

学位論文題名

Superoxide Dismutase の銅 - 亜鉛モデル錯体
の溶液内構造と反応機構の研究

学位論文内容の要旨

生体には、組織をスーパーオキシドアニオン O_2^- から保護する金属酵素として超酸化物不均化酵素 (superoxide dismutase : SOD) が存在している。銅と亜鉛がイミダゾラトによって架橋された活性中心を持つ Cu-Zn SOD においては、銅イオンが基質 O_2^- との電子移動に関与し、亜鉛イオンは活性中心の構造維持の機能を果たしていると考えられている。

本研究では、提唱されている Cu-Zn SOD の反応機構の妥当性を評価することを目的とし、活性部位の構造を再現するモデル錯体に関して溶液化学の立場から分光学的性質、酸化還元挙動、SOD 活性などの諸性質を測定した。特に、これまで SOD モデル錯体において注目されることの少なかった亜鉛の効果に注目し、銅 - 亜鉛イミダゾラト架橋に重点をおいた活性部位の構築を行った。

溶液中で二核活性中心を構築する SOD モデル錯体を得るため、二核化配位子である大環状ヘキサミン L を用いて銅 (II) 二核錯体 $[Cu_2L(im)]^{3+}$ 1, $[Cu_2L(OH_2)_2]^{4+}$ 2 を合成した。さらに、溶液中における銅 - 亜鉛二核錯体生成の可能性を検討するために、亜鉛 (II) 二核錯体 $[Zn_2L(im)]^{3+}$ 3, $[Zn_2L(OH_2)_2]^{4+}$ 4 を合成し、溶液内挙動について銅 (II) 錯体との比較を行った。L は大環状骨格内に二つの *m*-キシリル基を有する 6 座配位子であり、このキシリル基によって配位部位がそれぞれ 3 座と 3 座に隔てられた構造を持つ。分子力学法 (MM2) を用いてモデル錯体の最適構造を検討した結果、L の二核錯体 $[M_2L]^{4+}$ は、二つの金属イオンが Cu-Zn SOD における金属間距離 (6.3 Å) に近い距離で固定され、架橋配位子の有無によって影響を受けないことが示された。また、錯形成によって L 内のキシリル基は約 6 Å の距離で対面型の配置をとり、架橋イミダゾラトを約 3 Å 間隔で挟み込む。L は芳香環同士の π - π 相互作用によって二核活性中心近傍に架橋配位子を配向させる配位子として機能する。よって、1 は Cu-Zn SOD の、2 は活性中心からイミダゾラト架橋を除去した変異性の構造モデルと見なすことが可能である。

1H -NMR スペクトルより、 $[M_2L]^{4+}$ は、イミダゾールの存在下、溶液中で金属間イミダゾラト

架橋構造を形成することが確認された。4 の $^1\text{H-NMR}$ は亜鉛の交換のためにシグナルがブロード化しているが、3 は架橋によって構造が固定されるためにカップリングが確認できる。電位差滴定を用いて得られた 2, 4, および銅(II)単核錯体 $[\text{CuL}(\text{OH}_2)]^{2+}$, 亜鉛(II)単核錯体 $[\text{ZnL}(\text{OH}_2)]^{2+}$ の錯形成定数より、溶液中で銅(II)二核錯体が極めて安定であることが示された。 $[\text{M}_2\text{L}]^{4+}$ の配位水の pK_a は 7.3 - 8.4 である。配位水による金属イオン間の架橋構造を否定する値であり、溶液中の $[\text{M}_2\text{L}]^{4+}$ は金属間距離が約 6.5 Å となるコンホーメーションを保持することが示された。

亜鉛の共存下、水溶液系で測定した 1 および 2 のサイクリックボルタモグラムは、 $\text{Cu(II)}_2 / \text{Cu(I)}_2$ の還元に伴い錯体中の Cu(I) イオンと溶液中の亜鉛アコ錯体 Zn(aq)^{2+} が交換して Cu(I)-Zn(II) 二核錯体が生成することを示した。但し、銅イオンが二価の状態では銅(II) - 亜鉛(II) 二核錯体は形成されない。金属イオンの交換は O_2^- の添加によっても進行し得る。1, 2 およびこれらに亜鉛を添加した系のいずれの場合においても、錯体中の銅イオンは Cu(II)/Cu(I) に対する酸化還元電位 $E_{1/2}$ が $\text{O}_2 / \text{O}_2^- < E_{1/2} < \text{O}_2^- / \text{O}_2^{2-}$ の電位領域に存在しており、1, 2 は SOD として O_2^- の不均化反応に寄与する。その過程で、錯体中の銅イオンは酸化・還元を行い、 Cu(I)-Zn(II) 二核錯体が形成される。1 および 2 は SOD 活性発現に対する金属間イミダゾラト架橋および亜鉛の寄与を評価する上で有用なモデル系であるといえる。

