

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22655017

研究課題名（和文）

金属クラスター含有メタロチオネインの構築とニトロゲナーゼ機能モデルへの挑戦

研究課題名（英文）

Construction of a Nitrogenase Model Using Metal Cluster-Containing Metallothionein

研究代表者

林 高史 (HAYASHI TAKASHI)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：20222226

研究成果の概要（和文）：メタロチオネインの α 鎖と鉄イオンとの複合体を合成し、ヒドラジン等の還元反応を追跡した。この鉄錯体は、メチルレッド等の還元的窒素-窒素結合の切断を円滑に進行させることが明らかとなった。さらに平行して、鉄-硫黄クラスターから成り立つヒドロゲナーゼにも着目し、その機能モデルの構築も行った。こちらは、ヘムを除去したチトクロム *c* をタンパク質マトリクスに鉄 2 核カルボニル錯体を挿入した新しいタンパク質複合体を構築し、プロトンを水素に還元する触媒能を獲得した。

研究成果の概要（英文）：The reduction of hydrazine derivatives by a synthetic metallothionein complex with iron ions was monitored. Particularly, the complex is found to bring about the reductive N-N bond cleavage of methyl red smoothly. In addition, the functional model of hydrogenase with iron-sulfur cluster was also prepared by the conjugation between apocytocrome *c* matrix and iron-carbonyl cluster. The obtained complex exhibits the hydrogenase activity toward the H_2 generation in aqueous media.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	0	1,700,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	420,000	3,520,000

研究分野：生物無機化学

科研費の分科・細目：基礎化学・無機化学

キーワード：タンパク質、酵素、鉄硫黄クラスター、触媒

1. 研究開始当初の背景

これまで金属イオン・錯体を含む天然の金属タンパク質の研究は、構造解析と反応のメカニズム解明に尽力が注がれ、その結果多くの生体金属分子の全貌が明らかとなった。一方、この構造や反応の解析結果を用い、次のステップとして天然を凌駕する新しい非天

然金属タンパク質を創製する試みは、興味ある分野であるが、まだ黎明期と言える。その中でも、ヘムタンパク質を基盤とした高活性ペルオキシダーゼ (T. Hayashi *et al.*, *JACS* 2007 & 2009) や高酸素親和性ミオグロビン (T. Hayashi *et al.*, *JACS* 2004) 等については、本研究代表者が当該分野をリードし、天然の

活性を超える金属タンパク質の創製を展開している。一方、金属クラスター含有酵素については、まだ顕著な機能改変・制御を試みた報告例はない。したがって、生体材料を用いた鉄硫黄クラスター酵素の優れた機能モデル構築の提案は、本分野のブレークスルーとなると考えた。

2. 研究の目的

メタロチオネインと呼ばれるタンパク質はシステインを非常に多く含み、生体内で Zn, Cd, Hg 等の重金属を捕捉、無毒化（運搬と排出）する役割を有する。一方、このタンパク質は Fe や Co 等の遷移金属イオンとも結合し、金属クラスターを内部に形成することが知られている。本課題研究ではメタロチオネインをモチーフとし、そのタンパク質内部の配位空間に目的に応じた金属クラスターを埋め込んだ生体類似金属酵素を人工的に創製する。さらに得られた生体金属錯体を、複雑な構造を有するニトロゲナーゼの機能モデルとみなして、様々な小分子基質の触媒的還元反応、特にチャレンジングな目標として窒素の固定化（アンモニアへの還元）をめざすことを目的とした。また、同様なコンセプトのもと、ヘムタンパク質のヘムポケットも金属錯体の有用な反応場と考え、チトクロム *c* のアポ体（ヘムを除去したタンパク質）に金属錯体（鉄二核カルボニル錯体）を埋め込み、水（プロトン）を水素に還元するヒドロゲナーゼ様の新しい生体金属触媒の構築をめざした。

