

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26620045

研究課題名(和文) アルカンの水酸化を触媒するミオグロビン創製への挑戦

研究課題名(英文) Construction of Engineered Myoglobin toward a Catalyst for Alkane Hydroxylation

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：シトクロムP450は不活性なC-H結合の水酸化に対して触媒作用を示す酵素である。一方で、酸素貯蔵能を有するミオグロビンは同じ補因子であるヘムを有するにもかかわらず、水酸化反応の触媒活性を示さない。本研究では、ヘムをポルフィセンマンガン錯体に置換した再構成ミオグロビンのC-H結合水酸化触媒能に注目し、更なる高機能化をめざした。高分解能の結晶構造を明らかにし、分光学的手法により活性種の同定を行った。得られた知見に基づき、変異体を設計し、エチルベンゼン水酸化の不斉選択性の向上を達成した。また水酸化の困難なヘキサン等に対しても水酸化触媒能を示し、高活性な人工金属酵素の創製のための知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Myoglobin, an O₂-storage hemoprotein, shows very low peroxidase and monooxygenase activities and does not catalyze alkane hydroxylation, although myoglobin possesses the same cofactor, heme b, as seen in a series of heme-dependent enzymes such as horseradish peroxidase and cytochrome P450. Our group previously reported that myoglobin reconstituted with manganese porphycene catalyzes C-H bond hydroxylation using H₂O₂ as a terminal oxidant. In this study, we have demonstrated that reconstituted myoglobin mutants accelerate the hydroxylation of the inert alkane substrates with high enantioselectivity and catalytic activity. The active intermediate was assigned as the Mn(V)-oxo species by spectroscopic measurements. Based on these findings, several mutants were further designed. The mutants are found to improve the enantioselectivity for chiral alcohol products and show catalytic activity for hydroxylation of more inert alkanes such as hexane.

研究分野：生物無機化学

キーワード：ミオグロビン 再構成 マンガンポルフィセン 水酸化

1. 研究開始当初の背景

シトクロム P450 は生体内に広く存在する酵素であり、プロトポルフィリン IX 鉄錯体 (ヘム) を補因子として有する (図1)。この一連の酵素は主に、非常に結合エネルギーの高い $C(sp^3)-H$ 結合を活性化し水酸化する。この反応の活性種は鉄 4 価オキソポルフィリン カチオンラジカル (compound I) と呼ばれ、各種分光法で生成機構が詳細に評価されており、酸素分子を還元的に活性化し、パーオキソ錯体の不均一開裂を経て生成することが提唱されている。この活性種の生成は天然基質の結合が引き金となるため、一般的にシトクロム P450 を用いて非天然の基質を物質変換することは困難とされている。しかしながら、この水酸化触媒反応は非常に魅力的であるため、複数の研究グループがシトクロム P450 の改変を実施しており、活性化の引き金として作用する疑似基質を添加する手法や複数の変異導入により基質特異性を克服する手法等が研究されている。

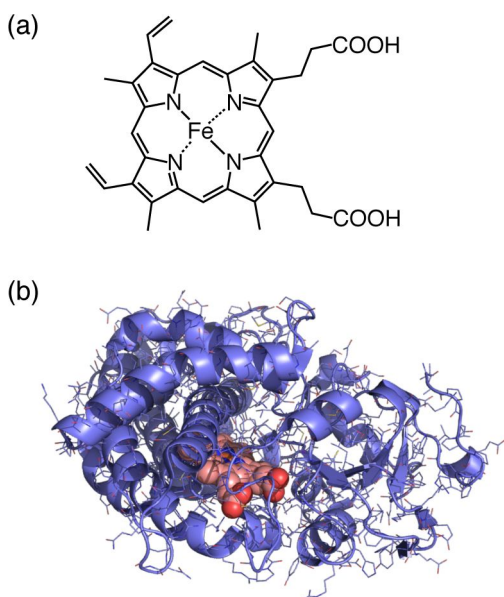
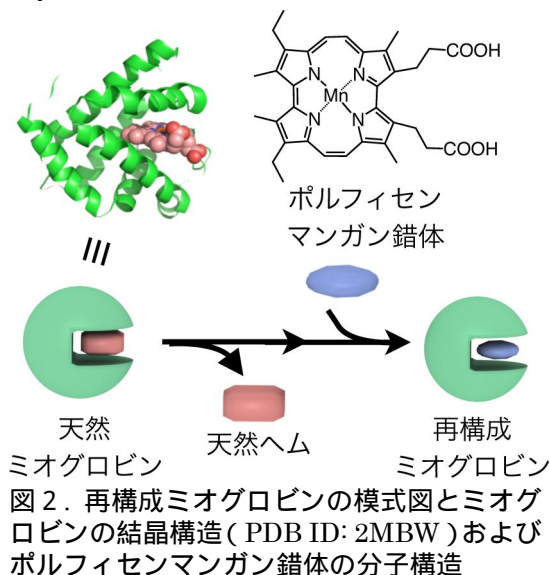


