

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19099

研究課題名（和文）ニッケル錯体F430をコファクターに有するメタン発生酵素MCRの機能モデル構築

研究課題名（英文）Functional Model of Methane Generation Enzyme MCR Having Ni-containing F430 as a Cofactor

研究代表者

林 高史（Hayashi, Takashi）

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：20222226

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：メタン生成に関与しているニッケルヒドロコルフィノイド補因子F430を含むメチル補酵素Mレダクターゼ（MCR）に着目し、本研究では人工補因子であるニッケル一価テトラデヒドロコリンを含む再構成ミオグロビンを、MCRのタンパク質の機能モデルとして提案した。この再構成タンパク質は、ヨードメタンだけでなく、メチルp-トルエンスルホン酸塩やヨウ化トリメチルスルホニウムなどのメチル供与体と反応し、ジチオナイトを含む水溶液中で触媒的メタンの発生が認められた。さらに、この再構成タンパク質では、臭化ベンジル誘導体のホモカップリング生成物を与えず、還元的に脱臭素化された生成物に変換することも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ニッケルヒドロコルフィノイド補因子F430を含むメチル補酵素Mレダクターゼ（MCR）は、嫌気性条件下での生物学的メタン生成に関与していることが知られている。しかしこの酵素は複雑かつ不安定であり、本研究を開始する時点では、化学の立場からの研究があまり進んでいなかった。今回、この複雑な酵素を理解するために、簡単な構造を有するミオグロビンを反応場として、補因子も単純化したニッケル錯体を複合化させることにより、温和な条件下でメタンを触媒的に発生させることを初めて達成した。ニッケル錯体を含むMCR触媒によるメタン生成の機構に対する理解に貢献している点で学術的意義が認められる。

研究成果の概要（英文）：In this study, focusing on methyl coenzyme M reductase (MCR) containing a nickel hydrocorfinoid cofactor F430 involved in methanogenesis, we prepared myoglobin reconstituted with an artificial cofactor, nickel monovalent tetrahydrocholine, as a functional model of the MCR protein. This reconstituted protein was found to react not only with methyl iodide but also with other methyl donors such as methyl p-toluenesulfonate and trimethylsulfonium iodide, and the catalytic methane generation was observed in an aqueous solution in the presence of dithionate. Furthermore, it was revealed that the reconstituted protein does not give any homocoupling product of the benzyl bromide derivatives and provides reductively a dehydrogenated product.

研究分野：生物無機化学

キーワード：人工補因子 F430 ヘムタンパク質 ニッケル錯体 メタン生

1. 研究開始当初の背景

自然界では、鉄ポルフィリンであるヘムを活性中心とする金属酵素が多数存在し、非常に多くの研究が展開されている。一方、中心金属にニッケルを有するポルフィリノイドを補因子として含有する酵素は、生物学的にメタン発生と分解に大きく寄与するメチル補酵素 M 還元酵素 (MCR) が唯一知られている。MCR は活性中心として、飽和した結合を多く持つポルフィリノイドであるコルフィンのニッケル錯体 F430 を有し、メタン菌中のメタン発生反応の最終段階において基質であるメチル補酵素 M ($\text{CH}_3\text{S-CoM}$) と補酵素 B (HS-CoB) から、メタンとジスルフィド化合物 (CoM-S-S-CoB) を生成する (図 1)。MCR や F430 に対する各種分光法による測定や計算化学の結果からニッケル一価種が活性種として提唱されているが、酵素と補因子が極めて複雑な構造であるため、反応機構や作用機序は完全には理解されていない。また F430 を模したモデル錯体を用いた研究も実施されているが、非常に強力な還元剤が必要など、酵素反応を限定的にしか再現できていない。さらに従来のモデル系は、タンパク質骨格の機能を考慮した設計には至っていない。

