

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15393

研究課題名(和文) 過酸化水素を介した合成-生体触媒カスケードの開発

研究課題名(英文) Chemoenzymatic cascades mediated by in situ generated H₂O₂.

研究代表者

岡本 泰典 (Okamoto, Yasunori)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教

研究者番号：50843405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：低環境負荷型の物質変換技術である酵素カスケードに合成触媒を統合できれば、合成可能な分子の種類が増大する。しかし、合成触媒と生体触媒では反応条件が異なることが多い。本研究では、酵素反応と同様の条件下で動作する合成触媒とその反応生成物によって駆動する酵素を組み合わせることで、犠牲試薬や補酵素を必要としないカスケード反応を構築する。

初年度はスクリーニングによって見出した本研究に対して有望だと考えられる錯体を合成し、第二年度には既報を参考にして改変ヘムタンパク質を調製した。これらを用いてカスケード反応を検討したところ、わずかではあるが、最終生成物に由来すると考えられる吸収変化が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複数の酵素(生体触媒)を同時利用した酵素カスケードでは、酵素反応の利点である温和な反応条件と高い選択性に加え、中間体の単離・精製を省略可能なため、高い空間時間収率も期待できる。このように低環境負荷型の物質変換技術として、酵素カスケードは有望である。酵素カスケードに合成触媒を統合できれば、合成可能な分子の種類が飛躍的に増大する。本研究では、合成触媒反応の生成物によって駆動する天然酵素を組み合わせることで、犠牲試薬や高価な補酵素を必要としない合成-生体触媒カスケードの構築をめざしており、低環境負荷型の物質変換技術に資するものである。

研究成果の概要(英文)：Enzymatic cascades enable multistep chemical transformations in a high space-time yield under environmentally friendly reaction conditions. Integrating synthetic catalysts into enzyme cascades is expected to increase the number of synthesizable molecules. However, the reaction conditions of synthetic catalysts and those of biocatalysts are very different. This project aims to construct a cascade reaction, which does not require sacrificial reagents or coenzymes, by combining a synthetic catalyst that works under the conditions relevant to enzymatic reaction with an enzyme driven by the product of the synthetic catalyst. In the first year, a synthetic catalyst found through screening was synthesized. In the second year, we prepared a modified heme protein based on previous reports. These were concurrently used in a reaction vessel, leading to slight absorption changes that may be derived from the final product.

研究分野：生体触媒化学

キーワード：生体触媒化学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

水中・温和な反応条件で高選択的な物質変換を可能とする酵素は、有機合成化学の有用なツールとして認識されている。しかし、生体内で複数の酵素が同時に動作して複雑な天然物を合成するように、酵素反応の真価は複数の反応をワンポットで同時に使用可能な点にあると考える。複数の酵素を同時に用いたワンポットでの多段階物質変換、すなわち、多段階酵素カスケードでは中間体を単離精製する必要がない。そのため、収率の向上と化学物質（溶媒等）の使用量の低減が期待できる。

このように低環境負荷型の物質変換技術として酵素カスケードは有望であるものの、その多くは NADH などの補酵素の再生系と組み合わせたものである。補酵素の再生系には犠牲試薬が必要となるため、アトムエコノミーの観点から改善が必要である。改善例である hydrogen-borrowing cascade では、一段階目の酵素反応によって、二段階目の酵素反応の基質と補酵素を合成するため、犠牲試薬が不要である。しかし、そのような酵素カスケードの例は多くない。さらに、hydrogen-borrowing cascade においても、二つの酵素反応を繋ぐ分子として高価な補酵素が必要となる。

また、多様な物質変換能を有する合成触媒を酵素カスケードに統合できれば、合成可能な分子の種類が飛躍的に増大する。しかし、酵素と合成触媒の反応条件（温度、溶媒など）は大きく異なるうえ、互いに失活し合うため、酵素と合成触媒の同時使用例は限られている。

2. 研究の目的

上述のような背景の下、(1) 犠牲試薬を必要とせず、(2) 二つの反応を繋ぐ分子として高価な補酵素を必要としない、(3) 合成触媒と生体触媒からなるカスケード反応の開発を本研究の目的とした。このようなシステム的设计にあたり、報告者は過酸化水素 (H_2O_2) に注目した。過酸化水素は多くの酸化還元酵素によって生成あるいは消費される。そのため、従来の酵素カスケードにおいて用いられてきた NADH/NAD⁺ のように H_2O_2/O_2 は複数の反応を接続する役割を担うことができると考えた。

