

銅タンパク質による酸素の活性化



研究ノート

伊 東 忍*

Dioxygen Activation by Copper Proteins

Key Words : Copper Protein, Active Oxygen Species, Hydroxylation

1 はじめに

活性中心に単核や二核および多核の銅イオンを有する金属タンパク質は、分子状酸素 (O_2) の運搬や活性化、有機・無機基質の酸化に伴う O_2 の多電子還元、および電子移動反応などを司っており、動物から植物および菌体に至る幅広い生態系に存在する。¹ O_2 を還元的に活性化して、脂肪族や芳香族化合物の酸素化反応を触媒するものに、ドーパミン - モノオキシゲナーゼ (Dopamine -monooxygenase, D M)、ペプチジルグリシン - アミデイティング・モノオキシゲナーゼ (Peptidylglycine -amidating monooxygenase, PAM)、チロシナーゼ (Tyrosinase, Tyr)、膜結合型メタンモノオキシゲナーゼ (Particulate methane monooxygenase, pMMO) などがある。D M や PAM は2つの銅イオンを持っているが、それらの間には直接的な相互作用はなく、本質的には単核の銅活性中心で酸素の活性化と基質の酸素化反応が行われ、その酸化活性種は単核銅(II)スーパーオキシ種 (図4のA) であると考えられている。これに対して、Tyr では二核の銅活性中心に結合したサイドオン型のペルオキシ種 (図4のE) が活性酸素中間体であり、これは O_2 の運搬を行うヘモシアニン (Hemocyanin, Hc) やカテコールの酸化を触媒するカテコール酸化酵素 (Catechol oxidase, CO) にも含まれている。ごく最近、

pMMO の結晶構造が解かれ、ここでも二核銅 - 酸素活性種の関与が示唆されている。

基質の酸化に伴う O_2 の二電子還元を司る酵素としては、単核の銅中心を有するアミン酸化酵素 (Amine oxidase, AO) やガラクトース酸化酵素 (Galactose oxidase, GO) などが知られている。AO や GO の場合には銅イオンの他に、活性中心に存在するアミノ酸のチロシン残基が翻訳後化学修飾 (Post-translational modification) を受けて生成した新規な有機補欠分子が基質の酸化反応に関与している。一方、 O_2 を四電子還元して二分子の水を与える銅タンパク質も幾つか知られており、三核銅中心を有するマルチ銅酸化酵素 (アスコルビン酸化酵素 (Ascorbate oxidase)、ラッカーゼ (Laccase)、セルロプラズミン (Ceruleoplasmin)) や、ヘム鉄と単核銅からなるヘテロ二核金属中心を含むチトクローム c 酸化酵素 (Cytochrome c oxidase, C c O) などが知られている。これらのタンパク質には反応活性中心の銅とは別に電子伝達部位として機能する単核および二核の銅中心も存在する。その他、ブルー銅タンパク質として知られているプラストシアニン (Plastocyanin) やアズリン (Azurin) などは、酵素間の電子伝達を司り、亜硝酸還元酵素 (Nitrite reductase, NiR) やスーパーオキシドジスムターゼ (Superoxide dismutase, SOD) はそれぞれ NO_2^- の還元や O_2^- の分解を触媒する。また、クエルセチン - 2,3 - ジオキシゲナーゼ (Quercetin-2,3-dioxygenase, 2,3-QD) は銅イオンを含む唯一の二原子酸素添加酵素 (Dioxygenase) として注目されている。

このような一連の銅タンパク質による酵素触媒反応、特に O_2 の活性化を伴う反応は、活性中心にヘム鉄を含む一連のヘムタンパク質 (ヘモグロビン、ミオグロビン、チトクローム P450、カタラーゼ、カテコールジオキシゲナーゼなど) の機能と類似し



*Shinobu ITOH

1958年9月生
 大阪大学・大学院工学研究科・応用精密化学専攻 博士後期課程修了 (1986年)
 現在、大阪大学大学院工学研究科・生命先端工学専攻・物質生命工学コース 教授 工学博士 生体機能関連化学、生物無機化学
 TEL : 06-6879-7932
 FAX : 06-6879-7935
 E-mail : shinobu@mls.eng.osaka-u.ac.jp

