

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	安定なセレノペプチド由来高反応性化学種を用いたセレン含有酵素の触媒サイクルのモデル研究
Title(English)	Modeling the Catalytic Cycle of Selenocysteine-Containing Enzymes by Stable Selenopeptide-Derived Highly Reactive Species
著者(和文)	増田涼介
Author(English)	Ryosuke Masuda
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11700号, 授与年月日:2022年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:後藤 敬,岩澤 伸治,江口 正,豊田 真司,小野 公輔
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11700号, Conferred date:2022/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

# Modeling the Catalytic Cycle of Selenocysteine-Containing Enzymes by Stable Selenopeptide-Derived Highly Reactive Species

増田 涼介 (指導教員 後藤 敬)

セレンはヒトの微量必須元素であり、セレンシステイン (Sec) 含有タンパク質は生体内で多くの重要な役割を担っている。しかしながら、その作用機序については関与する活性種の多くが通常不安定であるために、間接的な情報に基づく推測の域を出ないものが多い。たとえば、抗酸化酵素グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) は過酸化水素の無毒化という重要な機能を担うが、鍵中間体として提唱されているセレンシステインセレネン酸 (Sec-SeOH) は観測例すらない。これら活性種は小分子系では二分子間反応により容易に失活するため、そのモデル研究も困難であった。当研究室では最近、Sec そのものを分子クレードルに内包した cradled Sec を開発し、生体反応活性種ヨウ化セレネニル (Sec-SeI) の合成・単離に成功している。筆者は修士論文において、Sec-Gly-Gly トリペプチドを内包した cradled selenopeptide を設計・開発し、Sec-SeOH の直接観測と抗酸化酵素 GPx の触媒サイクルに関するモデル研究を行ってきた。本博士研究では、より実際の酵素の触媒中心に近いペプチドモデルの開発と、分子クレードルの修飾化法の開発の2つを基盤とし、さまざまな Sec 由来生体反応活性種のモデル研究を行った。

## 1. 観測可能な安定性を有する Sec-SeOH を用いた抗酸化酵素 GPx の触媒サイクルに関するモデル研究

GPx の触媒サイクルとしては基本過程が広く受け入れられているが、Sec-SeOH はグルタチオン (GSH) 欠乏下では容易に脱セレン化し失活するため、GPx がどのように機能を維持しているかは詳しくわかっていない。Sec-SeOH が環状セレネニルアミドに変換されることにより失活を抑制するバイパス過程が提唱されているが、根拠は質量分析のみである。筆者は修士研究において、Sec-Gly-Gly モデルの Sec-SeOH を用いてこのバイパス過程が進行しうることを明らかにしている。しかしながらその効率が低く、Sec-SeOH の性質は未だ未解明の部分が多かった。本研究では、GPx の触媒中心を一般化した Sec-Gly-Gly モデルに加え、アイソザイム GPx1 および GPx4 の触媒中心を模した新規モデル (Sec-Gly-Thr モデルおよび Sec-Gly-Lys モデル) を開発し、Sec-SeOH の反応性について調査した。修士論文と合わせ、GPx の触媒サイクルにおいて提唱されていながら検証が困難であった基本サイクルおよびバイパス過程の全てのプロセスについて、各段階ごとに実証することに初めて成功するとともに、Sec-SeOH が関わる反応過程の相対的な起こりやすさを実験的に明らかにした。また Sec-SeOH の反応性に対し、2 つ隣のアミノ酸残基が摂動を与えることを示し、GPx の失活抑制機構への Sec 以外の関与を示唆する結果を得た。

## 2. 安定な Sec-SeI を用いた甲状腺ホルモン活性化酵素の触媒サイクルに関するモデル研究

ヨードチロニンデヨージナーゼ (Dio) は甲状腺ホルモンの活性化を担う酵素であり、その触媒サイクルは、(1) ホルモンの脱ヨウ素化による酸化型 Sec-SeI の生成、(2) Sec-SeI の還元による Sec-SeH の再生から構成されると提唱されている。しかしながら、Sec-SeI は捕捉例すらないため後半の機構は明らかではなく、Sec-SeI に加え様々な酸化型中間体の関与が提唱されている。筆者は今回、実際の Dio1 および Dio2, Dio3 の活性中心ペプチドモデル系を構築し、対応する Sec-SeI の合成・単離と構造決定、および反応性について検討した。

### 3. C-H ホウ素化を鍵とした炭化水素 dendリマーの合成終盤修飾法の開発

周縁部が官能基化されたオリゴフェニレン dendリマーは、様々な機能性物質に幅広く利用されている。通常、これらの分子の構築には予め官能基を導入した末端部から合成を出発する収束法が必要なため、多段階を必要とする。筆者は、合成終盤の部位選択的な C-H 活性化を活用した周縁部官能基化法を確立すれば、より多くの機能を有する分子クレードルを展開できると考え、合成法の開発を行った。遷移金属フリーで大量合成可能な第二世代 dendロンに対し、Hartwig C-H ホウ素化を行ったところ 4 か所のみがホウ素化された dendロンが収率 91% で得られた。続く Pd 触媒ホウ素化により、共通中間体を高収率、デカグラムスケール、再結晶精製で得た。この化合物に対して、鈴木-宮浦反応で 3 種の周縁官能基を導入可能であった。最後にコアユニットの連結を行うことで、官能基化 dendリマーを得た。本手法は合成終盤で周縁官能基を導入でき、オリゴフェニレン dendリマーの機能スクリーニングに有用である。また水溶性などの様々な機能を分子クレードルに付与する際の基盤となる戦略である。

### 4. 拡張分子クレードルを用いた単離可能な Sec-ニトロソセレノシステインの合成と反応

Sec-ニトロソセレノシステイン (Sec-SeNO) は Sec-SeH と NO の相互作用により生成する活性種として近年注目を集めているが、捕捉例すらなく反応性は明らかではない。以前当研究室では、芳香族置換 R-SeNO の二分子間失活がセレネン酸よりも著しく速いことを見出している。筆者は、本研究で開発した拡張分子クレードル (*t*-BuBpsc 基) による二分子間失活の抑制を活用し、Sec-SeH のニトロソ化により安定な Sec-SeNO の合成・単離を初めて達成した。Sec-SeNO は  $^1\text{H}$ ,  $^{77}\text{Se}$  NMR および UV-vis スペクトルで同定した。

以上、本博士研究では cradled selenopeptide を活用し、生体活性種 Sec-SeOH, Sec-SeI および Sec-SeNO の反応性について明らかにし、含セレン酵素の作用機序を理解する上で重要な基礎的知見を得た。特に環状セレネニルアミドが GPx だけでなく、種々のセレノプロテインにおける広汎な中間体として機能する可能性があることを明らかにした。