生化学的測定条件における 1, 2 の SOD 活性能を NBT 法を用いて決定した。 O_2^- による NBT の還元を 50 % 阻害する為に必要となるモデル錯体の濃度； IC_{50} 値は、1 が 0.27, 2 が 0.39 μM であり、1 が高活性であった。同様に、1 または 2 に亜鉛を添加した銅 - 亜鉛二核錯体を与える系においても 1 の方が活性が高く (1 + Zn(II) ; 0.18, 2 + Zn(II) ; 0.27 μM)、二核活性中心におけるイミダゾラト架橋構造が触媒活性発現に寄与することが示された。一般に、銅(II) イオン上の配位子交換は equatorial 位よりも axial 位に結合した軸配位子の方が容易である。1 は架橋イミダゾラトによって CuN_4 配位平面の equatorial 位が塞がれるため、 O_2^- が銅イオンの axial 方向から接近し、生成した O_2 や H_2O_2 も equatorial 位に転移することなく axial 位に留まる。これに対して架橋イミダゾラトを持たない 2 では銅イオンの equatorial 位にも O_2^- や O_2 , H_2O_2 の配位が可能である。1 は相対的に 2 よりも基質と反応生成物の配位子交換に有利であり、配位部位の規定という立体的要因によって代謝回転が加速されているのであろう。一方、SOD 活性能に対する亜鉛の効果も現れており、銅 - 亜鉛二核錯体は、イミダゾラト架橋の有無に関わらず、銅二核錯体よりも高活性を示している。亜鉛(II) は O_2^- によって酸化・還元を受けないため、SOD 反応を通じて +2 の電荷を常に金属中心に提供し続け、アニオン性の基質である O_2^- の引き込みと、電気的に中性な反応生成物である O_2 , H_2O_2 の放出に寄与して活性能を向上させていると考えられる。

本研究によって得られた知見は、SOD における銅 - 亜鉛イミダゾラト架橋という特異的な活性中心の構造が O_2^- の配位・脱離に寄与し、触媒反応を促進していることを支持するものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 市 川 和 彦
副 査 教 授 佐々木 陽 一 (大学院理学研究科)
副 査 教 授 長谷部 清
副 査 教 授 中 村 博

学 位 論 文 題 名

Superoxide Dismutase の銅 - 亜鉛モデル錯体 の溶液内構造と反応機構の研究

スーパーオキシド O_2^- から生体組織を保護する超酸化物不均化酵素 (superoxide dismutase : SOD) は、銅と亜鉛がイミダゾラトによって架橋された活性中心を持っている。銅イオンは基質 O_2^- との電子移動に関与し、亜鉛イオンは活性中心の構造維持の機能を果たしていると考えられている。

本研究は、in vitro で Cu-Zn SOD 反応を再現することを目的として、活性部位の構造を模倣したモデル錯体を用いて溶液化学の立場から検討したものである。特に、これまで SOD モデル錯体において考慮されることがほとんどなかった亜鉛の効果に注目した。

本論文は七章からなり、第一章では、生体中に存在する Cu-Zn SOD の諸性質について言及した。第二章では、第一章及び Cu-Zn SOD モデル錯体についての過去の研究の成果をもとに溶液中で銅 - 亜鉛イミダゾラト架橋構造を形成するモデル錯体の分子設計と合成を行った。二核化配位子である大環状ヘキサミン L を用いることにより銅 (II) 二核錯体 $[Cu_2L(im)]^{3+}$ 1, $[Cu_2L(OH_2)_2]^{4+}$ 2, 亜鉛 (II) 二核錯体 $[Zn_2L(im)]^{3+}$ 3, $[Zn_2L(OH_2)_2]^{4+}$ 4 を合成し、過塩素酸塩として単離した。L は大環状骨格内に二つの *m*-キシリル基を有する 6 座配位子であり、このキシリル基によって配位部位がそれぞれ 3 座と 3 座に隔てられた構造を持つ。分子力学法 (MM2) を用いてモデル錯体の最適構造を検討した結果、L の二核錯体は、二つの金属イオンが Cu-Zn SOD における金属間距離 (6.3 Å) に近い距離で固定されることが示された。さらに、1 と 3 においては L の二つのキシリル基が錯形成に伴って対面型の配置をとり、架橋イミダゾラトを挟み込んでいる。芳香環同士の π - π 相互作用によって二核活性中心の架橋構造が安定化されているといえる。よって、1 は native Cu-Zn SOD の、2 は活性中心から架橋イミダゾラトを取り除いた Cu-Zn SOD の構造モデルと見なすことが可能である。第三章では、溶液中における亜鉛二核錯体の錯形成反応を 1H -NMR スペクトルを用いて検討した。その結果、二核錯

