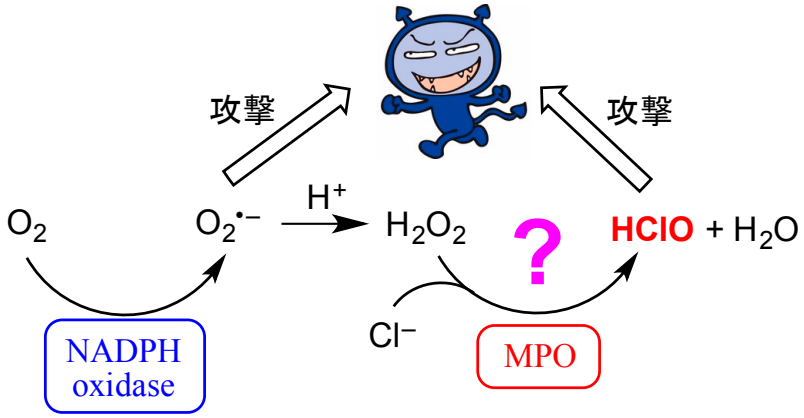
15　好中球における次亜塩素酸合成機構の解明	藤井　浩

【目的】ミエロペルオキシダーゼ（MPO）が作り出す次亜塩素酸は、好中球が細菌を攻撃するための重要な武器になっている。我々の体が病原菌と戦う過程を分子レベルで理解するための最も基礎となる反応であるが、今日においても未解明の点が多い課題である。我々はMPOのモデル化学物を用いて、MPOによる次亜塩素酸合成機構の解明と生体防御機構の分子レベルでの理解をめざした。

【方法】MPOのモデル化合物は、既報の手法で合成した。モデル化合物の吸収スペクトル、NMR、EPRの結果は、これまでの報告と一致した。オゾンガスは、高純度酸素ガスに紫外線を照射して合成した。本研究で用いた試薬、溶媒は、市販されているものをそのまま使用した。合成後はさらなる精製は行わず、すぐに使用した。低温下での分光測定は、液体窒素を用いた温度制御可能なクライオスタットを用いて行った。

【結果】MPOの活性反応中間体として知られるcompound Iのモデル化合物を合成し、塩素イオンとの反応を試みた。その結果、ある酸化還元電位を境にして反応が大きく変わることを見いだした。この電位からcompound Iは塩素イオンと2電子過程で反応し塩素ガスを生成できることが解明された。さらに、次亜塩素酸付加錯体の反応性についても研究を行った。その結果、次亜塩素酸付加錯体の反応性は、ヘム周りの環境に非常に敏感であることが示された。MPOの環境は、次亜塩素酸を活性化するのではなく、むしろ安定化する環境であるという興味深い結果が得られた。この成果は、MPOでは次亜塩素酸を合成したあと、その次亜塩素酸をさらに活性化して細菌と反応させているのではなく、細菌と直接反応するまで次亜塩素酸が分解しないように逆に安定化していることを示唆した。

