

酵素と金属錯体による代謝と代謝モデルの酸化還元 制御

竹中, 慎

<https://hdl.handle.net/2324/2236193>

出版情報 : 九州大学, 2018, 博士 (工学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

氏 名 : 竹中 慎

論 文 名 : 酵素と金属錯体による代謝と代謝モデルの酸化還元制御

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

生物の代謝において酸化還元に関わる反応は分岐点となり、正常細胞の機能に影響を与える。代謝の酸化還元制御は生命制御につながっており、代謝経路を構成する各反応の酸化還元制御について検討することは生命制御に関わる知見や技術の獲得につながる。本論文では2つの分岐点に注目した。分岐点1はピルビン酸の反応である。正常細胞では、ピルビン酸は酸化的脱炭酸反応により様々な生体物質の前駆体であるアセチル-CoAへ変換される(図1:A)。一方、がん細胞では、ピルビン酸から乳酸への還元反応が亢進している(ワールブルグ効果)。このことから、ピルビン酸の酸化反応は生命制御において非常に重要である。この酸化反応で生成するアセチル-CoAは、有用生体物質生産や代謝関連の研究分野で需要があるため、有機合成化学的・生化学的手法によるアセチル-CoA合成に関する研究が行われている。分岐点2は、電子伝達系における酸素分子の還元である。酸素分子の4電子還元では水が生じるが、不十分な還元では活性酸素種(Reactive Oxygen Species, ROS)が生じる。活性酸素種である過酸化水素が鉄イオンと反応して(フェントン反応)生じるヒドロキシルラジカルはRNAやDNAといった核酸を酸化し、ガンや老化など疾病の原因となる。錯体化学の分野では、金属イオンと過酸化水素によるフェントン反応で生じるヒドロキシルラジカルを活性種としたRNA・DNAの酸化反応について多数報告されている。一方、生体内に存在している金属イオンと酸素分子の反応によって生じる金属結合型酸素活性種も、RNAやDNAの酸化に関与していると考えられるが、研究例が非常に少なく、より詳細な研究が必要である(図1:C)。また、8-オキソグアニンのような酸化型核酸塩基の還元反応を検討することは、RNAやDNAの酸化的損傷に対する新たな修復機構開発への知見の獲得につながると考えられる(図1:D)。本論文では、酵素と金属錯体による代謝と代謝モデルの酸化還元制御を検討し、新たな技術や知見の獲得を目的とした。具体的には、*Citrobacter* sp. S-77由来ピルビン酸-フェレドキシン酸化還元酵素(PFOR_{S77})の固定化と酸化的脱炭酸反応制御によるアセチル-CoA生成反応(第2章:酵素による代謝の酸化反応制御)、水中でのルテニウムペルオキシ錯体を介した酸素分子によるグアノシン-リン酸の酸化反応制御(第3章:金属錯体による代謝モデルの酸化反応制御)、金属錯体による酸化型核酸塩基の還元反応制御(第4章:金属錯体による代謝モデルの還元反応制御)を行った。

第2章では、ピルビン酸の酸化によるアセチル-CoAの生成反応(図1:A)を利用した新しいアセチル-CoA合成法を開発した。この反応を触媒する新規ピルビン酸-フェレドキシン酸化還元酵素(PFOR_{S77})を細菌*Citrobacter* sp. S-77から単離・精製した。ヒドロキシアパタイト粒子とアルギン酸ハイドロゲルを用いてPFOR_{S77}を固定化した。作製した固定化PFOR_{S77}はピルビン酸の酸化的脱炭酸反応によるアセチル-CoA生成反応を触媒でき、触媒回転頻度(k_{cat})は 37 s^{-1} であった。固定化することで、触媒の繰り返し利用が可能となり、10回使用時でも初期活性の68%を維持した。

第3章では、酸素分子を活性化できるルテニウム錯体 $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5)(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^+$ による、水中で

のグアノシンーリン酸の酸化反応 (図 1 : C) について詳細に評価した。ルテニウム錯体は酸素分子を活性化し、ペルオキシ錯体 $[\text{Ru}^{\text{IV}}(\eta^2\text{-O}_2)(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5)(\text{bpy})]^+$ を生じた。このペルオキシ錯体については X 線結晶構造解析に成功した。また、このペルオキシ錯体は、水中で RNA の構成成分であるグアノシンーリン酸を 8-オキソグアノシンーリン酸に酸化した。酸化生成物については、高速液体クロマトグラフィー分析、 ^1H NMR 測定、ESI 質量分析、同位体ラベル実験で詳細な評価を行った。

