特集

バイオミメティック 電子移動反応(1)

“バイオミメティック電子移動反応”を特集して

生体分子と同じ、もしくは類似した機能を持つ分子を合成してその機能を調べる、いわゆるバイオミメティック化学の研究は、生体分子の構造や機能が分子レベルで解明されるにつれ、また、有機精密合成の技術が進歩するにつれ、ますます生体分子を人工的に作るという夢を現実に近づけています。そのアプローチとしては、生体分子の構造を模倣した人造分子を合成することだけでなく、構造は異なるものの、機能の類似性を追究した分子の合成と機能発現の模索も行われています。これらの研究は、生体反応を模倣するというにとどまらず、今までに無い、新規な機能性分子の合成と反応システムの構築にもつながっています。本特集では、特に生体内における電子移動反応を人工的に実現するための分子の設計、合成、そして機能を調べる研究の最先端に位置されている研究者の方々に、この分野の先駆的な成果について紹介して頂きました。

(桑畑 進 大阪大学大学院工学研究科)

1 新しいオルトキノン系補酵素の 酸化還元機能

伊東 忍

1 はじめに

今から約 20 年前、メタノール酸化性菌のメタノール脱水素酵素から新しい補酵素が単離され、その構造が X 線結晶構造解析によって明らかにされた¹⁾。このものはピリジン環とピロール環という電子的に相反する性質を有する二つの複素環に挟まれたオルトキノン骨格を有し、PQQ (Pyrroloquinolinequinone) と命名された (以前は Methoxatin と呼ばれていた)。当時、脱水素酵素系の補酵素としてはフラビンと NAD(P)(H) のみが知られていたので、PQQ はこれらに次ぐ第三の補酵素として注目された²⁾。その後、バクテリア由来の各種アルコール脱水素酵素やグルコース脱水素酵素にも PQQ の存在が確認され、その一般性が示された。一方、これを機に当時補酵素がまだ確定されていなかった酸化還元酵素群についても精力的に研究が展開され、銅含有アミン酸化酵素、メチルアミン脱水素酵素、およびリジン酸化酵素からそれぞれ TPQ (Topa Quinone)³⁾、TTQ (Tryp-

tophan Tryptophylquinone)⁴⁾、および LTQ (Lysine Tyrosylquinone)⁵⁾ などの新しいキノン系補欠分子 (Cofactor) が相次いで発見され、注目を集めた (Chart 1)。PQQ 以外のキノン系補欠分子はいずれも酵素活性中心に存在するアミノ酸側鎖が翻訳後化学修飾を受けて生成したものである。最近の X 線結晶構造解析の発展に伴い、酵素の高分解能 X 線結晶構造が入手可能となり、その後さらに新しいアミノ酸由来の補欠分子が幾つか発見されている。

補酵素は比較的単純な構造を有しているにもかかわらず、多くの生体反応において中心的役割を担っている。従って、化学者の目から見れば、新しい触媒や機能性化合物の開発において、補酵素が格好の手本となる。補酵素の構造-活性相関を明らかにすれば、酵素の反応機構を明らかにできるのみならず、そこから新しい触媒や生理活性物質をデザインするための重要な手がかりが得られる。以上のような観点から、筆者らは「新しいオルトキノン系補酵素の化学的機能の解

明」について種々検討を行って来た^{6,7)}。本稿では主に、補酵素 PQQ の非水有機溶媒中における酸化還元挙動についての最近の成果をまとめて紹介する。酵素活性中心は一般に疎水的な環境にあるため、水分子が自由に出入り出来ない場となっている。従って、補酵素の酸化還元機能の詳細を議論するためには非水系における酸化還元挙動を知ることが重要となる。

