし、分解速度が遅いことから、阻害剤として十分機能しうることが示唆される。また、酸化触媒酵素としての機能評価として、mCPBA による Fe(IV) 種の生成をストップフローにより確認後、外部基質存在下での速度論実験を実施した。



ヘムオキシゲナーゼ中での高酸化活性種の反応性は、HRP などの他の酸化酵素に比べると小さく、タンパク質構造の違いにより説明することができる。しかし、適切な酸化剤を選択することにより、補因子の分解を抑制して外部基質の酸化を行えることを示すことができた。

| Protein | Cofactor | k_2 ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) | k_3 ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) |
|---------|--------------|--|--|
| HO | heme | — ^a | 4.3×10^4 |
| HD | FePorphyrane | — ^a | 9.7×10^4 |
| HRP | heme | 6.6×10^4 | 3.1×10^4 |
| HRP | FePorphyrane | $> 10^4$ | 1.1×10^4 |

^a In 100 mM KPi/NaPi buffer pH 6.5 at 25°C
^b Cannot determine

さらに、プロピオン酸欠損ヘムを含むヘムオキシゲナーゼの結晶構造解析においては、ヘムプロピオン酸の位置の違いにより、ヘムの酵素内への取り込まれ方に差違のあることが判明した、このことは、ヘムオキシゲナーゼの作用機構の第一段階である「ヘムの酵素内への取り込み」において、プロピオン酸側鎖とタンパク質アミノ酸残基の相互作用が重要であることを示しており、位置選択的に酸化的分解が起こるメカニズムを明確にするための有用なデータである。このように、「補因子の合成化学的デザイン」により、タンパク質のアミノ酸変異法にアプローチとは相補的な反応メカニズムについての情報を得ることができ、ヘムオキシゲナーゼの反応機構を議論する上で、新たな点を付け加えることができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Takashi Matsuo, Takashi Hayashi
Electron Transfer and Oxidation
Activities of Reconstituted
Hemoproteins with Chemically Modified
Cofactor
J. Porphyrins. Phthalocyanines.
in press.
2. Takashi Matsuo, Atsushi Asano,
Tsutomu Ando, Yoshio Hisaeda, Takashi
Hayashi
Photocatalytic Hydrogen Generation
Using a Protein-Coated
Photosensitizer with Anionic Patches
and a Monocationic Electron Mediator.
Chem. Commun. **2008**, 3864-3686.
3. Kazuyuki Ito, Takashi Matsuo, Isao
Aritome, Yoshio Hisaeda, Takashi
Hayashi
Isolable Iron(II)-Porphycene
Derivative Stabilized by Introduction
of Trifluoromethyl Groups on the
Ligand Framework.
Bull. Chem. Soc. Jpn., **2008**, *81*,
76-83.
4. Takashi Matsuo, Kazuyuki Ito, Yuji
Nakashima, Yoshio Hisaeda, Takashi
Hayashi
Effect of Peripheral Trifluoromethyl
Groups in Artificial Iron Porphycene
Cofactor on Ligand Binding
Properties of Myoglobin.
J. Inorg. Biochem. **2008**, *102*,
166-173.
5. Takashi Matsuo, Kazuyuki Ito, Nobuko,
Kanehisa, Takashi Hayashi
A Structural Isomer of Nonaromatic
Porphyrin: Preparation of
20pi-Conjugated Porphycene Based on
Electronic Perturbation
Org. Lett. **2007**, *9*, 5303-5306.
6. Takashi Matsuo, Dai Murata, Yoshio
Hisaeda, Hiroshi Hori, Takashi
Hayashi
Porphyrinoid Chemistry in Hemoprotein
Matrix: Detection and Reactivities of
Iron(IV)-Oxo Species of Porphycene
Incorporated into Horseradish
Peroxidase
J. Am. Chem. Soc. **2007**, *129*, 12906-
12907.

[学会発表] (計 5 件)

1. 松尾貴史, 藤井道子, 阿部真人,
林 高史
「ヘムタンパク質中におけるポルフィ
センおよびコロール鉄錯体の高酸
化状態の検出と反応性」
第 58 回錯体化学討論会
2008.9.19 金沢大学角間キャンパ
ス
 2. Takashi Matsuo, Yuji Tohi, Kazuyuki
Ito, Takashi Hayashi
“Synthesis and Characterization of
20-pi Conjugated Porphycene
with Trifluoromethyl Groups”
5th International Conference on
Porphyrins and Phthalocyanines
2008.7.7. ロシア科学アカデミー
 3. 松尾貴史, 藤井道子, 阿部真人, 村田
大, 林 高史
「ヘムタンパク質マトリクス内におけ
るポリフィリノイド鉄錯体酸化活
性種の反応性」
第 22 回生体機能関連化学シンポジ
ウム
2007.9.30 東北大学片平キャンパ
ス
 4. Takashi Matsuo, Dai Murata, Masato
Abe, Michiko Fujii, Takashi Hayashi
“Reactivities of Porphyrinoid
Incorporated into Hemoprotein
Matrices”
The first Asian Conference on
Coordination Chemistry
2007.7.16. 岡崎コンファレンス
センター
 5. Atsushi Asano, Takashi Matsuo,
Hayashi Takashi
“Photo-induced Electron Transfer
of Reconstituted Myoglobin Having
Anionic Domain and Application to
Photocatalytic Hydrogen
Evolution”
The first Asian Conference on
Coordination Chemistry
2007.7.16. 岡崎コンファレンス
センター
6. 研究組織
(1) 研究代表者
松尾 貴史 (MATSUO TAKASHI)
大阪大学・大学院工学研究科・講師

研究者番号 : 50432521

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者