

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23655050

研究課題名（和文） 非天然二核金属中心を有する人工生体触媒の創製

 研究課題名（英文） Construction of Artificial Biocatalysts  
containing Non-natural Dimetallic Active Site

研究代表者

小野田 晃 (ONODA AKIRA)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：60366424

研究成果の概要（和文）：

金属酵素は高い触媒活性と選択性を達成する極めて魅力的な金属反応中心をもつ。例えば、メタンの水酸化や窒素固定をはじめとする合成化学的に難易度の高い反応を常温常圧の温和な条件下で触媒することが可能である。本研究では、タンパク質マトリクスを活用し、非天然二核金属中心を有する生体触媒の構築を行った。第一配位圏の合理的な二核金属配位環境の再構築と、第二配位圏の設計を組み合わせた生体触媒を作製し、その構造および機能解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

Metalloenzymes catalyze variety of reactions including hydroxylation of methane and nitrogen fixation, which are difficult for synthetic catalysts, in mild conditions. Thus, the active site of these metalloenzyme has been attracted the chemists. In this project, the artificial biocatalysts containing non-natural dimetallic active sites were constructed. The first coordination shell of the active site was reengineered and the second coordination shell was redesigned. The structure and function of the resultant artificial biocatalysts were studied.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・無機化学

キーワード：生物無機化学、タンパク質、人工金属タンパク質、二核中心

## 1. 研究開始当初の背景

金属タンパク質触媒は、水中の温和な条件下でも高活性な次世代型触媒の候補であり、生物無機化学、触媒化学、タンパク質科学の研究者が勢力的に参入してきている。これまでの研究は、天然酵素の単核金属中心を機能改変する、あるいは、単核金属錯体をタンパク質内に包接した系がほとんどである。一方、生体ではメタンの酸化を行うメタンモノオキシゲナーゼや水素分子の酸化還元するヒドロゲナーゼのように、タンパク質二核金属中

心が、物質循環の鍵となる反応を触媒している。その重要性にも拘わらず、二核中心を含めた多核コアの人工生体触媒の人工機能化の研究は黎明期である。

## 2. 研究の目的

本研究では、タンパク質マトリクスを活用し、非天然二核金属中心を有する生体触媒の構築を目的とする。第一配位圏の合理的な二核金属配位環境の再構築と、第二配位圏の設計を組み合わせた生体触媒を作製し、その構

造および機能解析を行う。

### 3. 研究の方法

新規生体触媒における二核金属中心の構築は、二核金属錯体の配位結合による導入と、第一配位圏のアミノ酸の変異導入による手法によって行った。調製した生体触媒は、可視紫外吸収、エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS)、誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS)、X線結晶構造解析により同定を行った。各種反応の追跡と評価は、可視紫外吸収とガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) により行った。

### 4. 研究成果

(1)ヘムエリスリン様の鉄二核タンパク質をマトリクスとして活用した生体触媒の作製

酸素分子の利用に関連する二核鉄を有するタンパク質には、酸素運搬体のヘムエリスリン (Hr)、メタンをメタノールへと水酸化するメタンモノオキシゲナーゼ (MMO)、DNA合成に関わるリボヌクレオチドリダクターゼ (RNR)、脂肪酸の不飽和化を行うデサチュラーゼなどがある。これらの二核鉄タンパク質には共通して、4-ヘリックス・バンドル中にカルボキシラート架橋された二核鉄中心を有するという構造類似性がある。一方で、Hrの可逆的な酸素結合能とMMOやRNR、 $\Delta$ デサチュラーゼの酸素活性化能という反応性の違いは、二核鉄の配位アミノ酸の違いに起因すると考えられている。MMOは構造的な複雑性から取り扱いが困難であるが、そのメタンの不活性なC-H結合を水酸化する機能は非常に魅力的である。そこで、取り扱いが容易であり、MMOとの構造類似性を有するヘムエリスリン類縁タンパク質DcrH-Hrの機能変換をめざした。

DcrH-Hrとは嫌気性硫酸還元菌の走化性タンパク質DcrHのC末端に存在するHr様ドメインである。DcrH-HrはHrと同様の二核鉄の配位環境を有しており、また、Hrにはない基質の取り込みに有利な空孔を二核鉄中心近傍にもつため、機能変換に適したタンパク質として選択した(図1)。二核鉄中心に近接する非配位性アミノ酸残基のIle119に着目し、配位結合や水素結合の効果が期待されるGluとHisにそれぞれ置換したI119E変異体とI119H変異体を作製し、外部配位子との結合挙動や過酸化水素を酸化剤として用いた酸化反応の検討を行った。