2 補酵素 PQQ によるアルコールの酸化反応

PQQ はメタノール脱水素酵素の活性中心において、メタノールの酸化反応を司っている⁸⁾。一般にメタノールの様な低級の一級アルコールは酸化反応を受けにくく、例えば DDQ やクロラニルのような非常に高い酸化活性を有するキノン化合物を用いる合成反応において溶媒としても使用可能である。それでは PQQ がどのようにしてメタノールを酸化するのであろうか。もちろん酵素活性中心ではアミノ酸側鎖による酸塩基触媒作用が期待できるが、PQQ 自身にも何か「からくり」があるに違いない。

メタノール脱水素酵素の X 線結晶構造に関する最近の研究により、補酵素 PQQ の近傍にはカルシウムイオンが存在

し、PQQ の 5 位のキノン酸素と 6 位のピリジン窒素、および 7 位に存在するカルボキシル基の三点で強く結合されていることが明らかにされた (Fig. 1)^{9,10)}。カルシウムイオンは生体系に非常に多く存在する金属イオンであるが、ほとんどの場合、生体分子の構造保持因子として機能していると考えられている。我々は酵素の結晶構造を見て、メタノール脱水素酵素の場合には、カルシウムイオンが酸化還元反応の触媒としても重要な働きをしているのではないかと考え、モデル系からこの問題にアプローチした。

まず始めに補酵素 PQQ とカルシウムイオンとの相互作用について検討を行った。はじめにも述べたとおり、酵素の活性中心は比較的高い疎水性の高い環境にあることが知られているので、それを考慮して非水有機溶媒中で検討を行った。有機溶媒に可溶化させるため、我々は PQQ のエステル誘導体である $1_{ox}H$ や $2_{ox}H$ を用いた^{11,12)}。その結果、非酵素系においても PQQ とカルシウムイオンはかなり強く結合することが判明した (錯形成定数 K_{ML} は $1_{ox}H$ の場合 $1,900M^{-1}$, $2_{ox}H$ の場合 $5,700 M^{-1}$)¹²⁾。各種分光学的データや分子軌道計算の結果から、非酵素系においても酵素系の場合と同様、5 位のキノン酸素、6 位のピリジン窒素、および 7 位のカルボニル酸素で挟まれた分子の窪み部分で配位していることが判った (Fig. 2)^{11,12)}。さらに興味深いことに、一連のアルカリ土類金属の中ではカルシウムイオンが最も強く錯形成すること

Chart 1

Chart 2

Fig. 1 メタノール脱水素酵素の活性中心 (文献 8 より転記)

Fig. 2 分子軌道計算 (PM 3 法) で算出した $1_{ox}H$ のカルシウム錯体の最安定化構造¹²⁾

が判った。理論計算の結果から、このようなカルシウムイオン選択性は、金属結合サイトの大きさとカルシウムイオンの大きさが丁度フィットしているためであることが示唆された¹²⁾。

PQQのエステル誘導体に基質であるメタノールやエタノールの様なアルコールを作用させると、5位のキノン炭素に容易に付加反応が起こり、ヘミアセタール体 1_{ox} に変換される (Chart 2)^{11,12)}。このようなアルコールの付加平衡反応はカルシウムイオンにより大きく加速された¹²⁾。さらに DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene) のような塩基を共存させると、ここからさらに酸化還元反応が室温で効率良く進行し、PQQのキノール型還元体と対応するアルデヒドが定量的に生成することを見出した^{11,12)}。Fig. 3 には反応の進行に伴う紫外可視吸収スペクトルの変化を示した^{11,12)}。このような反応はカルシウムイオンが存在しない場合には全く進行しなかった。すなわち、カルシウムイオンがPQQによるアルコールの酸化反応には必須であるといえる。さらに、この反応を好気性条件下で行うと、PQQの還元体が酸素で酸化され、元のキノン体が再生するため、アルコールの酸化反応が触媒的に進行した (エタノールの酸化反応では、PQQ基準で1650%)。Fig. 3 に示したスペクトル変化を基にして速度論的に検討を行い、本反応がヘミアセタール型中間体を経る付加-脱離機構 (Scheme 1) で進行していることを明らかに