っており、その機能解明と応用に大きな関心が寄せられてきた。しかし、銅タンパク質には鉄ポルフィリンのような強い吸収を有する発色団が存在しないため、詳細な分光学的研究は遅れているのが現状である。幾つかの銅タンパク質については最近、結晶構造が明らかにされ、銅活性中心の詳細な構造に関する情報が提供されるようになった。しかしO₂の活性化機構の詳細については未だ不明な点が残されている。

本稿では、二核の銅中心（一般にタイプ - 3銅とよばれている）を有し、O₂の活性化や運搬を司るチロシナーゼ (Tyr) およびヘモシアニン (Hc) の化学的機能に焦点を当て、最近の研究を紹介する。²

2 チロシナーゼの反応機構

チロシナーゼ (Tyr) は、高等動物から植物、菌体、微生物にいたる非常に幅広い生態系に存在し、O₂を用いてフェノールからカテコールへの酸素化反応 (式1) とカテコールからオルトキノンへの酸化反応 (式2) を触媒する。このような反応はメラニン色素の生合成過程の初期段階であるとともに、果物や野菜の変色、怪我の治癒、免疫防御など、生化学的に重要な反応にも含まれている。反応の活性種については図1に示したようなサイドオン型のペルオキシ二核銅(II)錯体 (図4のE) であることが分か

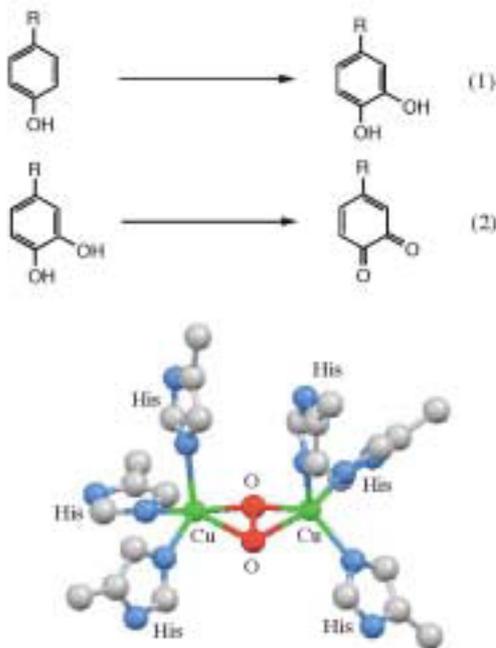
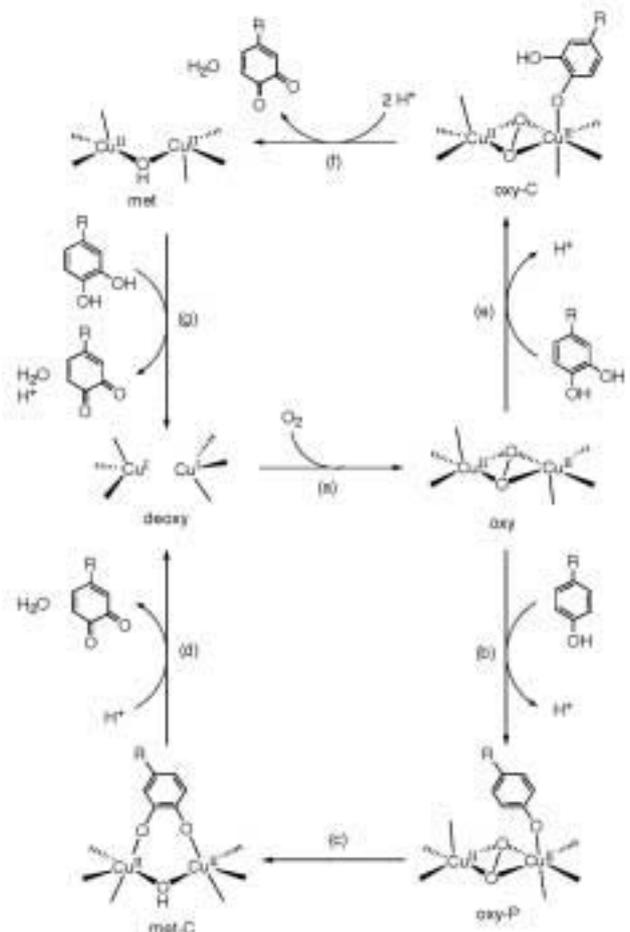