好中球による抗菌作用の機構



15. 好中球における次亜塩素酸合成機構の解明

藤井　浩

奈良女子大学 研究院 自然科学系 化学領域

Key words：ミエロペルオキシダーゼ，次亜塩素酸，反応中間体，反応機構

緒　言

我々の体内の白血球は、細菌の感染から我々の体を守っている。細菌が体内に侵入すると、はじめに白血球の中の好中球と呼ばれる細胞が、感染部位に集まり、細菌を貪食、殺菌する。この過程は、我々の細菌に対する最初の生体防御系となる（図 1 参照）。好中球は、細菌を貪食作用により細胞に取り込むと、NADPH オキシダーゼの機能がオンになり、酸素からスーパーオキシドが生産される。スーパーオキシドはそれ自体細菌を撃退する強い酸化力を有するが短寿命である。多くのスーパーオキシドは、不均化反応により過酸化水素となる。このようにして生じた過酸化水素は、好中球の別の酵素の反応に利用される。その酵素は、ミエロペルオキシダーゼ（MPO）と呼ばれ、過酸化水素と塩素イオンのから次亜塩素酸（HClO）を生成している。次亜塩素酸は、非常に高い抗菌作用を有していることが知られていて、これにより侵入した細菌が撃退される。このように、MPO が作り出す次亜塩素酸は、好中球が細菌を攻撃するための重要な武器になっている。次亜塩素酸は、塩素系漂白剤の主成分であるが、興味深いことに我々の体内でも合成され、細菌と戦っているのである。では我々の好中球内の MPO は、どのようにして次亜塩素酸を合成しているか？この問題は、我々の体が病原菌と戦う過程を分子レベルで理解するための最も基礎となる反応であるが、今日においても未解明の点が多い課題である。これまでの研究から、MPO は過酸化水素と反応して compound I と呼ばれる高原子価鉄オキソ中間体を生成した後、これが塩素イオンと反応して鉄 3 価ヘム次亜塩素酸中間体となり次亜塩素酸を合成していると提案されている（図 2 参照）。しかし、鉄 3 価ヘム次亜塩素酸錯体を同定した報告はなく、compound I と塩素イオンがどのように反応しているのか、この機構が本当に正しいのかは明らかでない。我々はこの問題の学術的な重要性や社会的な意義から、酵素モデル化合物を使って化学的戦力に基づき MPO による次亜塩素酸合成過程の研究を行ってきた［1，2］。その結果、我々は最近ついに次亜塩素酸合成過程の中間体と考えられてきた鉄 3 価ヘム次亜塩素酸錯体の合成、同定と反応解析に世界で初めて成功した［3］。この研究では、我々のこの成果をさらに発展させ、MPO による次亜塩素酸合成機構の解明と生体防御機構の分子レベルでの理解をめざした。

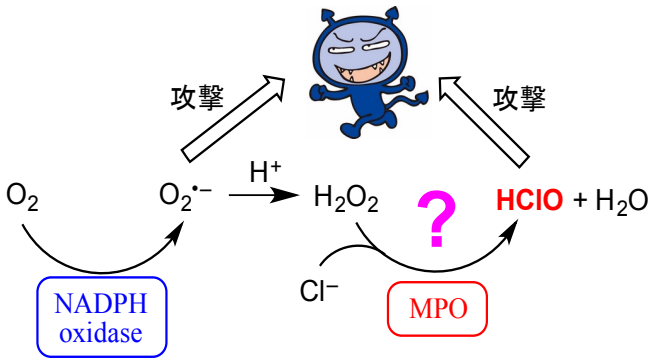


図 1. 好中球による抗菌作用の機構

好中球に取り込まれた細菌は、NADPH オキシダーゼによって酸素から合成されたスーパーオキシドによる攻撃をうける。さらにスーパーオキシドは、迅速に水と過酸化水素に不均化反応を起こす。生成した過酸化水素は、ミエロペルオキシダーゼと反応して塩素イオンの酸化を可能にする。これにより塩素イオンは、次亜塩素酸となり、細菌を攻撃する。

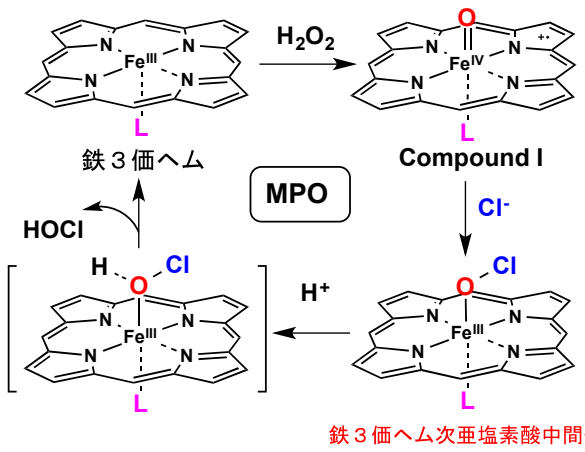


図 2.　ミエロペルオキシダーゼに提案された次亜塩素酸の合成過程の反応機構

（左上）ミエロペルオキシダーゼの活性部位のヘム。休止状態では、鉄イオンは 3 価である。

（右上）ミエロペルオキシダーゼの活性反応中間体（compound I）。休止状態のヘムが過酸化水素と反応すると活性反応中間体に変化する。

（右下）ミエロペルオキシダーゼの活性部位に生成する鉄 3 価ヘム次亜塩素酸イオン付加錯体。compound I は、塩素イオンの酸化が可能になる。鉄イオン上の酸素原子と塩素イオンの間に化学結合が生成し、鉄 3 価ヘム次亜塩素酸錯体となると考えられている。この錯体は、我々によって世界で初めて合成された錯体であるが、酵素反応中では未だ検出されていない。

（左下）ミエロペルオキシダーゼの活性部位に生成する鉄 3 価ヘム次亜塩素酸付加錯体。鉄に配位した次亜塩素酸イオンは、プロトン化を受けて酵素活性部位から離れ、細菌を攻撃する。これにより活性部位は、元の休止状態に戻る。