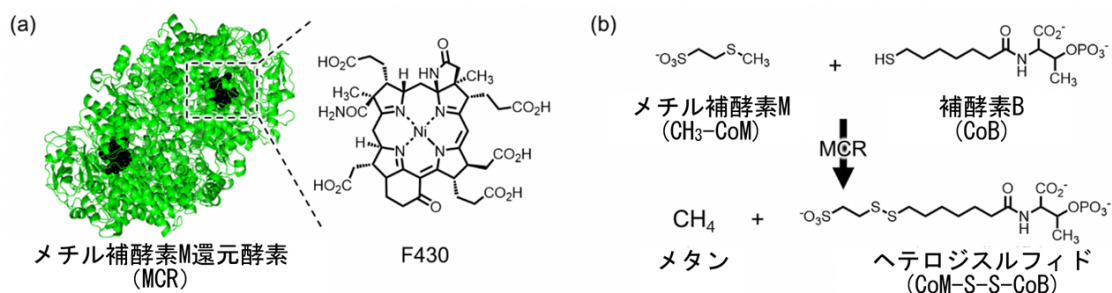


図 1 (a) メチル補酵素 M 還元酵素 (MCR) の結晶構造 (PDB ID: 1MR0) および補因子 F430 の分子構造。(b) MCR によるメタン発生反応。

2. 研究の目的

本研究ではヘムタンパク質の構造と補因子置換能に着目し、図 2 に示す天然の補因子であるヘムを人工的に設計・調製した金属ポルフィリノイド錯体に置き換える「再構成法」を利用することで、タンパク質内部に活性中心と反応場を有する MCR のモデルをとって構築し、天然酵素同様メタン発生反応のモデル触媒系の開発を目的とした。

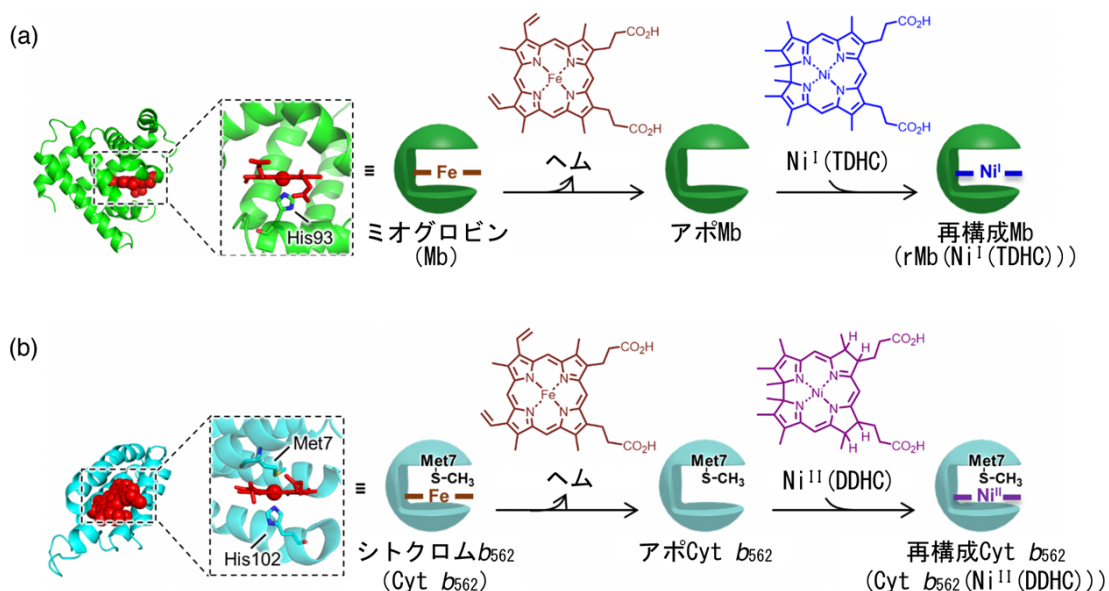


図 2 (a) Ni^I(TDHC) を用いたミオグロビンの再構成。(b) Ni^{II}(DDHC) を用いたシトクロム b₅₆₂ の再構成。

3. 研究の方法

F430 と同等のモノアニオン性テトラピロール配位子を有し、金属低原子価種の安定化が期待されるニッケルテトラデヒドロコリン (Ni(TDHC)) や Ni(TDHC) の配位子を一部水素化したニッ

ケルジデヒドロコリン Ni (DDHC) をモデル錯体として合成した。合成した F430 のモデル錯体に対して、単純な構造と安定性を有し、補因子を結合可能な疎水性空間を有するヘムタンパク質 (ミオグロビン (Mb) およびシトクロム b_{562} (Cyt b_{562})) をモデルタンパク質マトリクスとしてそれぞれ選択した (図 2)。これらを複合化した機能モデルに対し、その物理化学的性質および外部基質に対する反応性を評価した。またタンパク質反応場がメタン発生および関連する触媒反応に与える影響を検討した。