Fig. 3 $1_{ox}H$ のカルシウム錯体によるエタノールの酸化反応に伴うスペクトル変化、アセトニトリル中、25°C、DBU 共存系

Scheme 1

Scheme 2

することができた。さらにヘミアセタール型付加中間体からの基質部位の酸化的脱離段階において、PQQの1位のピロールプロトンの脱離に伴う分子内一般塩基触媒効果 (Scheme 2) が本反応の鍵となっていることを各種モデル化合物を用いた系統的な検討から明らかにすることができた。このような反応機構において、カルシウムイオンはヘミアセタール型中間体の安定化と、付加したアルコールの α 水素と塩基部位として働く4位のキノン酸素とを接近させるために重要な役割を果たしている (Scheme 2)^{11,12)}。以上のように、モデル系において酵素反応機構を明らかにすると共に、カルシウムイオンの触媒作用を分子レベルで解明することに成功した。

3 補酵素 PQQ の電気化学的挙動

アルコールの二電子酸化により得た電子は、一電子ずつ段階的にチトクローム系へ伝達される⁸⁾。この過程でPQQはキノール型還元体からセミキノラジカル体を経て元のキノン体へ戻る。従って、このような電子伝達過程の詳細を知るためには、PQQの一電子酸化還元電位や中間体であるセミキノラジカル種の電子構造等を知る必要がある。我々はこの点についてもモデル系で検討した。

補酵素 PQQ は、中性の水溶液中において可逆な酸化還元波を示し、その二電子酸化還元電位は -175 mV vs. SCE である¹³⁾。一方、非水有機溶媒中においてPQQのトリメチルエステル体 $1_{ox}H$ は、一見非常に複雑なサイクリックボルタモグラムを与えた (Fig. 4)¹⁴⁾。

トリメチルエステル体の1位のピロールプロトンをメチル基で置き換えたモデル化合物 $1_{ox}Me$ や、1位のプロトンを塩基で引き抜いて得たカリウム塩 $1_{ox}^-K^+$ を用いて詳細に検討した結果、Fig. 4 に示したような一見複雑な電気化学的挙動は、下記のように説明できた。すなわち、還元ピーク (I) でキノン体 $1_{ox}H$ が一電子還元を受け、セミキノラジカルアニオン $1_{rad}H^-$ が生成する (Eq. 1)。生成した $1_{rad}H^-$ は塩基性を有するため、元のキノン体 $1_{ox}H$ からピロールプロトンを引き抜いて、中性のラジカル種 $1_{rad}H_2$ と 1_{ox}^- を与える (Eq. 4)。中性のラジカル種 $1_{rad}H_2$ は容易に不均化を起こして元の酸化体 $1_{ox}H$ とキノール型二電子還元体 $1_{rad}H_3$ に変換される (Eq. 6)。還元ピーク (II) では、酸塩基平衡 (Eq. 4) のマイナー成分である $1_{rad}H^-$ が、また、還元ピーク (III) で

Fig. 4 $1_{ox}H$ の CH_2Cl_2 中におけるサイクリックボルタモグラム¹⁴⁾

は、(Eq. 4)で生成した 1_{ox}^- がそれぞれ一電子還元を受けて $1_{rad}H^{2-}$ と 1_{rad}^{2-} に変換される (Eqs. 2, 3). Eq. 2 で生成した $1_{rad}H^{2-}$ もやはり強塩基なので $1_{ox}H$ からピロールプロトンを引き抜いて $1_{rad}H^{2-}$ と 1_{ox}^- を与えると予想される (Eq. 5). 以上のような電極還元および酸-塩基反応, 不均化を経て生成した 1_{rad}^{2-} , $1_{rad}H^{2-}$, $1_{rad}H_2^-$, および $1_{rad}H_3$ がそれぞれ酸化ピーク (IV), (V), (VI), および (VII) で一電子酸化を受ける (Eqs. 7-10)¹³. 以上のように, 非水系では酸化還元と酸塩基反応が絡み合って PQQ の酸化還元電位が大きく変わることが判明したが, このようなプロトン移動に伴う酸化還元の制御は酵素系においても達成されているものと考えられる. 同様な酸化還元挙動はフラビン補酵素でも報告されているが¹⁵, 相対的に見て PQQ の方がフラビンよりも 0.4 V 程度酸化還元電位が高いことが判った.