方　法

1.　モデル化合物の合成および実験方法

MPO のモデル化合物は、既報の手法で合成した。モデル化合物の吸収スペクトル、NMR、EPR の結果は、これまでの報告と一致した。オゾンガスは、高純度酸素ガスに紫外線を照射して合成した。本研究で用いた試薬、溶媒は、市販されているものをそのまま使用した。合成後はさらなる精製は行わず、すぐに使用した。低温下での分光測定は、液体窒素を用いた温度制御可能なクライオスタットを用いて行った。

結果および考察

1. MPO の鉄３価ヘム次亜塩素酸中間体の同定［4, 5］

MPO では、過酸化水素との反応から生成した compound I という反応中間体が塩素イオンと反応して次亜塩素酸付加錯体が生成していると考えられている。そこで、次亜塩素酸付加錯体が compound I と塩素イオンとの反応から生成しているかを検証した。低温下で酵素モデル化合物を過酸化水素の代わりとなるオゾンガスと反応させ、compound I を発生させた。compound I 錯体の生成は、吸収スペクトルを用いて確認した。次に、compound I 錯体に塩素イオン（塩化テトラブチルアンモニウム）を添加し、その後に生成するものを吸収スペクトルで同定を行った。初めに MPO のように非常に酸化還元電位が高い compound I と塩素イオンの反応を行った。compound I に塩素イオンを添加すると吸収スペクトルは瞬時に変化し、compound I は塩素イオンと反応することが明らかとなった。反応後の生成物の同定を吸収スペクトルを用いて行った。吸収スペクトルにおいて、550nm 付近に強い吸収ピークを持つ錯体であることがわかった。このスペクトルから、compound II が生成していることが明らかとなった。この結果は、compound I 錯体が塩素イオンにより一電子還元されたことを示す結果である。MPO においても同様な反応が起こっている報告はな

く、興味深い結果と考える。電子移動反応が関与することが明らかとなったので、さらに compound I の酸化還元電位を徐々に低下させて、反応の変化を調べた。その結果、ある酸化還元電位を境に反応が全く起きないことが明らかとなった。この電位に対応する酸化還元反応を調べたところ、塩素イオンが塩素分子に変化する 2 電子過程の電位と一致することが明らかとなった。塩素ガスは、水との反応で次亜塩素酸を生成するため、酵素における次亜塩素酸生成過程との関わりに興味が持たれる。