3. 研究の方法

(1) メタロチオネインタンパク質を用いたニトロゲナーゼモデル系の構築

本課題研究ではまず、ニトロゲナーゼ反応を触媒する生体類似機能性金属錯体の創製に向けて、i) メタロチオネイン α , β ドメイン内での金属クラスター形成、ii) 人工酵素触媒の活性評価、iii) 活性部位改変による機能向上、の3項目に順次取り組んだ。具体的には、得られたタンパク質包接金属クラスターの同定 (ESI-MS, ICP, NMR, EPR, など) と酸化還元電位測定を通じて、金属クラスターに最適なタンパク質マトリックスのファインチューニングを行った。その上で、まず還元能を評価するために、Fe(II)メタロチオネイン α 鎖錯体によるメトミオグロビンの還元反応をモニターした。次に、水中での電子とプロトンを用いた小分子の還元（水素化）として、アズベンゼンの誘導体の還元的窒素-窒素結合解離を Fe(II)メタロチオネイン α 鎖錯体で試み、HPLC で生成物解析を行った。最後に、窒素のアンモニアへの変換や水素発生

などに挑戦し、生体酵素類似触媒の開発を試みた。

(2) アポチトクロム *c* と鉄カルボニルクラスターの複合体によるヒドロゲナーゼモデル系の構築

馬心筋チトクロム *c* のヘムを除去したアポ体の調製を行い、そこに Fe₂(CO)₉ をグローブボックス中(N₂ 雰囲気下)で加え、タンパク質と鉄二核錯体の複合体を行った。得られた錯体は種々の分光的手法で同定を行った。さらに、得られたアポチトクロム *c* 鉄二核錯体について、光触媒を添加して還元を行い、得られる活性種によるプロトンから水素への反応を、ガスクロマトグラフィー（活性炭カラム）によって分析し、水素発生効率を求めた。

4. 研究成果

(1) メタロチオネインタンパク質を用いたニトロゲナーゼモデル系の構築

本研究者は、課題研究を通じて、メタロチオネインとタンパク質マトリックスとして用いたニトロゲナーゼの機能モデルの構築を実施してきた。具体的には、メタロチオネインの α 鎖と鉄イオンとの複合体を合成し、ヒドラジン等の還元反応を追跡した。

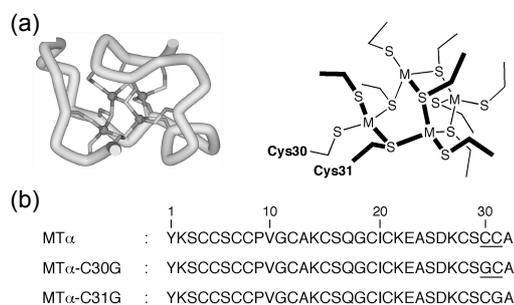


図 1 (a) メタロチオネイン α ドメイン (MT α) の活性中心. (b) MT α と変異体のアミノ酸配列。

メタロチオネインの α 鎖は、合計で 11 個のシステインを有する計 31 個のアミノ酸から構成されている (図 1)。これまで、Cd や Zn と結合したメタロチオネイン金属錯体が知られているが、今回まず Fe(II)との錯体を合成し、同定を行った。この錯体は、Fe(II)塩とメタロチオネイン α 鎖をグローブボックス中で混合したのちに、単離・精製して使用した。紫外可視吸収スペクトル (UV-vis) を用いた滴定実験により Fe(II)イオンとペプチドとの錯形成を調べたところ、315 nm に極大と 400 nm 付近にショルダーもつ吸収が観測され、Fe(II)S₄ の四面体配位構造を形成してい

