

機関番号:17102

研究種目:若手研究(B)

研究期間:2009~2010

課題番号:21750173

研究課題名(和文)チトクロム c 酸化酸素における酸素還元とその NO 阻害の化学モデル研究

研究課題名(英文) Chemical model studies on the mechanism of dioxygen reduction and NO-inhibition of cytochrome c oxidase

研究代表者

劉 勁剛(LIU JIN-GANG)

九州大学・先導物質化学研究所・特任准教授

研究者番号:70380540

研究成果の概要(和文):

呼吸鎖末端酵素のシトクロム c 酸化酵素(CcO)は生体エネルギー生成のために酸素から水への選択的四電子還元を触媒する。本研究課題は、CcOによる酸素還元機構ならびに一酸化窒素(NO)還元機構について、精密 CcO 化学モデルを用いて分光学的に解析することを目的とした。酸素還元反応において鍵となる反応中間体、および NO 還元における N-N 結合(N₂O)生成過程の重要な反応中間体について分光学的に解析し、CcO 酵素において本質的な His-Tyr クロスリンクの構造と機能の相関について洞察を得た。これらのモデル錯体の分光学的な解析は、酸素活性化および NO_x 除去分子触媒の分子設計に寄与する。

研究成果の概要(英文):

Cytochrome c oxidase (CcO), the terminal enzyme in the respiratory chain, catalyzes the 4e⁻ reduction of O₂ to H₂O with high energy efficiency to supply the energy for life. This project is intended to probe the possible mechanisms of O₂-reduction in CcO as well as its reactivity with nitric oxide (NO) through chemical models. Using our delicate designed synthetic models, we have clarified the plausible roles of the cross-linked His-Tyr motif as observed in the active site of CcO; we have generated and spectroscopically characterized important elusive intermediates species involved in the catalytic cycles of O₂-reduction as well as in the N-N bond formation of N₂O. The spectroscopic investigation of those models has contributed further valuable insights into the mechanisms of O₂-reduction in CcO; the results obtained may lend merit suggestions for future design of molecular catalysts for O₂-reduction and NO_x removing.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野: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:酵素反応、モデル化、分子認識、シグナル伝達、生物無機化学

1. 研究開始当初の背景

呼吸鎖中における末端酸化酵素の一つであるチトクロムc酸化酵素(CcO)は、低い過電圧で超酸化物イオンや過酸化水素等の有害な酸素活性種を生成することなく熱力学的に好ましい酸素の水への4電子還元を触媒している。現在までのところ酸素分子のO-O結合開裂過程および酸素分子の還元的触媒反応に対する活性中心に存在する新規なHis-Tyr交差縮合体の役割は十分解明されていない。一方、生体中では一酸化窒素合成酵素(NOS)により合成される酵素一酸化窒素(NO)は多くの病態生理学的な過程に含まれる基本的な二次メッセンジャーとしてよく知られている。この分子はCcOの反応を阻害することにより細胞呼吸の調節の原因となることが知られている。CcOのNO阻害は活発に研究されてきているが、その詳細な分子レベルでの反応機構はまだ確立されていない。合成CcOモデルを用いたNO阻害反応機構の研究は極めて少ない。

6配位一酸化窒素結合型ヘムおよびその一電子還元種のヘム-ニトロキシル(HNO/NO⁻)付加体は、バクテリア由来一酸化窒素還元酵素やシトクロム酸化酵素によって触媒される一酸化窒素還元において中間体として存在しうると考えられている。これら金属酵素による一酸化窒素還元では、N-N結合を生成して亜酸化窒素(N₂O)を生成することが知られている。ヘム-ニトロキシル付加体について、これまでに金属蛋白質、およびモデル錯体との反応により研究されてきたが、その不安定な性質から詳細な分子構造および反応性については理解されていない。

2. 研究の目的

(1)そこで、われわれが既に合成している、CcO活性中心に含まれる全ての残基を含む化学モデルを用いて次の事項の解明を行う。CcOにおける酸素還元反応において交差縮合したTyr(ウシ心筋CcO, Tyr-244)の第4の電子供与体あるいはプロトン供与体としての可能性の検証。