図1．酸素結合型チロシナーゼ (Oxy-tyrosinase) の活性中心の構造³

っているが、反応系が複雑性のため (スキーム1) 詳細なメカニズムはわかっていない。

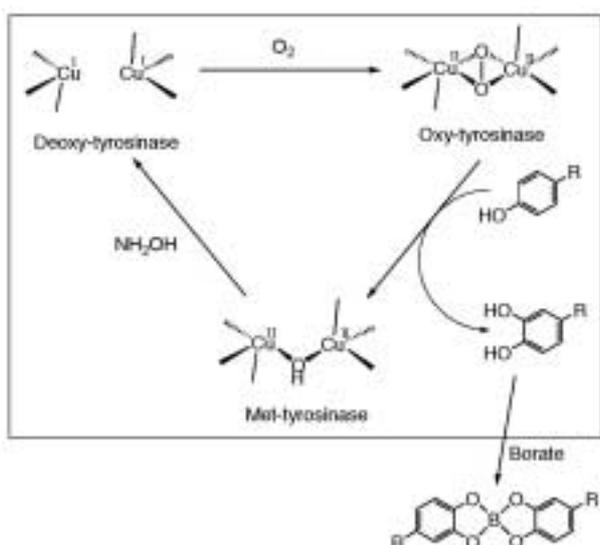
チロシナーゼの触媒サイクル (スキーム1) の中でも、ペルオキシ種 (E) によるフェノールの水酸化反応 (スキーム1の過程c) は、分子状酸素による不活性なC-H結合の活性化を含んでいるため有機合成化学的にも興味深い反応である。

我々はそのメカニズムを解明するため、マッシュルームから単離したチロシナーゼを用いて、フェノールの水酸化過程のみを調べることでできるシンプルな酵素反応系を開発した (スキーム2)⁴。0.5Mのホウ酸緩衝溶液 (pH 9.0) を用いることにより、生成するカテコールを触媒系 (スキーム2の四角で囲んだ部分) から排除し、カテコールからオルトキノンへの酸化サイクル (スキーム1の上半分の触媒サイクル) を遮断した。こうすることにより、触媒系がシンプルになり、オルトキノンからメラニン色素への二次的な反応を抑えることができる。しかし、この場合には、メト型チロシナーゼ (Met-tyrosinase)

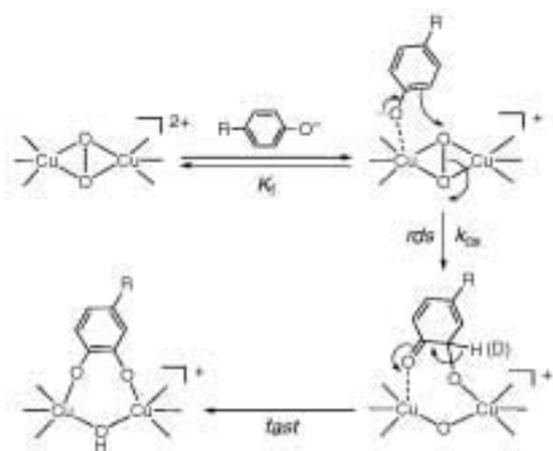


スキーム1．チロシナーゼの推定触媒サイクル

からデオキシ型チロシナーゼ (Deoxy-tyrosinase) への還元過程 (スキーム 1 の過程 d) も抑制してしまうことになり、触媒サイクルが回らなくなってしまう。そこで、外部還元剤としてヒドロキシルアミン (NH₂OH) を添加した。その結果、期待通りフェノールからカテコールへの酸化反応のみが触媒的に進行し (スキーム 2)、水酸化過程のみを詳細に検討することが可能となった。詳細な速度論的解析 (基質濃度依存性、速度論的同位体効果、ハメットプロット) や同位体標識実験などの結果から、フェノールの水酸化反応は、ペルオキシ基による基質芳香族環への求電子付加反応機構で進行していることが判明した (スキーム 3)。



スキーム 2 . シンプル化したチロシナーゼの触媒サイクル



スキーム 3 . Oxy-tyrosinase によるフェノールの水酸化反応機構 (芳香族求電子置換反応機構)

