

3-10 機構共通研究施設（分子科学研究所関連）

統合バイオサイエンスセンター

渡辺 芳 人（教授）（関連分子科学第一研究部門兼務）

A-1) 専門領域：生物有機化学、生物無機化学

A-2) 研究課題：

- a) 高原子価状態にあるヘム酵素および鉄ポルフィリン錯体による基質酸化の分子機構
- b) 人工ヘム酵素の分子設計
- c) 非ヘム酸化酵素のモデル系構築および不安定酸化活性種のキャラクタリゼーション
- d) 水溶液中での金属 - ハイドライド錯体の合成と基質還元反応の開拓

A-3) 研究活動の概略と主な成果

- a) ヘム酵素による酸化反応ではcompound Iと呼ばれるO=Fe(IV)ポルフィリン π カチオンラジカル種が酸化活性種となっている。特に、シトクロームP450は、アルカン類や芳香環の水酸化反応を行う重要な酵素である。compound Iの生成がこうした高難度酸化反応に必須な最低条件が否かを検討することを計画した。基本的なコンセプトは、酸素貯蔵機能を有するヘム蛋白であるミオグロビンをヘム酵素一般の基本骨格として用い、必要な部位特異的のアミノ酸置換により標的酵素機能発現を目指すというものである。その結果、基質として芳香環を有するトリプトファンをヘム近傍に導入することで、水酸化反応を達成することが出来た。

活性酸素である過酸化水素は発ガンなどの原因物質であり、これを取り除くための生体防御機構としてカタラーゼと呼ばれるヘム酵素が存在している。しかしながら、カタラーゼによる過酸化水素の分解機構はほとんど研究されておらず、その詳細は不明のままとなっている。その原因は、カタラーゼの酸化活性種であるcompound Iが定量的に合成できない事にある。一方、compound Iが観測可能な他のヘム酵素にはカタラーゼ活性がないことから、モデル研究もできなかった。本研究では、ミオグロビンミュータントを設計することで、カタラーゼ活性の賦与に成功すると共に、ミュータントのcompound Iが過酸化水素を酸化的に分解する素過程の直接観測に成功した。さらに、過酸化水素の分解機構の詳細を明らかにすることに成功した。

- b) 我々が作成した人工ペルオキシゲナーゼは、高い不斉酸化能を有することを示してきたが、これはヘム近傍を構成する蛋白質の不斉環境が作用していることは明かである。そこで、蛋白反応場の不斉環境を利用しながらヘム酵素とは異なる触媒機能を賦与する試みとして、ヘムタンパク質中のヘム（鉄ポルフィリン錯体）を他の金属錯体に置き換えた人工酵素の構築を行っている。現在、蛋白質内にヘムと同程度の安定性を持つ金属錯体を挿入するための設計指針の模索を行っており、様々な置換基を導入したCr(salen)錯体が安定な人工金属蛋白質を与えることを見出した。
- c) ヘム酵素と同じ機能をヘム以外の鉄や銅錯体を利用して行う酵素を非ヘム酵素と呼ぶ。本研究では、非ヘム酵素の活性中心モデルの構築を行い、酸素分子活性化機構解明を目的とした研究を行っている。今年度は、水溶性のカテコールジオキシゲナーゼモデル錯体の合成を行い、イントラジオール型と呼ばれるカテコール分解反応を選択的に

行う反応系の構築に成功した。

- d) 水溶液中で種々の化学反応を触媒的に進行させることは、環境調和型のプロセスとして重要と考えられる。本研究では、水溶液中で安定な金属 - ハイドライド錯体の合成と、有機化合物のハイドライド還元への展開を目指した研究を行っている。現在、pH グラジエントによって硝酸の還元反応に成功している。

B-1) 学術論文

S. OZAKI, I. HARA, T. MATSUI and Y. WATANABE, "Molecular Engineering of Myoglobin: The Improvement of Oxidation Activity by Replacing Phe-43 with Tryptophan," *Biochemistry* **40**, 1044 (2001).

N. MAKIHARA, S. OGO and Y. WATANABE, "pH-Selective Hydrogenation of Water-Soluble Carbon Compounds and Alkenes with $[\text{Cp}^*\text{Ir}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ ($\text{Cp}^* = \eta^5\text{C}_5\text{H}_5$) as a Catalyst Precursor in Very Acidic Media," *Organometallics* **20**, 497 (2001).

H. OHTSU, S. ITOH, S. NAGATOMO, T. KITAGAWA, S. OGO, Y. WATANABE and S. FUKUZUMI, "Characterization of Imidazolate-Bridged Dinuclear and Mononuclear Hydroperoxo Complexes," *Inorg. Chem.* **40**, 3200 (2001).

N. HARUTA, M. AKI, S. OZAKI, Y. WATANABE and T. KITAGAWA, "Protein Conformation Change of Myoglobin upon Ligand Binding Probed by Ultraviolet Resonance Raman Spectroscopy," *Biochemistry* **40**, 6956 (2001).

S. HEROLD, T. MATSUI and Y. WATANABE, "Peroxynitrite Isomerization Catalyzed by His64 Myoglobin Mutants," *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 4085 (2001).

T. TOMITA, S. OGO, T. EGAWA, H. SHIMADA, N. OKAMOTO, Y. IMAI, Y. WATANABE, Y. ISHIMURA and T. KITAGAWA, "Elucidation of the Differences between the 430 and 455-nm Absorbing Forms of P450-Isocyanide Adducts by Resonance Raman Spectroscopy," *J. Biol. Chem.* **276**, 36261 (2001).