図1 (a) プロトポルフィリン IX 鉄錯体 (ヘム) の分子構造 (b) シトクロム P450_{cam} の結晶構造 (PDB ID: 1DZ4)

上記の研究に対して、本研究代表者のグループでは、シトクロム P450 と同様の補因子であるヘムを有するミオグロビンの機能改変を実施してきた。ミオグロビンは酸素貯蔵タンパク質であり、全く同じ補因子を持つにもかかわらず、 $C(sp^3)-H$ 結合の水酸化に対しては全く触媒活性を示さず、またペルオキシダーゼ活性も天然のヘム酵素に比較して、非常に低い。そこで、劇的な機能改変を指向して、ミオグロビンからヘムを取り出し、アポタンパク質を調製し、さらに合成した人工補因子を挿入して得られる再構成ミオグロビンの研究を実施してきた。特に、ポルフィリンの構造異性体であるポルフィセンの鉄錯体を有する再構成ミオグロビンは、高いペルオキシダーゼ活性を示す。一方で、

$C(sp^3)-H$ 結合の水酸化には活性がないことも明らかとしている。しかしながら、図2に示すポルフィセンのマンガン錯体を挿入した再構成ミオグロビンは過酸化水素を末端酸化剤としてエチルベンゼンを触媒的に水酸化できることを見出し、論文発表している (*J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 17282)。これは、天然ミオグロビンのタンパク質マトリクスを用いて、外部基質の $C(sp^3)-H$ 結合を水酸化した初めての例である。



上記のように、人工的に単純なヘムタンパク質を水酸化酵素へ改変する手法は非常に限られており、その活性種や触媒能向上に関する研究が、人工金属酵素の開発において必須である。

2. 研究の目的

本研究では、本研究代表者が取り組んできたポルフィセンマンガン錯体を有する再構成ミオグロビンについて、触媒としての高機能化をめざし、以下の三つの項目を目的とした。

- (1) 高分解能結晶構造解析
- (2) 活性種の評価
- (3) タンパク質マトリクスへの変異導入による不斉触媒能の付与
- (4) 高い結合解離エネルギーを有するアルカンの水酸化

3. 研究の方法

- (1) 高分解能結晶構造解析
活性の最も高い条件での再構成ミオグロビンの結晶化を実施し、構造解析を行なった。
- (2) 活性種の評価
ストップフロー法を用いて、ポルフィセンマンガン錯体を有する再構成ミオグロビンと過酸との反応を追跡した。また電子スピン共鳴法 (EPR) を用いて、活性種の同定を実施した。
- (3) タンパク質マトリクスへの変異導入

による不斉触媒能の付与

分子動力学 (MD) 計算を用いて設計したミオグロбинの変異体を複数調製し、それらにマンガンポルフィセンを挿入した再構成ミオグロビン変異体によるエチルベンゼンの水酸化触媒反応を評価した。得られるアルコール生成物の光学純度についてキラルカラムを用いたガスクロマトグラフィにより評価した。

(4) 高い結合解離エネルギーを有するアルカンの水酸化

ポルフィセンマンガン錯体を有する再構成ミオグロビンを用いて、シクロヘキサンヘキサンやプロパンの水酸化を実施した。

4. 研究成果

(1) 高分解能結晶構造解析

既報で最適化した pH 8.5 の水酸化触媒反応の条件でマンガンポルフィセンを有する再構成ミオグロビンの結晶を作成し、結晶構造解析を実施し、図 3 に示す構造を得た。1.5 Å の高分解能の構造が得られ、これまでに得られていた結晶構造ではディスオーダーしていた、遠位のヒスチジン (His64) が、100% の占有率で位置している構造を観測した。また天然のミオグロビンにおいてもヘムの軸配位子である His93 が、再構成ミオグロビンにおいてもマンガン中心に配位していることが明らかになった。本構造を元にする事で、より精度の高い MD 計算が可能になった。