第 4 章では、金属錯体を用いて、酸化型核酸塩基 (8-オキソグアノシン) の還元反応 (図 1 : D) について検討した。水素と反応してヒドリド錯体を形成するルテニウム錯体と 8-オキソグアノシンの反応を検討し、目的の還元生成物であるグアノシンの検出を試みたが、反応の進行は確認できなかった。これまでの研究で 8-オキソグアノシンの還元反応についての報告がないことから、市販の還元試薬を用いた反応についても検討した。市販の還元試薬のうち、ボランジメチルスルフィド錯体を用いた反応条件では、目的とするグアノシンとは異なるが何らかの反応生成物が確認できた。

本論文では、第 2 章においてピルビン酸の酸化によるアセチル-CoA の生成反応を触媒する酵素 PFOR_{S77} を利用した新しいアセチル-CoA 合成法を開発した。本研究は PFOR を固定化し、アセチル-CoA 合成へ応用した初めての例であり、アセチル-CoA 合成に関する研究分野に対し、新たな可能性を提示できた。第 3 章では、酸素分子由来の金属結合型酸素活性種による核酸塩基の酸化反応を、活性種であるペルオキシ錯体の単離や酸化生成物の検出、同位体ラベル実験によって初めて詳細に評価した。得られた知見は、これまで十分に検討されていなかった金属結合型酸素活性種による RNA・DNA の酸化反応に関する研究領域の進展に寄与するものである。第 4 章ではルテニウムヒドリド錯体や市販の還元試薬を用いて、酸化型核酸塩基である 8-オキソグアノシンの還元反応の検討を行ったが、目的の還元生成物であるグアノシンは確認できなかった。今後、今回用いた錯体よりも還元力の強い錯体の使用や、還元試薬の検討によって反応の基礎的な知見が得られる可能性がある。このように本研究を通して得られた成果が、代謝の酸化還元制御に関わる研究領域の今後の進展に寄与し、生命制御に関わる新たな技術の開発や知見の獲得につながっていくことを期待する。

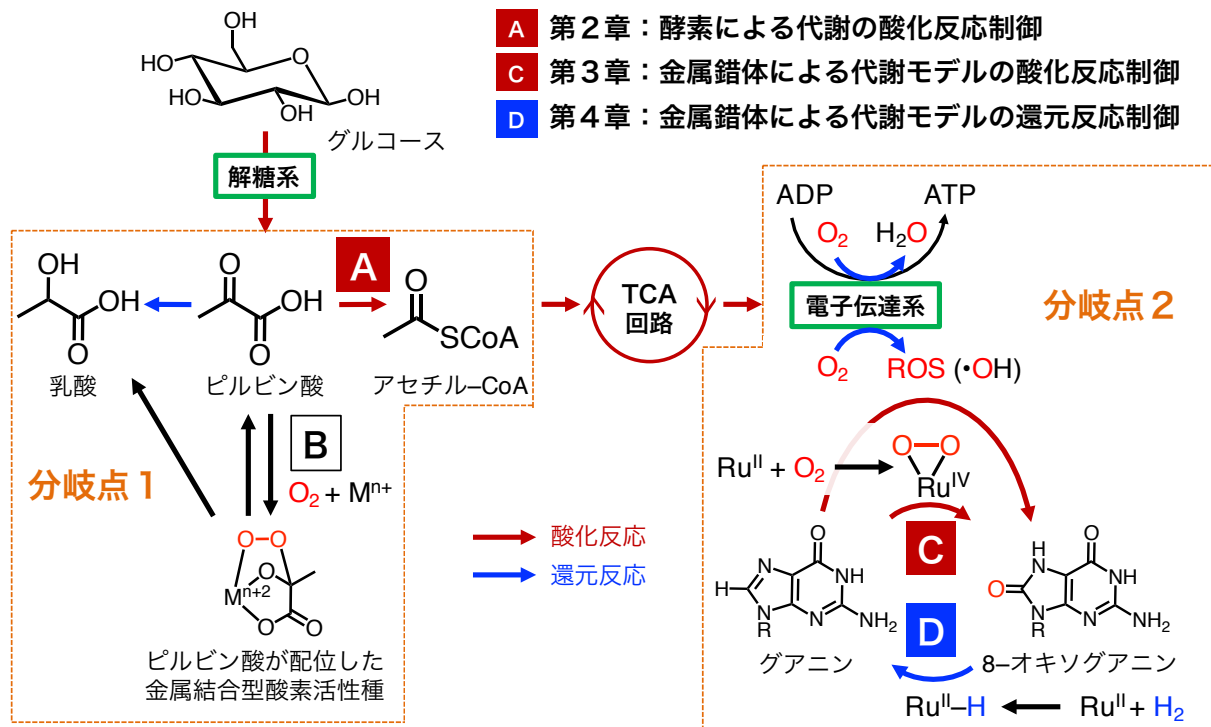


図 1. 本論文の概略図. 酵素による代謝の酸化反応制御 (A : 第 2 章)、金属錯体による代謝モデルの酸化反応制御 (C : 第 3 章)、金属錯体による代謝モデルの還元反応制御 (D : 第 4 章).