4. 研究成果

Ni^{II} (TDHC) は図 3 に示す合成経路に基づき合成した。目的化合物は各種 NMR 測定、ESI-TOF MS、X 線結晶構造解析および UV-vis 吸収スペクトル測定より同定した。新規に合成した Ni^{II} (TDHC) のリン酸緩衝液中における分光電気化学測定の結果、 $\text{Ni}^{\text{II}}/\text{Ni}^{\text{I}}$ に相当する一電子還元を伴う変化が $-0.54 \text{ V vs. Ag|AgCl}$ に観測された。さらに、還元剤のジチオナイトを反応させることで UV-vis 吸収スペクトル測定において 272, 350, 551 nm から 436, 526 nm へ吸収ピークの変化を観測し、テトラヒドロフラン/緩衝液混合溶媒中における EPR スペクトル測定および Evans 法より、ニッケル一価種の生成を確認した。 Ni^{II} (TDHC) の $\text{Ni}^{\text{II}}/\text{Ni}^{\text{I}}$ に相当する酸化還元電位は、既報の F430 と比較して約 0.3 V 正にシフトしており、ニッケル一価種がテトラデヒドロコリン配位子により大きく安定化されていることが明らかとなった。

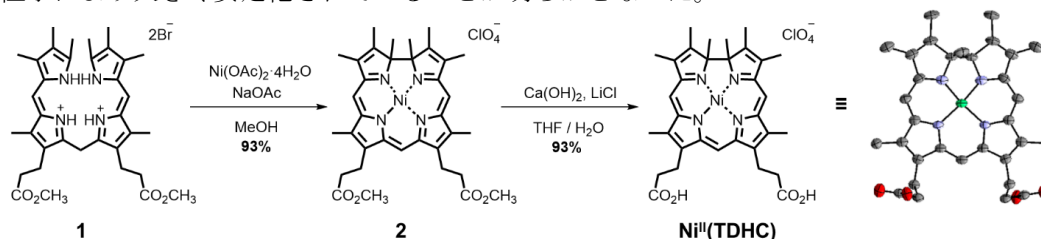


図 3 Ni^{II} (TDHC) の合成スキームおよび結晶構造。

ジチオナイトで還元した Ni^{I} (TDHC) に対し、Mb からヘムを除去したアポ Mb を添加し、MCR のモデルとして再構成 Mb ($\text{rMb}(\text{Ni}^{\text{I}}(\text{TDHC}))$) を得た (図 2a)。このとき、UV-vis 吸収スペクトルは 600 nm に新たな吸収ピークの生成を示しており、これは Ni^{I} (TDHC) に対してピリジンを添加した際のスペクトル変化と類似していた。このことから、天然の Mb と同様に再構成 Mb においても His93 による補因子中心金属への軸配位が示唆された。また、アポ Mb への Ni^{I} (TDHC) の添加により、円偏光二色性スペクトル測定では紫外光領域において 208 nm と 222 nm の強度の増加が観測され、錯体の挿入によるタンパク質の α -ヘリックスの巻き戻りを確認した。また可視光領域の円偏光二色性スペクトル測定では Ni^{I} (TDHC) の吸収スペクトルに対応するコットン効果が観測され、錯体がタンパク質内部のキラルな環境に存在することが示された。さらに、ESI-TOF MS および EPR 測定より、タンパク質骨格と錯体が 1 対 1 で複合化しており、ニッケル一価種がタンパク質内部において維持されていることを明らかにした。

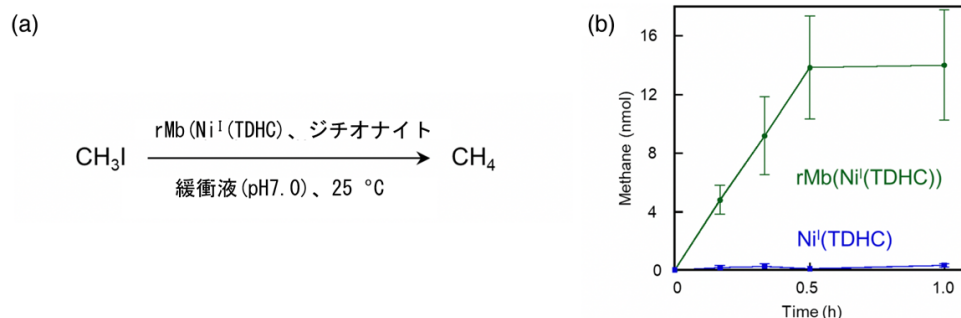


図 4 (a) 本研究で実施したヨードメタンをメチル化剤とするメタン発生反応スキーム。(b) $\text{rMb}(\text{Ni}^{\text{I}}(\text{TDHC}))$ あるいは $\text{Ni}^{\text{I}}(\text{TDHC})$ を触媒とする反応系におけるメタン発生量の時間変化。