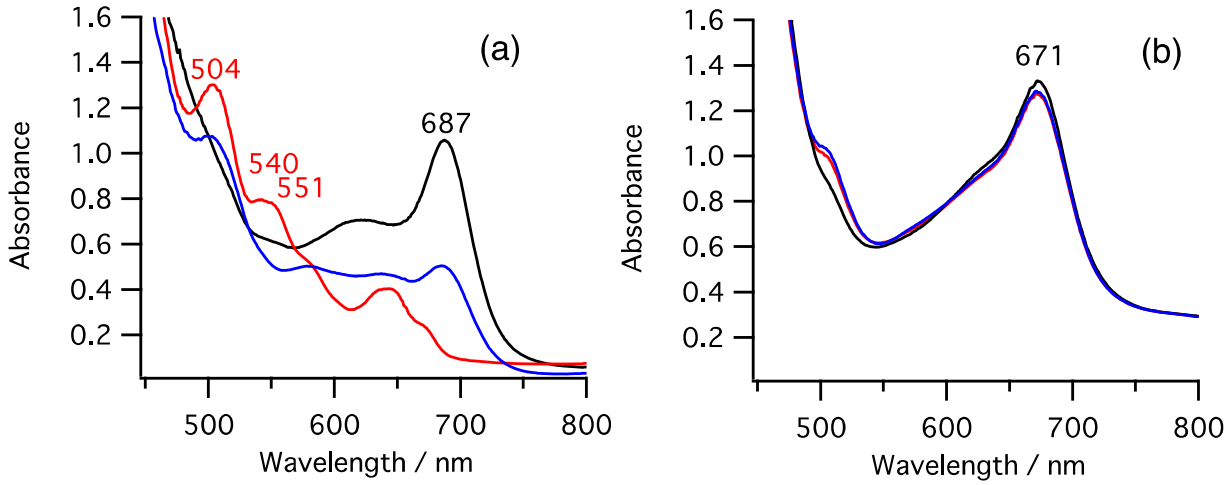


図 1. Compound I と塩素イオンの反応による吸収スペクトル変化

a) 電位の高い compound I 錯体と塩素イオンの反応。黒線 : compound I 錯体、青線 : 塩素イオンを添加直後、赤線 : 添加後。

b) 電位の低い compound I 錯体と塩素イオンの反応。黒線 : compound I 錯体、青線 : 塩素イオンを添加直後、赤線 : 添加後。

2. 鉄 3 価ヘム次亜塩素酸錯体の反応性を制御する因子

先の実験結果をもとにさらに、ヘム錯体の酸化還元電位がヘム次亜塩素酸錯体の反応性に及ぼす効果を研究した。ヘム錯体に導入するフッ素原子の数を変えることによりヘムの酸化還元電位を変化させた。これらのヘム錯体に低温下、次亜塩素酸イオンを添加することによりヘム次亜塩素酸錯体の合成を試みた。吸収スペクトルを用いて次亜塩素酸イオンとヘム錯体の反応を追跡した。その結果、540 nm 付近に強い吸収をもつ化合物が生成していることが明らかとなった。この化合物は、これまでに我々が世界で初めて報告した次亜塩素酸付加錯体のスペクトルと極めて類似していることがわかった。そこでさらに NMR と EPR の測定を行った。NMR では、ヘムに 2 つの配位子が結合していること、EPR では鉄イオンが 3 価低スピン状態であること、さらに次亜塩素酸イオン付加錯体特有の g 異方性の小さいスペクトルであることが明らかとなった。これらの結果から、電子吸引性度を変化させた次亜塩素酸錯体の合成に成功したことがわかった。そこで、これらの錯体の反応性を比較するため、オレフィン、芳香族化合物などとの反応を行い、それらの反応速度から反応性を評価した。その結果、電子吸引性のヘムほど反応性が低くなることが明らかとなった。MPO のヘムは電子吸引性の低いので、この結果は MPO の次亜塩素酸付加体が細菌を酸化的に攻撃する可能性を示すものと考える。さらにこの錯体に MPO と類似のイミダゾール配位子を結合させた。その結果、イミダゾールが結合した次亜塩素酸錯体はさらに安定化するという意外な結果を得た。これらの一連の結果は、MPO では次亜塩素酸を合成したあと、その次亜塩素酸をさらに活性化して細菌と反応させているのではなく、細菌と直接反応するまで次亜塩素酸が分解しないように逆に安定化していることが示唆された。

共同研究者・謝辞

EPR の測定は、分子科学研究所機器センターで行った。測定の補助をしていただいた藤原基靖氏、伊木志成子氏に感謝する。

文　献

1） Cong Z, Kurahashi T, Fujii H.Oxidation of Chloride and Subsequent Chlorination of Organic Compounds by Oxoiron(IV) Porphyrin π-Cation Radicals. Angew Chem Int Ed Engl. 2011 Oct 10;50(42):9935-9. doi: 10.1002/anie.201104461. Epub 2011 Sep 12.PMID: 21913293.

2） Cong Z, Kurahashi T, Fujii H. Fujii Oxidation of Chloride and Subsequent Chlorination of Organic Compounds by Oxoiron(IV) Porphyrin π-Cation Radicals. J Am Chem Soc. 2012 Mar 14;134(10):4469-72. doi: 10.1021/ja209985v. Epub 2012 Mar 6.PMID: 22375905.

3） Cong Z, Yanagisawa S, Kurahashi T, Ogura T, Nakashima S, Fujii H. Synthesis, Characterization, and Reactivity of Hypochloritoiron(III) Porphyrin Complexes. J Am Chem Soc. 2012 Dec 26;134(51):20617-20. doi: 10.1021/ja3108774. Epub 2012 Dec 13.PMID: 23214510.

4） Araki, I, Fukui K, and Fujii H. Preparation, Characterization and Reactivity of a Bis-hypochlorite Adduct of a Chiral Manganese(IV)-Salen Complex. Inorg. Chem. 2018 Feb 19;57(4):1685-8. doi: 10.1021/acs.inorgchem.7b02661. Epub 2018 Feb 5.

5） Yokota S, Fujii H.Critical Factors in Determining the Heterolytic versus Homolytic Bond Cleavage of Terminal Oxidants by Iron(III) Porphyrin Complexes. J Am Chem Soc. 2018 Apr 18;140(15):5127-5137. doi: 10.1021/jacs.7b13037. Epub 2018 Apr 3.PMID: 29575900.