I. HARA, T. UENO, S. OZAKI, S. ITOH, K. LEE, N. UEYAMA and Y. WATANABE, "Oxidative Modification of Tryptophan-43 in the Heme Vicinity of the F43W/H64L Myoglobin Mutant," *J. Biol. Chem.* **276**, 36067 (2001).

S. OGO, N. MAKIHARA, Y. KANEKO and Y. WATANABE, "pH-Dependent Transfer Hydrogenation, Reductive Amination, and Dehalogenation of Water-Soluble Carbonyl Compounds and Alkyl Halides Promoted by Cp^*Ir Complexes," *Organometallics* **20**, 4903 (2001).

B-3) 総説、著書

Y. WATANABE, "Asymmetric Oxidation of Sulfides and Olefins by Myoglobin Mutants," *Rev. Heteroatom Chem.* **22**, 135-150 (2001).

J. L. QUE and Y. WATANABE, "Oxygenase Pathways: Oxo, Peroxo, and Superoxo," *Science* **292**, 651-653 (2001).

S. OZAKI, M. P. ROACH, T. MATSUI and Y. WATANABE, "Investigations of the Roles of the Distal Heme Environment and the Proximal Heme Iron Ligand in Peroxide Activation by Heme Enzymes via Molecular Engineering of Myoglobin," *Acc. Chem. Res.* **34**, 818-825 (2001).

Y. WATANABE, "Two-Electron Oxidized Derivatives of Fe(III) Porphyrins," *J. Biol. Inorg. Chem.* **6**, 846-856 (2001).

Y. WATANABE, "Introduction of Enzymatic Functions into Myoglobin: Molecular Design of Heme Enzyme," *J. Inorg. Biochem.* **86**, 8 (2001).

B-4) 招待講演

Y. WATANABE, "Molecular Design of Heme," Gordon Research Conference (Inorganic Reaction Mechanisms), Ventura (U. S. A.), February 2001.

Y. WATANABE, "Molecular Design of Heme Enzymes for Asymmetric Oxidation," 3rd European Japanese Bioorganic Meeting, Ebsdorffergrund (Germany), May 2001.

Y. WATANABE, "Molecular Design of Heme Enzymes by Protein Engineering," The 88th Annual Meeting of the Korean Chemical Society, Pusan (Korea), October 2001.

Y. WATANABE, "Introduction of Enzymatic Functions into Myoglobin: Molecular Design of Heme Enzyme," The 10th International Conference on Bioinorganic Chemistry, Florence (Italy), August 2001.

渡辺芳人, 「ヘム酵素の分子設計 ミオグロビンへのヘム酵素機能賦与」, 第3回バイオデザインの研究会, 名古屋, 2001年12月.

B-5) 受賞、表彰

渡辺芳人, 日本化学会学術賞 (2000).

B-6) 学会および社会的活動

学協会役員、委員

触媒学会生体関連触媒研究会幹事(1988-).

基礎生物工学会幹事(1994-).

日本化学会生体機能関連化学部会幹事(1997-).

日本化学会東海支部常任幹事(1999-2000).

日本化学会将来構想委員会(2001-).

学会の組織委員

第二回 International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines組織委員 (2000-).

文部科学省、学術振興会等の役員等

日本学術振興会特別研究員等審査会専門委員(1999-2000).

学会誌編集委員

Journal of Inorganic Biochemistry, Editorial Board (1997-).

European Journal of Inorganic Chemistry, International Advisory Board (2000-).

Journal of Biological Inorganic Chemistry, Editorial Board (2001-).

B-7) 他大学での講義、客員

富山大学工学部, 「生物無機化学」, 2001年2月13日-14日.

名古屋大学理学部, 総合科目, 2001年11月19日.

名古屋大学工学部, 総合科目, 2001年11月26日.

奈良女子大学, 「ヘム酵素の化学」, 2001年11月21日-22日.

名古屋大学大学院理学研究科物質理学専攻兼任, 2001年4月1日-2002年3月31日.

C) 研究活動の課題と展望

酸化反応を触媒するヘム酵素の反応機構に関する基礎研究から、活性中心を構成するアミノ酸の役割を分子レベルで明らかとしてきた。こうした研究成果に基づいて、人工的なヘム酵素の構築を現在目指している。具体的には、ミオグロビンを人工酵素構築のためのビルディングブロックとして利用し、酵素活性発現に必要なアミノ酸を適切に配置することによって、目的とするヘム酵素を合成する試みを行っている。現時点では、高い光学選択性を有する一原子酸素添加酵素の構築に成功しているが、反応の多様性、非天然型補欠分子族導入による生体系にはない化学反応を触媒する人工酵素への展開を現在の目標としている。一方、非ヘム酸化酵素の分子レベルでの機構解明のためのモデル系による研究では、ヘムと非ヘム酵素の本質的な差異と生体における酸素活性化戦略の総合的な解明を行いたい。水溶液中での新たな反応の開拓は、今後ますます重要な化学反応系として展開したい分野であり、現在、カルボニルのアルコールへのハイドライド還元を達成している。本系はpHが4以下のような強酸性条件下でも反応を進行させることが可能であり、現在硝酸還元などデヒドロゲナーゼ様活性の付与を検討している。