(2)この呼吸酵素の活性を制御するNOによるCcOの分子レベルでの可能な阻害機構を明らかにする。更に、CcOや関連金属酵素においてN₂Oの生成の際の窒素-窒素結合形成段階に含まれるとされている鍵中間体、6配位(6C)ヘム鉄(III)ニトロキシル種(HNO/NO⁻)の捕捉と同定を行うこと目的とする。

3. 研究の方法

(1)CcO化学モデルを用いたヒドロオキシ中間体の生成と同定: 低温にてモデル分子の酸素化によりヘム-ペルオキシ架橋銅錯体

(中間体A)を発生させ、ヘムスーパーオキシ錯体(中間体B)へと変換する。このヘムスーパーオキシ錯体にCoCp₂(1当量)を加えることによりペルオキシ錯体とする。この超分子構造(Im-Ph-OH)中でプロトン化が進む状況次第で、外部からプロトン源としてMeOHを加えることによりヒドロペルオキシ錯体とする。生成する中間体Cは紫外可視、EPR、共鳴ラマン(rR)等の種々のスペクトル法により同定する。とりわけ、EPRスペクトルは特徴的な低スピン鉄(III)スペクトルを与えると考えられ、他の既知のヒドロペルオキシ体と比較する。rRスペクトルはO-OとFe-O伸縮振動を観測するのに使用する。重水素化したFeOODにおいてみられる同位体シフトにより生成するヒドロペルオキシ錯体の構造を確証する。

(2)オキシ鉄(IV)中間体の生成と同定: 低温にて中間体Cの溶液に1当量の一塩基酸、HBF₄またはHPF₆を加えることにより中間体Dが生成する。この反応においてO-Oが開裂すると考えられる: O-O結合の開裂様式により、不均等開裂の場合、オキシ鉄(IV)ポルフィリンカチオンラジカル(Compound I, P⁺FeIV=O)、均等開裂の場合、オキシ鉄(IV)ポルフィリン(Compound II, PFeIV=O)の生成が考えられる。銅(I)錯体がヘムFeOOH部分近傍に存在していることからオキシ鉄(IV)ポルフィリンが優先的に生成することが考えられる。この反応は完全還元型CcOにおけるO-O結合開裂と同一である。低温紫外可視、EPRおよび共鳴ラマン等のスペクトル法により生成する中間体Dを同定する。銅(II)に特有の信号がEPRより、またFe=O伸縮振動の共鳴ラマン分光による同定を目指す。

(3)化学モデルとNOの反応性: CcOモデルとNOの反応性に関する初期的検討還元型および酸化型CcOモデル分子とNOの反応について、電子供与性および電子吸引性置換基を導入したポルフィリンヘム錯体を用いて一酸化窒素の反応において一酸化窒素付加体の性質および反応について、低温下でのスペクトル法(UV-vis, EPRおよび共鳴ラマン)による追跡を行い、反応の概略を検証する。

4. 研究成果

ヘム酵素の化学モデルを用いて、NOとの反応と密接に関連した酸素活性化反応における鍵中間体としてend-on型ペルオキシおよびヒドロペルオキシ鉄(III)錯体について明瞭なスペクトルによる同定を行った。生体を規範として合理的に分子設計したヘム錯体を用いることで、一酸化炭素結合型ヘムの性質および反応性について以下の知見を得た。

(1) End-on 型ペルオキシおよびヒドロペルオキシ鉄(III) ポルフィリンの溶液中での生成と分光学的同定：酸素配位サイト上部に修飾官能基を有し、同時に共有結合で固定したイミダゾール軸配位子を持つヘムモデルを用いて、還元体と次の連続した反応、酸素との反応/一電子移動/プロトン化、により、溶液中で対応する end-on ペルオキシおよびヒドロペルオキシ鉄(III) 錯体の選択的合成と捕捉に成功した (Fig. 1)。これは化学モデル研究としては初の例である。

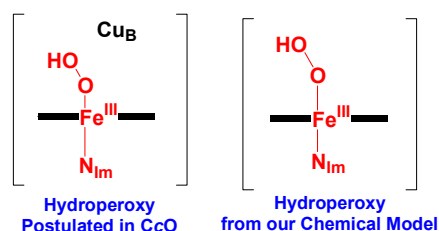


Fig. 1 Schematic structures of postulated key intermediate of hydroperoxy (Compound 0) in CcO and this intermediate captured from our chemical model.