調製した $\text{rMb}(\text{Ni}^{\text{I}}(\text{TDHC}))$ とメチル化剤を用いてメタン発生を試みた (図 4a)。具体的には、25 °C、過剰のジチオナイトが存在する還元条件下においてヨードメタンを $\text{rMb}(\text{Ni}^{\text{I}}(\text{TDHC}))$ 水溶液に加え、発生気体をガスクロマトグラフィーで分析した。またタンパク質を含まない対照実験として $\text{Ni}^{\text{I}}(\text{TDHC})$ 水溶液に加えて同様に分析した。メタン発生量の経時変化の追跡により、 $\text{rMb}(\text{Ni}^{\text{I}}(\text{TDHC}))$ を用いた場合のみメタンの発生が確認された (図 4b)。さらに反応条件最適化後、 $\text{rMb}(\text{Ni}^{\text{I}}(\text{TDHC}))$ による触媒的なメタンの発生が明らかになり、 $\text{rMb}(\text{Ni}^{\text{I}}(\text{TDHC}))$ が MCR の機能モデルとして作用することを明らかにした。続いて、反応においてタンパク質骨格が果たす役割について明らかにするために酸化還元電位に注目した。 $\text{rMb}(\text{Ni}^{\text{I}}(\text{TDHC}))$ と $\text{Ni}^{\text{I}}(\text{TDHC})$ の $\text{Ni}^{\text{II}}/\text{Ni}^{\text{I}}$ に対応する酸化還元電位を分光電気化学測定により決定したところ、 $-0.65 \text{ V vs. Ag|AgCl}$ ($\text{rMb}(\text{Ni}^{\text{I}}(\text{TDHC}))$) および $-0.54 \text{ V vs. Ag|AgCl}$ ($\text{Ni}^{\text{I}}(\text{TDHC})$) となり、 $\text{rMb}(\text{Ni}^{\text{I}}(\text{TDHC}))$ の酸化還元電位は $\text{Ni}^{\text{I}}(\text{TDHC})$ のみの場合に比べて負にシフトしていることが明らかとなった。こ

これはタンパク質骨格内部における His93 からニッケル中心への軸配位の影響を示唆しており、軸配位による Ni^I(TDHC)の求核性の向上とタンパク質内部の疎水性反応場への基質の取り込みにより、メタン発生を引き起こしたと推察される。したがって、タンパク質内部の反応場がメタン発生に大きく寄与することが実証された。

MCR のモデル基質として種々のハロゲン化ベンジル化合物を用いて rMb(Ni^I(TDHC))の反応性を評価したところ、臭化ベンジルを脱ハロゲン化し、トルエンを生じることを見出した。この反応に対する置換基効果を検討するため、臭化ベンジルのパラ置換体を用いて反応の初速度の対数値を置換基定数に対してプロットする Hammett plot では、反応定数が正の値 ($\rho = 0.63$)を示した。これはニッケル一価種によるベンジル位への求核攻撃が律速段階であることを示唆する結果である。

rMb(Ni^I(TDHC))のモデルでは、反応性の高いヨードメタンからのメタン発生を実施した。しかし、天然酵素はメチル補酵素 M の S-C 結合の開裂に伴うメタン発生を促進している。そこで、同様に S-C 結合を含むメチオニン残基をヘムポケット内に有する Cyt *b*₅₆₂に着目した(図 2b)。すなわち F430 のモデル錯体によりヘムを置換した再構成 Cyt *b*₅₆₂ではタンパク質内 S-C 結合の開裂によるメタン発生を引き起こすと考えた。この系では、より高い反応性が必要と予測されたので、Ni(TDHC)よりも Ni^{II}/Ni^Iに対応する酸化還元電位を負に有する Ni(DDHC)を設計した。Ni^{II}(DDHC)は Ni^{II}(TDHC)の Pd/C を用いた接触還元により新規に合成し、ESI-TOF MS および UV-vis 吸収スペクトル測定を用いて同定した。Ni^{II}(DDHC)のアセトニトリル中におけるサイクリックボルタンメトリー測定の結果、 -0.61 V と 0.44 V vs. Ag|AgCl に可逆な酸化還元ピークを観測した。前者は Ni^{II}/Ni^Iに相当し、酸化還元電位は同様に測定した Ni^{II}(TDHC)よりも 0.16 V 負にシフトしていることからニッケル一価種の反応性の向上が期待された。また後者の値は Ni^{III}/Ni^{II}と予想され、Ni^{II}(DDHC)が F430 よりも狭い範囲に酸化還元電位を有することを明らかにした。