(2) 活性種の評価

マンガンポルフィセンを有する再構成ミオグロビンと約 2 等量の mCPBA (メタクロロ過安息香酸) の反応をストップフロー法により追跡したところ、幾つかの等吸収点を通る過渡吸収スペクトル変化が観測された (図 4)。2 秒で反応は終了し、さらにダブルミキシング法を用いてこの化学種が基質として ABTS を混合すると休止状態に戻ることから、酸化活性種であることが示された。また基質非存在下では約 2.5-4.0 秒ほどの半減期を有していることが明らかになった。この半減期は pH に依存し、より高い pH で長い半減期を持ち、エチルベンゼンの水酸化触媒反応における触媒回転数の pH 依存性と非常に良い相関を示した。本系において、活性種の寿命が触媒回転数に大きく影響することが示唆された。

次に、活性種の価数を評価するために EPR 測定を実施した。マンガンポルフィセンを有する再構成ミオグロビンは、休止状態では parallel mode の EPR で核スピにより分裂した微細構造が観測され、Mn(III)であることを確認した。マンガンポルフィセンを有する再構成ミオグロビンと過酢酸を反応させ、急速凍結させたサンプルを perpendicular mode と parallel mode の EPR で測定したところ、どちらもシグナルは観測されなかった。この結果は、低スピンの Mn(V) の生成を示しており、本系における活性種が Mn(V) オキシ

種であることが示唆された。

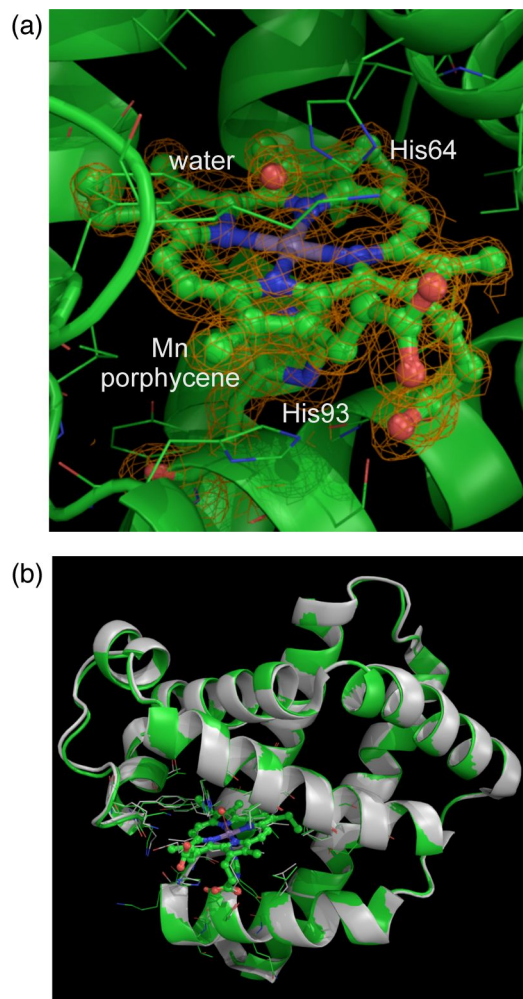


図 3. ポルフィセンマンガン錯体を有する再構成ミオグロビンの結晶構造 (a) 錯体周辺の構造。メッシュは電子密度を示している。(b) 天然ミオグロビンとの重ね合わせ構造。(緑: 再構成ミオグロビン、灰色: 天然ミオグロビン。RMSD = 0.306 Å)