(2) チトクロム *c* 酸化酵素モデルにおけるヒドロペルオキシ中間体の生成と分光学的同定：チトクロム *c* 酸化酵素(CcO)：紫外可視およびEPR スペクトルにより、CcO 活性中心に存在する官能基等を全て備えた「完全活性中心モデル」を用いて、還元体より酸素付加体(スーパーオキシ錯体)の一電子還元およびメタノールによるプロトン化を観測した。

(3) CcO モデルにおける鉄(IV) オキシ中間体の生成と分光学的同定：2 で生成したヒドロペルオキシ中間体へ、酸添加による更なるプロトン化により酸素-酸素結合が解裂して生成したと考えられる鉄(IV) オキシ種の観測に成功した。

(4) 電子供与性および電子吸引性置換基を導入したポルフィリンと一酸化窒素の反応において一酸化窒素付加体の合成に成功した。室温で安定な一酸化窒素付加体は各種分光法(電子遷移吸収、電子スピン共鳴、赤外吸収、共鳴ラマン分光法)により解析し、その詳細な分子構造を明らかにした。

(5) 6 配位一酸化窒素結合型ヘムをコバルトセンで還元することにより、6 配位ヘム-ニトロキシル(NO^-)錯体の生成に成功し、その性質は、各種分光法により同定した (Fig. 2)。

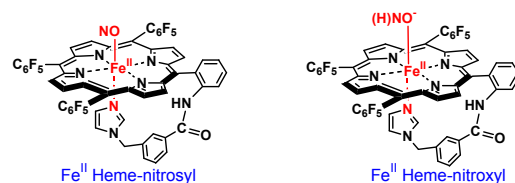


Fig. 2 Chemical structures of the heme-nitrosyl and heme-nitroxyl species generated from our chemical models.

(6) 6 配位一酸化窒素結合型ヘムを液体窒素凍結下で γ 線照射することにより得たサンプルを共鳴ラマン分光により解析することで、ヘム-ニトロキシル(HNO)が生成することを見出した (Fig. 2)。モデル錯体において初めて本化学種の生成に成功した例である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① J.-G. Liu; Y. Naruta, Probing dioxygen activation mechanisms in heme-containing enzymes by heme models, *Indian J. Chem.* (査読あり), 50A, (2011), 363-373.
- ② J.-G. Liu; Y. Shimizu; T. Ohta; Y. Naruta Formation of an End-On Ferric Peroxo Intermediate upon One-Electron Reduction of a Ferric Superoxo Heme, *J. Am. Chem. Soc.* (査読あり), 132, (2010), 3672-3673.
- ③ J.-G. Liu; T. Ohta; Y. Yamaguchi; T. Ogura; S. Sakamoto; Y. Maeda; Y. Naruta *Angew. Chem. Int. Ed.* (査読あり), 48, (2009), 9262-9267.
- ④ J.-G. Liu; T. Ohta; F. Tani; Y. Naruta Using Synthetic Models to Probe the O_2 Metabolic Mechanism in Heme-Containing Enzymes, *G-COE Journal*, (査読無), 3 (2009), 30-36.

[学会発表] (計 15 件)

- ① 太田雄大・劉勁剛・成田吉徳・依田芳卓・斎藤真器名・小林康浩・瀬戸誠 酸素活性化ヘム酵素モデル錯体の振動分光学的研究、日本化学会第 91 春季年会、2011 年 3 月 29 日、横浜。
- ② J.-G. Liu, T. Ohta, Y. Naruta, Preparation and spectroscopic characterization of the elusive heme-nitroxyl complexes, *The 91th*