リン酸緩衝液中において Ni^{II}(DDHC)に対してアポ Cyt *b*₅₆₂を添加することで MCR モデルとして再構成 Cyt *b*₅₆₂(rCyt *b*₅₆₂(Ni^{II}(DDHC)))を得た。UV-vis 吸収スペクトルはタンパク質に取り込まれる前後で大きな変化を示さなかったが、円偏光二色性スペクトルにおいては紫外光領域において 208 nm と 222 nm の強度の増加が観測されたことから、Ni^{II}(DDHC)のタンパク質への挿入を確認した。さらに ESI-TOF MS より Ni^{II}(DDHC)とタンパク質の 1 対 1 の複合化を確認した。また、Ni^{II}(TDHC)とアポ Cyt *b*₅₆₂を複合化することで、同様に再構成 Cyt *b*₅₆₂(rCyt *b*₅₆₂(Ni^{II}(TDHC)))の調製もおこなった。

MCR モデル反応として、光増感剤を用いた系中での活性ニッケル一価種の発生によるメタン生成を試みた。具体的には、リン酸緩衝液中において、再構成 Cyt *b*₅₆₂に対して光増感剤であるトリスピリジンルテニウム錯体、犠牲試薬としてアスコルビン酸ナトリウムを加え、 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 2 時間の可視光照射後に発生気体をガスクロマトグラフィーにて分析した。まず、対照実験として実施したアポタンパク質のみ、もしくは錯体のみの場合と比較して、わずかながら rCyt *b*₅₆₂(Ni^{II}(TDHC))からのメタン発生が確認された。次に rCyt *b*₅₆₂(Ni^{II}(TDHC))に対し、rCyt *b*₅₆₂(Ni^{II}(DDHC))を用いた場合は 12 倍のメタン発生が確認された。メタン発生量の向上はサイクリックボルタンメトリー測定の結果と合致していると考えられ、ニッケル一価種の反応性の向上に由来するものと推察される。MCR 内部において、タンパク質骨格のアミノ酸残基との非共有結合により活性中心 F430 ならびに各基質が正確に配置されていることから、近接効果によって不活性なスルフィド結合開裂を効率化していると予想されている。本系においても、Cyt *b*₅₆₂が有するメチオニン残基の C-S 結合が活性中心に近接して存在することでメタン発生を引き起こしたと考えられる。一方、メタン発生源の特定のため、Met7 をロイシンに変化させた変異型 Cyt *b*₅₆₂M7L の再構成タンパク質を用いて同様の検討を行ったところ、メチオニン残基の喪失によりメタン発生量が大きく減少した。さらに、反応の前後によるタンパク質骨格の質量変化を ESI-TOF MS を測定したところ、野生型の rCyt *b*₅₆₂(Ni^{II}(DDHC))を用いた場合は反応後にメチル基一つ分の質量を喪失したピークが確認された。しかし、変異型の rCyt *b*₅₆₂M7L(Ni^{II}(DDHC))を用いた場合は、同様な質量変化が観測されなかった。以上の結果より、当該メチオニン残基がメチル基供与体として機能していることが明らかとなった。また、MCR における補酵素 B のモデル基質として、活性中心近傍の Leu3 をシステインに変化させた変異型 Cyt *b*₅₆₂L3C を用いて同様の検討を行った結果、メタン発生量が変位導入前に比べて、24%向上し、タンパク質内部の反応場における活性中心と各基質の近接した配置の重要性を実証した。