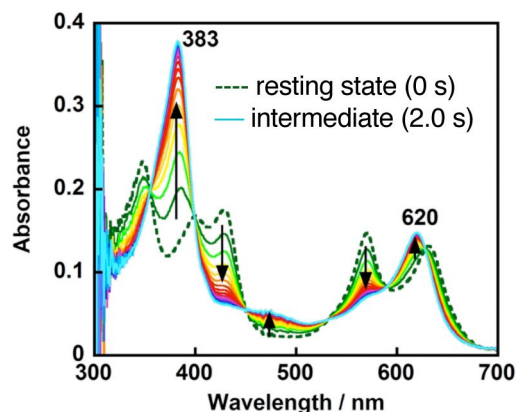


図 4. ポルフィセンマンガン錯体を有する再構成ミオグロビンと mCPBA の反応における過渡吸収変化

(3) タンパク質マトリクスへの変異導入による不斉触媒能の付与

マンガンポルフィセンを有する再構成ミ

オグロビンが触媒するエチルベンゼンの水酸化反応において、得られるアルコールはキラル中心を持ち(図 5a)、実際にキラルカラムを用いてガスクロマトグラフィによりエナンチオ選択性を評価すると、 $ee = 14\%$ (S)であった。この不斉選択性の向上をめざし、変異体の設計を実施した。変異体の設計には MD 計算を用い(図 5b)、活性種と基質の結合状態において、pro S と pro R の複合体(それぞれ S 体と R 体の生成物を与えるコンフォメーション)のポテンシャルエネルギー差をエナンチオ選択性の指標とし、ヘム結合部位の遠位側に変異を導入した変異体を複数設計した。遺伝子工学的手法を用いて設計した変異体を調製し、ヘムを除去し、マンガンポルフィセンを挿入した再構成ミオグロビン変異体を複数種類準備した。これらの再構成ミオグロビン変異体を用いて、過酸化水素を末端酸化剤とするエチルベンゼンの水酸化を実施し、生成物のエナンチオ選択性を評価した。His64 を Ala64 に置換した変異体では、選択性の反転が確認され $ee = 48\%$ (R)であった。さらに Phe46 を Leu46 に置換した二重変異体では、 $ee = 57\%$ (R)まで向上した。一方、His64 は天然のままで、Val68 を Phe68 に、Phe43 を Ala43 に置換した二重変異体では、 $ee = 50\%$ (S)であった。さらに His64 を Ile64 に置換した三重変異体では、 $ee = 69\%$ (S)まで向上した。得られたエナンチオ選択性と設計時に用いた MD 計算から得られた選択性の指標であるポテンシャルエネルギーには、ある程度の相関が観測され、本系において、MD 計算を用いた合理的なタンパク質マトリクス設計が可能であることが示唆された。また触媒回転数についても比較すると、His64 を Ala64 に置換した変異体では、天然のミオグロビンの再構成体と比べて、約 20 倍に向上することが明らかになった。これは基質のアクセスのしやすさに起因していると考えられている。

(4) 高い結合解離エネルギーを有するアルカンの水酸化

上記のように変異体において、エチルベンゼンの水酸化における触媒回転数の向上が観測されたため、再構成ミオグロビンの変異体を用いて、より難度の高いシクロヘキサンや n-ヘキサンの水酸化を実施した。条件の最適化の結果、 37°C において、シクロヘキサンで触媒回転数が 2、n-ヘキサンでは 9 となり、それぞれシクロヘキサノールと 2-ヘキサノールおよび 3-ヘキサノールを生成物として与え、触媒的に水酸化が進行していることが明らかになった。シクロヘキサンと n-ヘキサンの $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-H}$ の結合解離エネルギーはほとんど変わらないが n-ヘキサンの方が高い触媒回転数が確認された。これは、活性中心へのアクセスが効いていると考察しており、より柔軟な構造を有する n-ヘキサンにおいて高い触媒回転数が確認されたと考えられる。また生成物の中に過剰酸化されたケト

ンは観測されなかった。さらにユニークなことに 2-ヘキサノールを基質に用いて同反応を実施したところ、さらに酸化反応が進行したケトンは得られなかった。これは反応場の大きさや疎水性により高い選択性が達成されていることを示している。

次に、ガス状アルカンであるプロパンの水酸化についても実施した。n-ヘキサンの場合と同様に水酸化反応が進行し、触媒回転数が 5 で、2-プロパノールが得られた。ガス状分子においては加圧することでさらに基質の濃度を上昇させることができるので、さらなる触媒回転数の向上が期待できる。