- Annual Meeting of Chemical Society of Japan*, 2011/03/26, Yokohama.
- ③ P. Nagaraju, J.-G. Liu, T. Ohta, Y. Naruta, Preparation of Bio-inspired Catalyst for O₂ Reduction, *The 91th Annual Meeting of Chemical Society of Japan*, 2011/03/26, Yokohama.
- ④ J.-G. Liu, T. Ohta, Y. Naruta, Bio-inspired Model Compounds for Oxygen Activation and Reduction, *I2CNER Workshop, Kyushu University*, 2011/02/04, Fukuoka.
- ⑤ J.-G. Liu, T. Ohta; Y. Shimizu & Y. Naruta, Solution Capturing End-On Peroxo and Hydroperoxo Intermediates of Heme Enzymes, *2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010)*, 2010/12/19, Honolulu/USA.
- ⑥ Y. Naruta, J.-G. Liu, T. Ohta, A. C. Maity, Y. Shimizu, F. Tani, Activation and catalytic reduction of dioxygen: Lessons from heme enzyme chemical models, *2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010)*, 2010/12/17, Honolulu/USA.
- ⑦ J.-G. Liu, T. Ohta; Y. Naruta, Capturing Ferrous-Superoxo, Ferric-Peroxo and Ferric-Hydroperoxo Intermediates in Heme Models, *60th Anniversary Conference on Coordination Chemistry Chem. Commun. Symposium*, 2010/09/28, Osaka.
- ⑧ J.-G. Liu, T. Ohta; Y. Naruta, Synthetic Heme Models Mimic the Formation of Peroxo- and Hydroperoxo-heme Intermediates Relevant to Dioxygen Activation in Heme-containing Enzymes, *Asian International Symposium on Inorganic Chemistry and Coordination Chemistry, Organometallic Chemistry*, 2010/03/28, Osaka
- ⑨ J.-G. Liu; T. Ohta; Y. Shimizu; Y. Naruta, Spectroscopic characterization of side-on and end-on (hydro)peroxo-heme intermediates, *The 90th Annual Meeting of Chemical Society of Japan*, 2010/03/28, Osaka.
- ⑩ J.-G. Liu, T. Ohta; Y. Naruta, Spectroscopic Characterization of Peroxo/Hydroperoxo Heme Intermediates: Opening a Closed Side-on Peroxy to an End-on Hydroperoxy, *The 10th International Workshop on Future Molecular Systems-Recent Development in Phorphyrin-related Chemistry*, 2010/02/19, Fukuoka.
- ⑪ 太田雄大・劉勁剛・千代健文・谷文都・成田吉徳、ヘム-ペルオキシ種の合成と分光学による同定、大学間連携第5回物質合成シンポジウム、2009年11月19日、京都府。
- ⑫ J.-G. Liu, T. Ohta, Y. Shimizu, Y. Naruta, Synthetic heme models to mimic the formation of ferric peroxo and hydroperoxo intermediates involved in heme-containing enzymes, *The 59th Symposium of Coordination Chemical Society of Japan*, 2009/09/26, Nagasaki.
- ⑬ J.-G. Liu, T. Ohta, S. Yamaguchi, T. Ogura, Y. Naruta, Preparation of Low-spin End-on Ferric-Peroxo and Ferric-Hydroperoxo Species by a Heme Model Complex Bearing an Imidazole Tail, *The 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC-14)*, 2009/7/27, Nagoya.
- ⑭ Y. Naruta, J.-G. Liu, T. Ohta, T. Ogura, Simulation of O₂ activation/reduction with enzyme active site models of terminal oxidases, *The 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC-14)*, 2009/7/26, Nagoya.
- ⑮ J.-G. Liu, T. Ohta; Y. Naruta, Spectroscopic Characterization of End-on Heme Peroxide and Hydroperoxide Intermediates Relevant to Dioxygen Activation Mechanism of Heme-containing Enzymes, *PreICBIC-Frontiers in Bioinorganic Chemistry*, 2009/07/24, Fukuoka.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

劉 勁剛 (LIU JIN-GANG)

九州大学・先導物質化学研究所・特任准教授

研究者番号：70380540

(2) 連携研究者

太田 雄大 (OHTA TAKEHIRO)

九州大学・先導物質化学研究所・助教

研究者番号：70509950