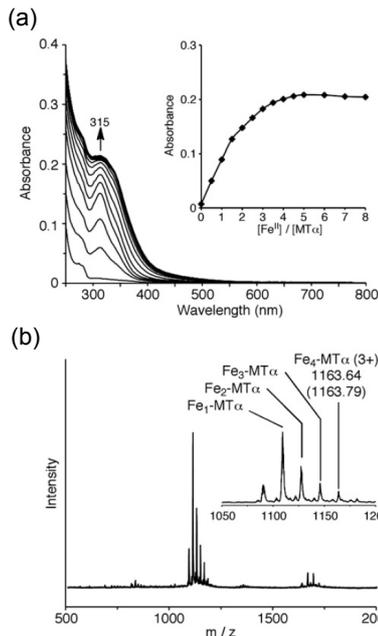


図 2 Fe(II)メタロチオネイン α 鎖錯体の (a) UV-vis 滴定及び ESI MS 測定結果

ることが示唆された。また、ペプチドに対して Fe(II)イオンを 4 当量滴下した時点で吸収変化が飽和に達しており、Fe(II)メタロチオネイン α 鎖錯体は想定した Fe(II)四核クラスターを形成していると考えられる (図 2a)。精製後の Fe(II)メタロチオネイン α 鎖錯体は ESI MS により四核鉄クラスター含有ペプチド錯体を形成していることを確認した (図 2b)。C30G, C31G 変異体においても同様の結果を得た。

次に得られた Fe(II)メタロチオネイン α 鎖錯体が、metMb を速やかに deoxyMb に還元する能力を有することを確認した (図 3)。その上で、N₂を還元することを試みたが、現時点では、予想されるアンモニア生成物を検出するには至らなかった。しかしながら、アゾベンゼン類縁体である、メチルレッド、メチルオレンジにおいては、窒素-窒素二重結合が切断された、対応するアニリン誘導体が定

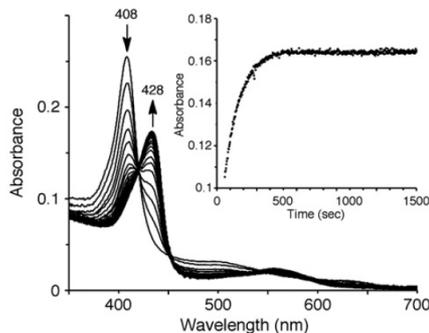


図 3 Fe(II)メタロチオネイン α 鎖錯体と metMb を反応した際の吸収変化

量的に得られることを HPLC の分析から観測した (図 4)。以上、最終目標である窒素固定 (アンモニアへの変換) はまだ達成されていないが、合成した Fe(II)メタロチオネイン錯体が、多電子還元能を有することを明らかとした。

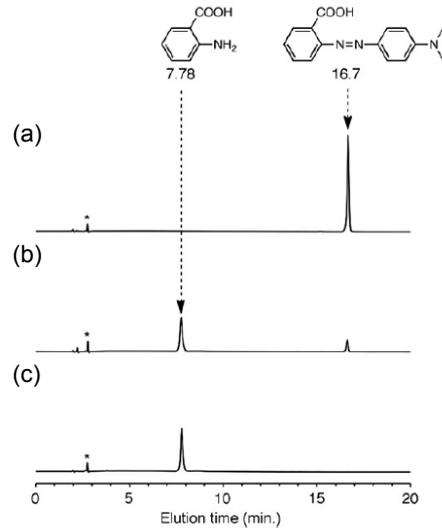


図 4 Fe(II)メタロチオネイン α 鎖錯体とアゾベンゼン誘導体の反応における生成物の HPLC 分析結果。 (a) 0 h, (b) 2 h, (c) 6 h。

(2)アポチトクロム *c* と鉄カルボニルクラスターの複合体によるヒドロゲナーゼモデル系の構築

鉄ヒドロゲナーゼ ([FeFe]-H₂ase) の活性中心 H-クラスターはジチオラート配位子が架橋した二核鉄クラスターから構成され、さらにカルボニルおよびシアン化物イオンが二核鉄中心に配位した構造をとる (図 5a)。一方で、馬心筋チトクロム *c* 内に存在する補欠分子ヘムは、Cys14 及び Cys17 のシステイン残基末端と共有結合で結ばれている (図 5b)。常法の硫酸銀による処理により、ヘムを除去してアポチトクロム *c* を調製した後に、Fe₂(CO)₉ を添加し、ヘムポケット内で本来へ