#### ①

鉄二核中心の近傍にグルタミン酸を導入したI119E変異体の構造をX線結晶構造解析

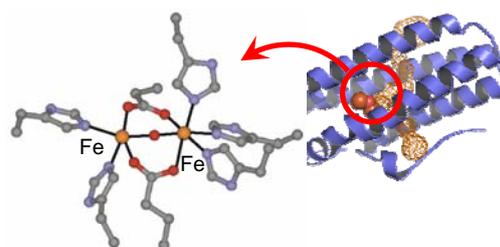


図1 DcrH-Hr タンパク質の活性部位の構造

により決定した。その結果、野生型の二核鉄に配位するH28、H59、E63、H78、H82、H118、D123の構造には変化がないこと、また、E119のカルボキシラートが二核鉄のFe2に新たに単座で直接配位していることが明らかとなった(図2)。可視紫外部に特徴的な吸収をもつこと、また共鳴ラマン分光測定においてFe-O-Fe由来のピークが $505\text{ cm}^{-1}$ に観測されたことも、鉄二核構造を保持していることを支持する。構造解析の結果から、空孔をふさぐように、カルボキシラートが配位することも分かった。

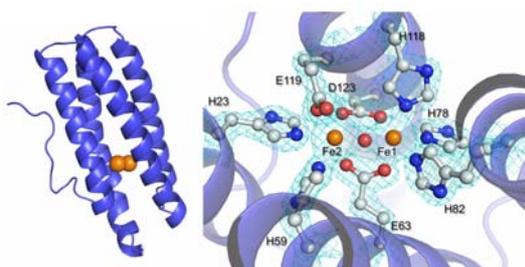


図2 I119E変異体のX線構造解析の結果

次に、I119E変異体の外部配位子との結合をアジドにより評価を行った。アジドを加えてpH 7.0で可視紫外部の吸収変化を調べたところ、野生型DcrH-Hrのアジド付加体に特徴的な443 nmの吸収が、I119E変異体では非常に小さい。この結果は、E119が二核鉄に配位し、アジドの配位を阻害したためと考えられる。バッファのpHを6.0と酸性側にした場合は、アジド付加体の効率的に形成したことから、E119の二核鉄への配位能がカルボキシラートのプロトン化の程度に依存する可能性を示唆している。

E119の二核鉄への配位が、I119E変異体の酸化型( $\text{Fe}^{\text{III}}, \text{Fe}^{\text{III}}$ )から( $\text{Fe}^{\text{II}}, \text{Fe}^{\text{III}}$ )への還元反応に与える影響を評価するために、4-アミノフェノールを用いて一電子還元反応を行った。この結果、野生型では1分以内に還元反応がほぼ完了するのに対して、I119E変異体では1時間以上経過しても還元反応は十分に進行しない。同様の差は、より強い還元時であるジチオナイトでも観測された。したがって、I119E変異体ではE119の二核鉄への配位により還元が速度論的に影響を受けていることを示唆している。また、それぞれの酸化体、還元体の活性部位周辺のアミノ酸を含む

構造のギブズ自由エネルギーを DFT 計算により算出したところ、電位が負側にシフトする可能性も示された。

カルボキシラート配位子を導入した鉄二核中心の酸素との反応性を調べるために、還元剤によりデオキシ体 ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ ,  $\text{Fe}^{\text{III}}$ ) を調製し、酸素分子との反応性を評価した。カルボキシラートの配位によって、酸素結合速度が野生型に比べ大きく低下しており、酸化体へと戻る自動酸化速度よりも遅くなることが明らかとなった。

## ②

鉄二核中心の近傍にヒスチジンを導入した I119H 変異体を作製し、構造同定と反応性を評価した。紫外可視吸収及び共鳴ラマン測定の結果から、I119H は野生型と同様の鉄二核中心を保持していることが分かった。また、外部配位子としてアジドを添加した際、紫外可視部に野生型とほぼ同様の 425 nm の吸収をもつことから、I119E 変異体とは異なり安定なアジド付加体を与えることが示唆された。さらに、共鳴ラマン分光において、I119H のアジド付加体は、 $\text{Fe}-\text{N}_3$  の伸縮振動が野生型と比べて  $11 \text{ cm}^{-1}$  低波数シフトし、 $\text{Fe}-\text{N}_3$  の結合が弱くなっている。赤外分光測定からは、アジドの伸縮振動は  $10 \text{ cm}^{-1}$  高波数シフトしており、これらの結果から、H119 のイミダゾールが二核鉄に配位したアジドに水素結合により相互作用している可能性が推測された。