筆者らはさらに、チロシナーゼを触媒とする過酸化水素の分解反応 (カタラーゼ反応) や、過酸化水素を酸化剤として用いたフェノールの水酸化反応の開発にも成功した。⁵

3 酸素運搬タンパク質 ヘモシアニンの機能改変

ヘモシアニンは軟体動物 (タコやイカなど) や節足動物 (昆虫やエビなど) の体内で酸素運搬体として働いている。機能的にはほ乳動物などの血液中存在するヘモグロビンと同じであるが、活性中心にはヘム (鉄 II) ポルフィリン錯体) とは全く異なる二核銅中心 (タイプ 3 銅) が存在する。この場合にもタンパク質の X 線結晶構造解析が行われており、図 2 に示したようなサイドオン型のペルオキシ二核銅 (II) 錯体 E であることがわかっている。⁶

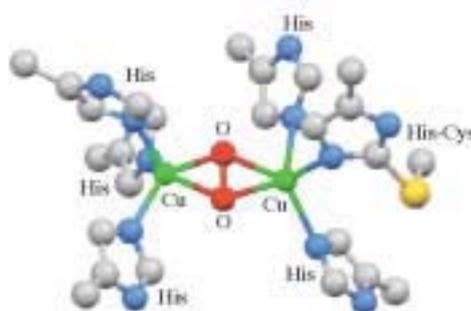


図 2 . 酸素結合型ヘモシアニン (Oxy-hemocyanin) の活性中心の構造⁵

同じ構造の活性種を有しているにもかかわらず、ヘモシアニンは O₂ の可逆的な吸脱着を行うのみで、外部から加えた基質を酸化することは出来ない。このような機能の違いは、活性中心を覆っているタンパク質部分の構造の違いによるものと考えられる。最近、ヘモシアニンのタンパク質の構造を少し変更することにより、本来備わっていなかった酸化機能を発現するようになってきた。⁷

例えば、タコの血液から単離したヘモシアニンを尿素で前処理することにより、フェノールの水酸化反応が効率よく進行するようになる。⁷ 図 3 には酸素結合型ヘモシアニン (Oxy-hemocyanin) によるフェノールの水酸化反応を紫外 - 可視吸収スペクトルで直接追跡したものを示す。ペルオキシ種に起因する 348 nm 付近の強い吸収が反応の進行と共に減

少し、対応するカテコール誘導体が定量的に得られた。この場合にも、詳しい速度論的解析結果から、チロシナーゼの場合と同様の芳香族求電子置換機構で進行していることがわかった。⁸

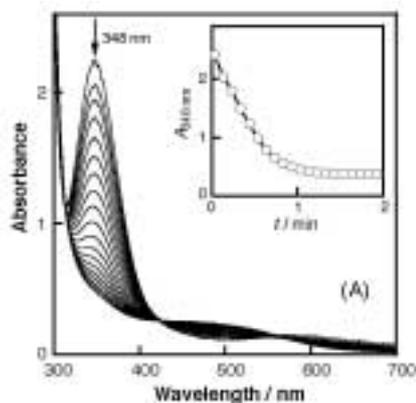


図3 . Oxy-hemocyanin による p - クレゾールの酸化反応における紫外 - 可視吸収スペクトルの変化

4 モデル錯体

これまでは活性中心に二核の銅サイト(タイプ3銅)を含む金属酵素(チロシナーゼとヘモシアニン)の酸化機能について述べてきたが、その他にも単核や三核の銅中心でO₂を結合して活性化したり、多電子還元を行ったりする酵素はいくつも知られている(「1. はじめに」を参照)。¹ これらの酵素反応機構の解明や触媒反応などへの応用を目指して、比較的単純なモデル錯体を用いた研究も活発に行われている。その結果、単核(A~C)、二核(D~F)、三核(G) および四核(H、I)の銅 - 酸素錯体が合成され、それらの構造や分光学的特性、および反応性が明らかにされてきた(図4)。モデル錯体を用いる研究の利点は、酵素系では検知できないような単寿命中間体でも、配位子や反応条件(特に反応温度の低温化)を工夫することにより、捕まえることが出来るようになることである。また、分光学的特性や反応性などについてもより詳細な情報が入手可能となる。^{9, 10, 11}