上記の通り、メチル補酵素 M 還元酵素のモデルを Ni ポルフィリノイド化合物とヘムタンパク質を用いた独自の手法により開発し、モデル反応においてメタン発生反応を促進することを明らかにした。今後、本モデルの詳細な評価によりメチル補酵素 M 還元酵素の反応機構や作用機序の理解に寄与すると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Oohora Koji, Miyazaki Yuta, Hayashi Takashi	4. 巻 58
2. 論文標題 Myoglobin Reconstituted with Ni Tetrahydrocorrin as a Methane Generating Model of Methyl coenzyme M Reductase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 13813 ~ 13817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201907584	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyazaki Yuta, Oohora Koji, Hayashi Takashi	4. 巻 901
2. 論文標題 Methane generation via intraprotein C-S bond cleavage in cytochrome b562 reconstituted with nickel dihydrocorrin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Organometallic Chemistry	6. 最初と最後の頁 120945 ~ 120945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jorganchem.2019.120945	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ogawa Ayumu, Oohora Koji, Hayashi Takashi	4. 巻 57
2. 論文標題 Synthesis and Characterization of meso-Substituted Cobalt Tetrahydrocorrin and Evaluation of Its Electrocatalytic Behavior Toward CO ₂ Reduction and H ₂ Evolution	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inorganic Chemistry	6. 最初と最後の頁 14644 ~ 14652
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.inorgchem.8b02333	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ogawa Ayumu, Oohora Koji, Gu Wenting, Hayashi Takashi	4. 巻 55
2. 論文標題 Electrochemical CO ₂ reduction by a cobalt bipyridine complex: decrease of an overpotential value derived from monoanionic ligand character of the porphyrinoid species	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 493 ~ 496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8CC08876D	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kajihara Ryota, Oohora Koji, Hayashi Takashi	4. 巻 193
2. 論文標題 Photoinduced electron transfer within supramolecular hemoprotein co-assemblies and heterodimers containing Fe and Zn porphyrins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Inorganic Biochemistry	6. 最初と最後の頁 42 ~ 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jinorgbio.2019.01.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oohora Koji, Onoda Akira, Hayashi Takashi	4. 巻 52
2. 論文標題 Hemoproteins Reconstituted with Artificial Metal Complexes as Biohybrid Catalysts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Accounts of Chemical Research	6. 最初と最後の頁 945 ~ 954
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.accounts.8b00676	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki Yuta, Oohora Koji, Hayashi Takashi	4. 巻 59
2. 論文標題 Methane Generation and Reductive Debromination of Benzylic Position by Reconstituted Myoglobin Containing Nickel Tetrahydrocorrins as a Model of Methyl-coenzyme M Reductase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inorganic Chemistry	6. 最初と最後の頁 11995 ~ 12004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.inorgchem.0c00901	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Takashi Hayashi, Akira Onoda, Koji Oohora
2. 発表標題 Hemoprotein Modification Toward Artificial Biocatalyst Generation
3. 学会等名 Artzymes2.0 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Hayashi, Yuta Miyazaki, and Koji Oohora
2. 発表標題 A Functional Model of Methyl-coenzyme M Reductase Using Myoglobin Reconstituted with a Nickel Porphyrinoid Complex
3. 学会等名 2019 Korea-Taiwan-Japan Biological Inorganic Chemistry Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 高史
2. 発表標題 タンパク質マトリクスが形成する分子空間を反応場に利用した人工生体金属触媒の創製
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuta Miyazaki, Koji Oohora, Takashi Hayashi
2. 発表標題 Construction and Evaluation of a Protein-based Functional Model of Methane-producing Enzyme
3. 学会等名 錯体化学会第68回討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuta Miyazaki, Koji Oohora, Takashi Hayashi
2. 発表標題 Methanogenesis from a Hemoprotein-based Functional Model of Methane-producing Enzyme
3. 学会等名 JSPS Japanese-German Graduate Externship International Symposium Biological and Chemical Methods for Selective Catalysis
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuta Miyazaki, Koji Oohora, Takashi Hayashi
2. 発表標題 Construction and Evaluation of Functional Models of Methane-producing Enzyme by Combining a Ni Corrinoid Complex with a Protein Matrix as a Reaction Scaffold
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayashi Takashi
2. 発表標題 Myoglobin Reconstituted with a Corrinoid Metal Complex
3. 学会等名 9th Asian Biological Inorganic Chemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学大学院工学研究科林研究室 http://www.chem.eng.osaka-u.ac.jp/~hayashiken/index.html

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------