本研究では、合成 - 生体触媒カスケードで用いる酵素として、過酸化水素駆動型の酸化酵素を選択した。また、合成触媒としては、報告者の開発した含窒素環状化合物の光駆動型脱水素化触媒 $[Cp^*Ir(dppz)Cl]^+$ を利用する。この光触媒は、医薬中間体の部分骨格によく見られる含窒素環状化合物の選択的脱水素化を水中・常温で触媒する。これは多くの酵素の反応条件に合致する。さらに、この光触媒反応では過酸化水素を副生成物として生じるため、過酸化水素駆動型酸化酵素との共利用が可能であると予想した。これらより、本研究では、光触媒 $[Cp^*Ir(dppz)Cl]^+$ による含窒素化合物の脱水素化反応と過酸化水素駆動型酸化酵素による酸化反応からなるワンポット二段階反応系の構築をめざした。

3. 研究の方法

(ステップ 1) 過酸化水素駆動型酸化酵素の調製

光触媒と組み合わせる過酸化水素駆動型酸化酵素の発現系を構築した。本研究では、大腸菌での発現系が確立されているミオグロビンに注目した。ミオグロビンの元来の機能は酸素貯蔵であるが、活性中心近傍への変異導入によって過酸化水素駆動型酸化酵素へと機能変化が可能であることが報告されてきた。その中でも報告者は F43Y 変異体に注目した。この変異体はインドールを基質とし、インディゴへの酸化反応を高選択的に触媒することが報告されている。本研究で用いる光触媒 $[Cp^*Ir(dppz)Cl]^+$ はインドリンのインドールへの脱水素化反応を触媒することを見出しており、ミオグロビン F43Y 変異体との組み合わせは妥当であると考えた。ステップ 1 ではこのミオグロビン F43Y 変異体の大腸菌による発現および精製方法を確立し、得られたミオグロビン F43Y 変異体の触媒能を評価した。

(ステップ 2) 過酸化水素駆動型酸化酵素と光触媒 $[Cp^*Ir(dppz)Cl]^+$ によるカスケード反応の構築

酵素と金属錯体触媒をワンポットで利用する場合、それらの相互失活が多く見られる。金属錯体触媒側の失活の主な原因としては酵素の表面に存在する配位性のアミノ酸残基が金属錯体触媒に配位してしまうことが挙げられる。なかでも影響が大きいのはシステインなどのチオール類である。そこで、光触媒 $[Cp^*Ir(dppz)Cl]^+$ の生体分子に対する堅牢性を評価するため、チオール化合物存在下での触媒活性の評価を行なった。

つぎに、過酸化水素駆動型酸化酵素が光触媒 $[Cp^*Ir(dppz)Cl]^+$ の存在下によっても失活することなく機能するかを検討した。光触媒 $[Cp^*Ir(dppz)Cl]^+$ による含窒素環状化合物の脱水素化反応に伴って生成する過酸化水素を用いて、西洋ワサビペルオキシダーゼが呈色反応である 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) の酸化反応を触媒可能であるかを評価した。その後、ステップ 1 で得られたミオグロビン F43Y 変異体を用いて、インドリンからインドールを介したインディゴ合成を検討した。

4. 研究成果

(ステップ1) 過酸化水素駆動型酸化酵素の調製

ミオグロビン F43Y 変異体の大腸菌発現系の構築に取り組んだ。先行研究に則り設計したミオグロビン F43Y 変異体の合成遺伝子をプラスミドベクターに組み込み、BL21DE3 株を用いて目的タンパク質の発現を試みた。IPTG による発現誘導後の菌体の SDS-PAGE の結果から、目的とするタンパク質の分子量に対応するバンドを確認することができた。続いて、氷上で菌体を超音波破碎した後、遠心分離を行いタンパク質の抽出液を得た。通常、ヘムタンパク質は活性中心である鉄プロトポルフィリン IX 錯体に由来する赤褐色を示す。しかし、得られた抽出液にはそのような色が見られなかったため、紫外可視光吸収スペクトルを測定した。鉄プロトポルフィリン IX 錯体に由来する特徴的な吸収がわずかではあるが、確認できたため、陽イオン交換カラムおよびサイズ排除クロマトグラフィーカラムでの精製を行なった。しかし、得られたミオグロビン F43Y 変異体はヘムを含まないアポ体であった。そこで、ヘムの導入率を向上させるため、ホスト大腸菌の種類、培地の組成や培養温度、発現誘導のタイミング、また鉄プロトポルフィリン IX 錯体、その前駆体である 5-aminolevulinic acid や鉄イオンの培地への追加などを網羅的に検証した。しかし、いずれの条件においても培養後の菌体が赤褐色を示すことはなかったため、ホロ型のミオグロビン F43Y 変異体を得ることはできなかった。