現在までに、酵素系においてその存在が直接確認されているものは単核のエンドオン型スーパーオキシ銅(II)錯体Aとサイドオン型二核銅(II)錯体Eのみであるが、pMMOにおけるビス(μ - オキシ)二核銅(III)錯体Fの関与や、マルチ銅酸化酵素に

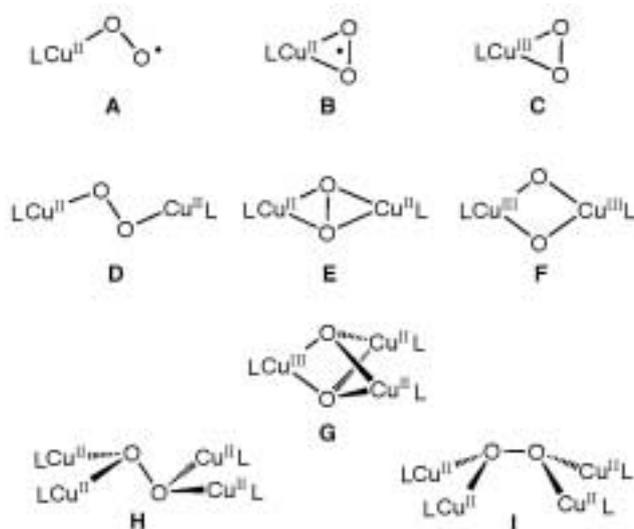


図4 . 結晶構造が決定されている単核(A~C)、二核(D~F)、三核(G) および四核(H、I)の銅 - 酸素錯体(配位子Lの構造は省略)

おける混合原子価三核銅(II, II, III)錯体Gなどの存在も示唆されており、今後モデル研究からの情報が酵素機能解明に対して大きく貢献するものと思われる。また、これらの酸素錯体を駆使した新しい酸化触媒系の開発についても大いに期待が寄せられている。

5 おわりに

以上、銅タンパク質の機能解明に関する最近の研究のごく一旦を紹介した。銅タンパク質にはヘムタンパク質のような強い発色団が存在しないため、タンパク質そのものを扱った研究は非常に難しかった。一方、銅 - 酸素錯体の化学については、モデル分野での研究がここ20年余りで飛躍的に発展し、酵素機能の解明に対して多くの重要な情報を提供してきた。今後これらの情報を基にして更に銅タンパク質の機能解明と応用が発展するものと期待される。

1) H. A. Halcrow, P. F. Knowles, and S. E. Phillips, "Handbook on Metalloproteins" eds. by I. Bertini, A. Sigel, H. Sigel, Marcel Dekker, Inc., New York, 2001, p 709.

2) S. Itoh and S. Fukuzumi, *Acc. Chem. Res.* **40**, 592-600 (2007).

3) Y. Matoba, T. Kumagai, A. Yamamoto, H. Yoshitsu,

and M. Sugiyama, *J. Biol. Chem.* **281**, 8981 - 8990 (2006).

4) S. Yamazaki and S. Itoh, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 13034 - 13035 (2003).

5) S. Yamazaki, C. Morioka, and S. Itoh, *Biochemistry*, **43**, 11546 - 11553 (2004).

6) M. E. Cuff, K. I. Miller, K. E. van Holde, and W. A. Hendrickson, *J. Mol. Biol.*, **278**, 855 - 870 (1998).

7) C. Morioka, Y. Tachi, S. Suzuki and S. Itoh, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 6788 - 6789 (2006).

8) K. Suzuki, C. Shimokawa, C. Morioka, and S. Itoh,

Biochemistry, **47**, 10150 - 10157 (2008).

9) A. Kunishita, J. Teraoka, J. D. Scanlon, T. Matsu-
moto, M. Suzuki, C. J. Cramer, and S. Itoh, *J. Am.
Chem. Soc.* **129**, 7248 - 7249 (2007).

10) A. Kunishita, H. Ishimaru, S. Nakashima, T.
Ogura, and S. Itoh, *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 4244 -
4245 (2008)

11) A. Kunishita, M. Kubo, H. Sugimoto, T. Ogura,
K. Sato, T. Takui, and S. Itoh, *J. Am. Chem. Soc.*
131, 2788 - 2789 (2009).