1 位の活性プロトンを持たない $1_{ox}Me$ では, 上記のような酸化還元に伴う酸塩基反応が起こらないので, -0.90 V vs.

Chart 3

reduction

acid-base equilibrium

disproportionation

oxidation

Equations

Fc/Fc⁺に可逆な一電子酸化還元ピークのみを与える¹⁴. ここへカルシウムイオンを添加すると, このピークが 0.5 V 以上も正側にシフトした¹⁴. 従って, 酵素系においても PQQ の酸化能力は, カルシウムイオンと相互作用することにより, free な状態に比べかなり高められているものと考えられる.

4 PQQ のラジカルアニオン種の電子構造

PQQ の一電子還元体であるセミキノンラジカルアニオン種の電子状態は, 電解 ESR 法¹⁶を用いて解明することができた¹⁴. Fig. 5 には一例として CH_2Cl_2 中と CH_3CN 中で測した $1_{rad}H^-$ の ESR スペクトルとそのシミュレーションスペクトルを示した. シミュレーションから得られた超微細結合定数 (*hfs*) を分子軌道計算の結果を基に帰属した結果も合わせて示した. 超微細結合定数の大きさから各原子上のスピン密度の分布の様子が判るが, CH_2Cl_2 のように溶媒の極性が低い場合, 電子スピンは分子全体に非局在化してラジカルアニオン種が安定化されているのに対して, CH_3CN のような極性有機溶媒中では, 逆にキノン部位に比較的多くのスピンの局在化して溶媒和を受ける方が安定であるという興味深い結果であった¹⁴. また, カルシウムイオンが配位することによって, 電子スピンのさらにカルシウム結合部位近傍に引きつけられることも判明した.

Fig. 5 ラジカルアニオン $1_{rad}H^-$ の ESR スペクトル. (A) CH_2Cl_2 中, (B) CH_3CN 中, (C) カルシウム存在下, CH_3CN 中

5 おわりに

以上、補酵素 PQQ の物性と機能についてモデル化学的な立場から検討した最近の結果を簡単にまとめて紹介した。PQQ 分子自身、カルシウムイオンと非常に効率良く錯形成を行えるように設計されており、しかもメタノールの様な低級アルコールを効率よく酸化するための工夫（分子内一般塩基触媒作用など）が、上手く組み込まれていることが判った。さらに、1位のピロールプロトンの解離によって、PQQ 自身の酸化還元電位を大きく変化させることができることも判明した。また、電子伝達反応における重要な中間体であるラジカルアニオン種の電子構造を初めて明らかにするとともに、それに及ぼす溶媒やカルシウムイオンの効果を明らかにすることができた。以上のような成果は、酵素系の反応機構の解明のみならず、新しい電子伝達触媒や生理活性物質の開発に繋がることを大いに期待する。我々はまた新しいキノン系の補欠分子 TTQ の全合成にも成功し¹⁷⁾、その物性や化学的性質¹⁸⁾およびアミンの酸化反応機構^{19,20)}についても詳細に検討を行って来たが、今回は紙面の都合上省略した。最後に、本研究を推進するに当たり大変お世話になった大阪大学大学院工学研究科の福住俊一教授およびその研究室の皆さまに心より感謝申し上げる次第である。

文 献

- 1) S. A. Salisbury, H. S. Forrest, W. B. T. Cruse, and O. Kennard, *Nature*, **280**, 843 (1979).
- 2) J. A. Duine and J. Frank, *Trends Biochem. Sci.*, **6**, 278 (1981).
- 3) S. M. Janes, D. Mu, D. Wemmer, A. J. Smith, S. Kaur, D. Maltby, A. J. Burlingame, and J. P. Klinman, *Science*, **248**, 981 (1990).
- 4) W. S. McIntire, D. E. Wemmer, A. Chistoserdov, and M. E. Lidstrom, *Science*, **252**, 817 (1991).
- 5) S. X. Wang, M. Mure, K. F. Medzihradsky, A. L. Burlingame, D. E. Brown, D. M. Dooley, A. J. Smith, H. M. Kagan, and J. P. Klinman, *Science*, **273**, 1078 (1996).