そこで、他の先行研究で用いられていた別のミオグロビン発現プラスミドを用いて、野生型ミオグロビンの発現を試みたところ、赤褐色の菌体を得ることに成功した。そこで、このプラスミドに対して、F43Y 変異を導入した。野生型よりも発現量は少ないものの、F43Y 変異体についても赤褐色の菌体を得られた。次に、ホスト大腸菌の種類を検討したところ、C41DE3 株を用いた場合でホロ体を最も多く得ることができた。次に精製条件を検討した。菌体の破碎方法としては、フレンチプレス、超音波、凍結融解の中でフレンチプレスが最も効率よく目的タンパク質を抽出可能であることがわかった。従来の方法では得られた細胞抽出液をイオン交換カラムで精製しているが、それでは不純物を完全に除去することが困難であったり、また十分な収量を得ることができなかった。そこで、カラム精製の前処理として硫酸アンモニウムによって不純物を除去した後、95%まで硫酸アンモニウムの濃度を上げることで、目的タンパク質をペレットとして得た。このペレットを硫酸アンモニウムを含まない緩衝液で再溶解・透析した。その後、得られた溶液を陰イオン交換カラムおよびサイズ排除クロマトグラフィーカラムを用いて精製したところ、目的とするホロ型のミオグロビン F43Y 変異体 ($R_z = 5.1$) を得ることに成功した。

次に、このミオグロビン F43Y 変異体を用いて、インドールのインディゴへの酸化反応を検討した。過酸化水素の存在下において、インディゴに由来する 670 nm の吸収の増大が見られた。これより、ミオグロビン F43Y 変異体がインドールのインディゴへの酸化活性を有していることが確認された。しかし、今回確認された触媒活性は先行研究で報告された値と比較して低いものであった。また、基質としてインドールの代わりにインドリンを用いた場合では、そのような吸収スペクトルの変化は見られなかったことより、ミオグロビン F43Y 変異体単体ではインドリンを出発物質としてインディゴが生成していないことが確認された。

(ステップ2) 過酸化水素駆動型酸化酵素と光触媒 $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{dppz})\text{Cl}]^+$ によるカスケード反応の構築

カスケード反応の検討に移る前段階として、光触媒 $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{dppz})\text{Cl}]^+$ の生体分子に対する堅牢性を評価した。生体分子との共利用において合成金属錯体の失活の主な原因となるのが、チオール系化合物の合成金属錯体への配位である。そこで、チオール系化合物の存在下で $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{dppz})\text{Cl}]^+$ の触媒活性を評価した。興味深いことに、触媒に対して過剰量のチオール系化合物の存在下においても $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{dppz})\text{Cl}]^+$ は触媒活性の低下を示さなかった。これより、 $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{dppz})\text{Cl}]^+$ は生体分子に対して高い堅牢性を有する可能性が示唆された。

次に $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{dppz})\text{Cl}]^+$ が酵素反応を阻害するか検討するため、 $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{dppz})\text{Cl}]^+$ による 6,7-Dimethoxy-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline の脱水素化反応後の溶液に西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) を加えて、呈色反応である 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) の酸化反応を検討した。光照射したサンプルでは、HRP による呈色反応が進行する一方で、光照射しなかったサンプルでは HRP の触媒活性は確認されなかった。これは光照射下においてのみ進行した脱水素化反応の副生成物である過酸化水素によって HRP による呈色反応が進行したことを意味する。また、この結果から $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{dppz})\text{Cl}]^+$ が HRP の活性を阻害しないことがわかった。また、この HRP による呈色反応から、反応系中で生成された過酸化水素を定量したところ、基質から過酸化水素への変換効率は 60%程度であった。

これらの結果を受け、 $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{dppz})\text{Cl}]^+$ とミオグロビン F43Y 変異体によるインドリンのインディゴへの二段階酸化反応を検討した。その結果、わずかではあるが、酵素カスケードの最終生成物に由来すると考えられる吸収変化が見られた。本系の反応効率の改善のためには、ミオグロビン F43Y 変異体の活性の向上が必要不可欠だと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yasunori Okamoto
2. 発表標題 A visible-light promoted amine oxidation catalysed by a Cp*Ir complex reminiscent of monoamine oxidase
3. 学会等名 International Symposium on Bioorganometallic Chemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡本 泰典、Holly Jane Davis、Thomas R. Ward
2. 発表標題 水中における可視光駆動型イリジウム触媒によるアミンの酸化反応
3. 学会等名 第53回酸化反応討論会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------