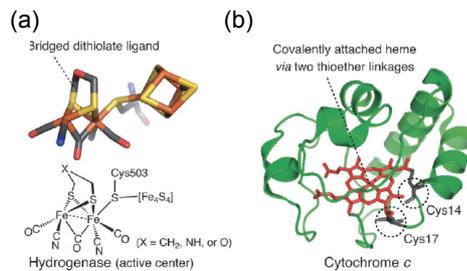


図 5 (a) [FeFe]ヒドロゲナーゼの活性中心. (b) チトクロム *c* の構造

ムと結合していた Cys14 及び Cys17 末端のチオール基を介したヒドロゲナーゼ活性部位に類似の鉄二核錯体 $[(\mu\text{-S-Cys})_2\text{Fe}_2(\text{CO})_6]$ を合成した (図 6a)。得られたタンパク質と鉄二核錯体の複合体は、ESI-TOF MS において、予想される分子量と一致することを確認した。さらに、チトクロム *c* 内に固定された鉄カルボニル錯体は、これまでに知られている、鉄二核カルボニルモデル錯体と同様の UV-vis、及び IR 吸収を与えたことから、システイン残基の 2 つのチオールが配位した鉄二核カルボニル錯体であることを示した (図 7)。

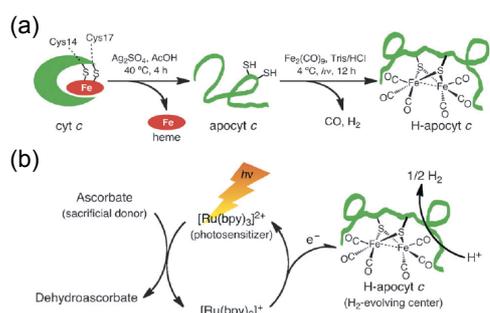


図 6 (a) アポチトクロム *c* への二核鉄中心の導入法. (b) 光増感剤の Ru 錯体存在下におけるアポチトクロム *c*-鉄カルボニルクラスター複合体を触媒とした水素発生反応。

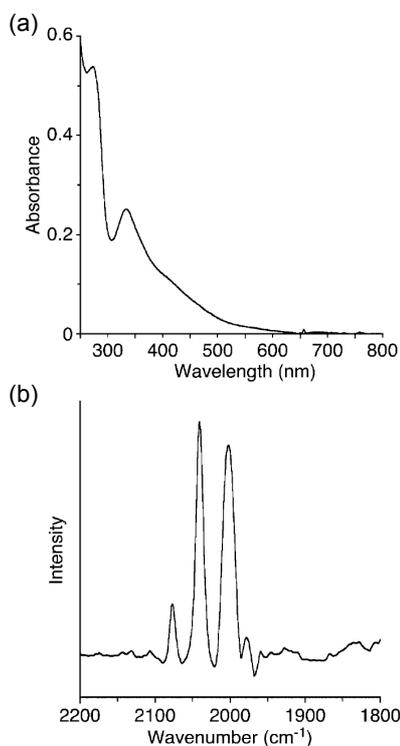


図 7 アポチトクロム *c*-鉄カルボニルクラスター複合体の (a) 吸収スペクトルと (b) IR スペクトル(カルボニル伸縮領域)。

次に、得られた錯体を pH 4.7 の水溶液に溶解し、さらにルテニウムビピリジル錯体 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ とアスコルビン酸を光増感剤及び犠牲試薬として添加した (図 6b)。光照射下 (Xe ランプ) で水素発生を試み、水素ガスの生成量をガスクロマトグラフィーから分析した結果 (図 8)、2 時間でターンオーバー数が約 80 となった。これは、水中でのヒドロゲナーゼ機能モデルの中では、極めて高い値である。一方、参照実験としてアミノ酸 1 1 量体のオリゴペプチド (システインを 2 つ含む) をプラットフォームとする鉄二核錯体の活性は、顕著に低いことが示され (2 時間でターンオーバー数が 10 以下) タンパク質マトリクスが高活性獲得に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、pH 値は 4.7 で、錯体の活性が最も高いことも判明した。以上、既存のタンパク質のマトリクスが効果的に機能した新しいタイプの生体金属触媒の創製手法を提案した。