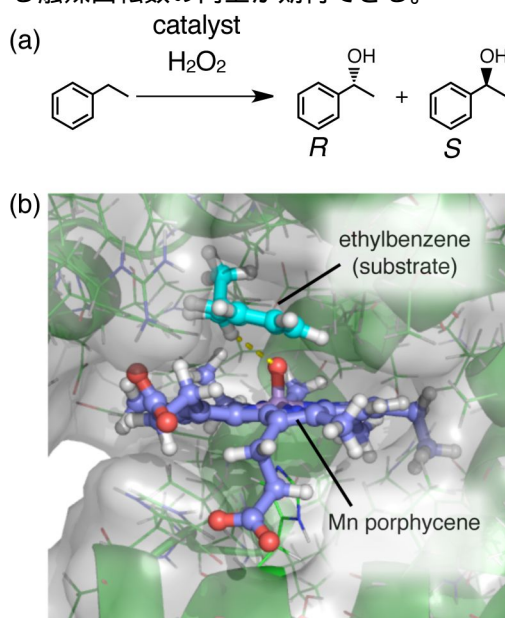


図 5. (a) 本研究におけるエチルベンゼンの水酸化の反応式。(b) 再構成ミオグロビン変異体 (His64 を Ala64 に置換) の基質複合体の MD 計算におけるスナップショット構造

上記のように、結晶構造解析により原子分解能の構造を明らかにし、活性種の同定を各種分光法を用いて実施した。さらに得られた構造や活性種の情報に基づき、タンパク質に変異を導入することでエナンチオ選択性の付与と難易度の高い基質の水酸化についても達成した。本研究で得られた知見は、今後、人工金属酵素を設計・開発に大きく貢献すると期待される。

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 4 件)

Takashi Hayashi, Yohei Sano, Akira Onoda, Generation of New Artificial Metalloproteins by Cofactor Modification of Native Hemoproteins, *Isr. J. Chem.*, 査読有, Vol. 55, pp 76-84 (2014).

DOI:10.1002/ijch.201400123

Yoshitsugu Morita, Koji Oohora, Akiyoshi Sawada, Kazuki Doitomi, Jun Ohbayashi, Takashi Kamachi, Kazunari Yoshizawa, Yoshio Hisaeda, Takashi Hayashi, Intraprotein Transmethylation via a $\text{CH}_3\text{-Co(III)}$ Species in Myoglobin Reconstituted with a Cobalt Corrinoid Complex, Dalton Trans., 査読有, Vol. 45, pp. 3277-3284 (2016)
DOI:10.1039/C5DT04109K

Koji Oohora, Takashi Hayashi, Reconstitution of Heme Enzymes with Artificial Metalloporphyrinoids, Methods Enzymol., 査読有, Vol. 580, pp. 439-454 (2016)

Yoshitsugu Morita, Koji Oohora, Eiichi Mizohata, Akiyoshi Sawada, Takashi Kamachi, Kazunari Yoshizawa, Tsuyoshi Inoue, Takashi Hayashi, Crystal Structures and Coordination Behavior of Aqua- and Cyano-Co(III) Tetrahydrocorrins in the Heme Pocket of Myoglobin, Inorg. Chem., 査読有, Vol. 55, pp.1287-1295 (2016)
DOI:10.1021/acs.inorgchem.5b02598

〔学会発表〕(計 5 件)

Takashi Hayashi, Yushi Kihira, Koji Oohora, Manganese Porphycene Act as an Artificial Cofactor which Catalyzed a $\text{C(sp}^3\text{)-H}$ Bond Hydrocylation in the Myoglobin Heme Pocket, 41th International Conference on Coordination Chemistry, 2014, 7.21-25, Singapore

Takashi Hayashi, Modification of Hemoprotein with an Artificially Created Cofactor to Generate a New Biocatalyt, 13th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, 2015. 6.12-15, Galway (Ireland)

Takashi Hayashi, Akira Onoda, Koji Oohora, Biohybrid Catalysts Constructed in a Protein Matrix with an Artificial Metal Complex, 250th American Chemical Society National Meeting & Exposition, 2015, 8.16-20, Boston (USA)

Takashi Hayashi, Heme Enzyme Models by Myoglobin with Artificial Metalloporphyrinoids, ACS Southern Regional Meeting 2016, 2016 10. 23-26, Columbia (USA),

Takashi Hayashi, Yoshitsugu Morita, Koji Oohora, Myoglobin Reconstituted with Cobalt Corrin Derivatives: A Functional

Model of Methionine Synthase, 42th International Conference on Coordination Chemistry, 2016 7.3-8, Brest (France)

〔その他〕
ホームページ等
大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻林研究室
<http://www.chem.eng.osaka-u.ac.jp/~haya-shiken/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)連携研究者

大洞 光司 (OOHORA, Koji)
大阪大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号 : 10631202