- 6) Y. Ohshiro and S. Itoh, *Bioorg. Chem.*, **19**, 169 (1991).
- 7) S. Itoh and Y. Ohshiro, *Natural Product Reports (The Royal Society of Chemistry, UK)*, **12**, 45 (1995).
- 8) C. Anthony, *Biochem. J.*, **320**, 679 (1996).
- 9) M. Ghosh, C. Anthony, K. Harlos, M. G. Goodwin, and C. Blake, *Structure*, **3**, 177 (1995).
- 10) Z. Xia, W. Dai, Y. Zhang, S. A. White, G. D. Boyd, and F. S. Mathew, *J. Mol. Biol.*, **259**, 480 (1996).
- 11) S. Itoh, H. Kawakami, and S. Fukuzumi, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 439 (1997).
- 12) S. Itoh, H. Kawakami, and S. Fukuzumi, *Biochemistry*, **37**, 6562 (1998).
- 13) K. Kano, K. Mori, B. Uno, T. Kubota, T. Ikeda, and M. Senda, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **24**, 193 (1990).
- 14) S. Itoh, H. Kawakami, and S. Fukuzumi, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 7271 (1998).
- 15) A. Niemz, J. Imbriglio, and V. M. Rotello, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 887 (1997).
- 16) H. Ohya-Hishiguchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **52**, 2064 (1979).
- 17) S. Itoh, M. Ogino, M. Komatsu, and Y. Ohshiro, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 7294 (1992).
- 18) S. Itoh, M. Ogino, S. Haranou, T. Terasaka, T. Ando, M. Komatsu, Y. Ohshiro, S. Fukuzumi, K. Kano, K. Takagi, and T. Ikeda, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 1485 (1995).
- 19) S. Itoh, N. Takada, S. Haranou, T. Ando, M. Komatsu, Y. Ohshiro, and S. Fukuzumi, *J. Org. Chem.*, **61**, 8967 (1996).
- 20) S. Itoh, M. Taniguchi, and S. Fukuzumi, *Chem. Commun.*, 329 (2000).

●著者プロフィール

氏名：伊東 忍 Shinobu ITOH
 所属：大阪市立大学大学院理学研究科物質分子系専攻（〒558-8585 大阪市住吉区杉本 3-3-138）
 役職：教授
 趣味：車、阪神タイガースの応援

2 酸化還元反応を触媒とする 含マンガンタンパク質のモデル反応

成田 吉徳

1 はじめに

マンガンイオンは酸素原子に対する親和性が高く水と酸素分子の相互変換に深くかかわっている。これは Mn イオンが Mn^{II} から Mn^{VII} の間の多様な酸化状態をとれること、d 軌道電子数、それぞれのイオン間の還元電位の大きさがその大きな理由である。現在までのところ、酵素中のマンガンイオンは Mn^{II}~Mn^{IV} の原子価をとることが知られている。

レドックスを伴うマンガン含有酵素としては、マンガンスーパーオキシドディスムターゼ (Mn-SOD)、マンガカタラーゼ (Mn-CAT)、酸素発生錯体 (OEC) の 3 種類が主要な酵素である。いずれもマンガンイオンの酸化還元を伴って

反応が起こる。興味あることに、反応に関与する電子数と活性中心に含まれるマンガンイオン数が一致している。この他に、特異なヘム-マンガンハイブリッド錯体を有するマンガンペルオキシダーゼ¹⁾が知られており、結晶構造が解明されている²⁾。また、二酸素原子添加酵素としてマンガンジオキ