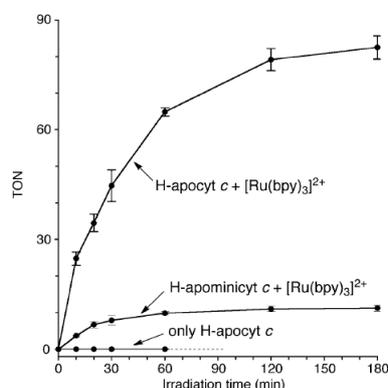


図 8 アポチトクロム *c*-鉄カルボニルクラスター複合体の触媒活性の時間変化。H-cyt *c* (14 μM , 1.4 nmol), $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (140 μM), ascorbate (100 mM), Tris/HCl buffer (50 mM, pH 4.7), 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Yohei Sano, Akira Onoda, and Takashi Hayashi

Photocatalytic Hydrogen Evolution by a Diiron Hydrogenase Model Based on a Peptide Fragment of Cytochrome *c*₅₅₆ with an Attached Diiron Carbonyl Cluster and an Attached Ruthenium Photosensitizer

J. Inorg. Biochem.

査読有り

108, 2012, 159–162.

(2) Yohei Sano, Akira Onoda, and Takashi Hayashi

A Hydrogenase Model Ssystem Based on the Sequence of Cytochrome *c*: Photochemical Hydrogen Evolution in Aqueous Media
Chem. Commun.

査読有り
47, 2011, 8229–8231.

(3) Yohei Sano, Akira Onoda, Rie Sakurai, Hiroaki Kitagishi, and Takashi Hayashi
Preparation and Reactivity of a Tetranuclear Fe(II) Core in the Metallothionein α -Domain
J. Inorg. Biochem.

査読有り
105, 2011, 702–708.

〔学会発表〕(計6件)

(1) Takashi Hayashi
Modification and Functionalization of Hemoproteins
The 11th Global COE International Symposium: Bio-Environmental Chemistry
2011.12.20
Osaka University

(2) 佐野洋平・小野田晃・林高史
シトクロム *c* を用いた鉄ヒドロゲナーゼ活性中心モデルの構築、第 61 回錯体化学討論会、2011.9.18、岡山理科大学

(3) Takashi Hayashi
New Synthetic Model for [FeFe]-Hydrogenase using Cytochrome *c* as a Protein Matrix
4th Aachen-Osaka Joint Symposium "Direct Catalytic Activation of Inert Substrates"
2011.9.2
Aachen Institute Technology, Germany

(4) 佐野洋平、小野田晃、林高史
鉄ヒドロゲナーゼシステムを指向した人工金属酵素の調製および分子間・分子内電子移動を利用した可視光駆動型水素発生反応
第 38 回生体分子科学討論会
2011.6.23
筑波大学

(5) 佐野洋平・小野田晃・林高史、ヒドロゲナーゼモデルシステムをめざした鉄カルボニルクラスター含有タンパク質の調製および光化学水素発生反応の検討、第 21 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2011.5.31、葉大学西千葉キャンパス

(6) 佐野洋平・小野田晃・林高史、ヒドロゲナーゼモデルを指向した鉄カルボニルクラスター含有タンパク質の調製と水中におけ

る水素発生反応の触媒機能、日本化学会第 91 春季年会、2011.3.28、神奈川大学

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.chem.eng.osaka-u.ac.jp/~hayashiken/index.html>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
林 高史 (HAYASHI TAKASHI)
大阪大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：20222226

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：