体はイミダゾールの存在下、溶液中で金属間イミダゾラト架橋構造を形成することが確認された。4 の $^1\text{H-NMR}$ は亜鉛の交換のためにシグナルがブロード化しているが、3 は架橋によって構造が固定されるためにカップリングが確認できる。第四章では、電位差滴定を用いて亜鉛(II)錯体の錯形成定数を算出し、銅(II)錯体との比較を行った。二核錯体 2, 4, および銅(II)単核錯体 $[\text{CuL}(\text{OH}_2)]^{2+}$, 亜鉛(II)単核錯体 $[\text{ZnL}(\text{OH}_2)]^{2+}$ の錯形成定数より、(1) 溶液中で亜鉛(II)の単核・二核錯体がともに安定に存在し得ること、(2) 銅(II)二核錯体は銅(II)単核錯体や亜鉛(II)錯体よりさらに安定であることが示された。また、両者の二核錯体における二つの配位水の pK_a より、配位水は金属イオン間を架橋せずに各金属イオンに配位していることが判明した。溶液中の二核錯体は金属間距離が約 6.5 \AA となるコンホーメーションを保持し、活性中心の構造を再現していることが示された。第五章では、銅(II)二核錯体に関して電気化学測定を行い、モデル錯体の酸化還元に対する亜鉛の効果を解明した。亜鉛の共存下、水溶液系で測定した 1 および 2 のサイクリックボルタモグラムは、 $\text{Cu(II)}_2 / \text{Cu(I)}_2$ の還元に伴い錯体中の Cu(I) イオンと溶液中の亜鉛アコ錯体 Zn(aq)^{2+} が交換して Cu(I)-Zn(II) 二核錯体が生成することを示した。 O_2^- の添加によって銅(II)が還元される時も金属イオンの交換は進行し、 Cu(I)-Zn(II) 二核錯体が生成すると考えられる。1, 2 およびこれらに亜鉛を添加した系のいずれの場合においても、錯体中の銅イオンは Cu(II)/Cu(I) に対する酸化還元電位 $E_{1/2}$ が $\text{O}_2 / \text{O}_2^- < E_{1/2} < \text{O}_2^- / \text{O}_2^{2-}$ の電位領域に存在するので、1, 2 は SOD の O_2^- 不均化反応を再現することができる。第六章では、1, 2 の SOD 活性能を生化学的測定条件による NBT 法を用いて決定した。 O_2^- による NBT の還元を 50 % 阻害する為に必要となるモデル錯体の濃度 ; IC_{50} 値は、1 が 0.27 , 2 が $0.39 \mu\text{M}$ であり、1 が高活性であった。同様に、1 または 2 に亜鉛を添加した銅-亜鉛二核錯体を与える系においても 1 の方が活性が高く (1 + Zn(II) ; 0.18 , 2 + Zn(II) ; $0.27 \mu\text{M}$), 銅-亜鉛イミダゾラト架橋構造が触媒活性を向上させていることが示された。1 は相対的に 2 よりも基質と反応生成物の配位子交換が起こり易いため、活性が向上したのであろう。また、亜鉛(II)は O_2^- によって酸化・還元を受けないため、正の電荷を金属中心に供給し、アニオン性の基質である O_2^- の引き込みに寄与し、さらに活性中心の構造を維持して活性を向上させていると考えられる。よって、1 および 2 は SOD 活性発現に対する金属間イミダゾラト架橋および亜鉛の寄与を評価する上で有用なモデル系であるといえる。第七章では以上の成果を踏まえ、native Cu-Zn SOD における特異的な活性中心の構造が O_2^- の配位・脱離に寄与し、触媒反応を促進する役割を果たしていると結論した。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における取得単位なども併せて申請者が博士(地球環境科学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。