以上の結果を踏まえて、H119 が外部配位子に対して一般酸塩基触媒として作用すれば、ヒドロペルオキシドを添加した場合には高酸化鉄オキソ種が形成される可能性がある。そこで、まず過酸化水素を添加した際の反応を追跡したところ、野生型では過酸化水素が速やかに消費されて酸素が発生するのに対して、I119H では消費速度が大幅に低下していることが分かった。過酸化水素の存在下で、グアイアコールを添加すると、I119H の場合のみ、グアイアコールの酸化体の生成が確認された。さらに、いくつかの基質を検討したところ、過酸化水素を酸化剤として用いて、シクロヘキサジエンのベンゼンへの酸化反応が進行することを見出した。ガスクロマトグラフィーから求めると TON は 0.5 と活性は低いものの、野生型には全くみられない酸化反応活性を鉄二核の活性部位に付与した初めての例である。

## (2) ヒドロゲナーゼ活性を有する鉄二核中心を持つ生体触媒の作製

ヒドロゲナーゼは、プロトンと水素分子間

の可逆的変換反応を触媒する酵素である。このファミリーの一つである鉄ヒドロゲナーゼ ([FeFe]-H<sub>2</sub>ase) は、[4Fe4S] 鉄硫黄クラスターと鉄二核コアからなる H-クラスターと呼ばれる活性中心を保持している。鉄二核コアは、架橋のアザジチオラート、さらにカルボニルおよびシアン化物イオンが配位した有機金属型の非常に特殊な構造をもつ (図 3)。この二核コアは、隣接した [4Fe4S] クラスターとシステイン残基由来のチオラートを介して架橋した構造を持っており、[4Fe4S] クラスターから反応活性点である二核コアへ電子移動を円滑に行うと推定されている。[FeFe]-H<sub>2</sub>ase の活性中心である H-クラスターがもつ触媒機能に着想を得た金属触媒の開発が近年数多く研究されているが、 $(\mu\text{-S}_2)[\text{Fe}^{\text{I}}(\text{CO})_3]_2$  型の鉄二核カルボニル錯体を基盤としたモデル金属錯体の合成と反応性は、大半が有機溶媒中の研究である。完全水中における触媒的な水素活性化反応を直接達成した例はまだ少ない。本研究では、鉄ヒドロゲナーゼ活性中心に類似の構造及び反応性を有する二核鉄ヘキサカルボニル錯体をタンパク質内部に固定化した新しいタイプの鉄二核金属タンパク質を構築し、水中で水素発生能を示す生体触媒として機能することを見出した。

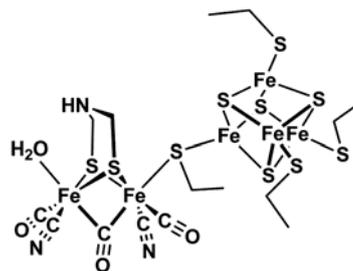


図 3 FeFe-ヒドロゲナーゼの活性部位

タンパク質マトリクスには電子伝達が本来の機能であるシトクロム *c* (cyt *c*) を選択した (図 4)。cyt *c* の活性中心のヘムは、2本のアルキル基側鎖が近傍の Cys-X-Y-Cys 配列に含まれる二つのシステイン残基とチオエーテル結合によってタンパク質マトリクスに固定化されている。共有結合でつながった活性中心のヘムを常法によって除去して調製したアポ体 (apocyt *c*) においては、二つのシステイン残基がチオラート配位子として利用可能となる。そこで、このチオラート配位子を足がかりとして、二核鉄カルボニル錯体  $\text{Fe}_2(\text{CO})_9$  を導入し、新たに人工還元金属酵素 (H-apocyt *c*) の調製を行った。この H-apocyt *c* のヒドロゲナーゼ活性を、光増感剤を使った水素発生反応によって評価した。

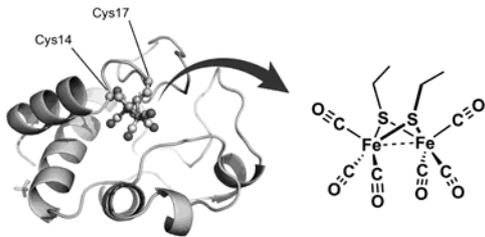


図4 人工 FeFe-ヒドロゲナーゼの活性部

( $\mu$ -S<sub>2</sub>)[Fe<sup>I</sup>(CO)<sub>3</sub>]<sub>2</sub> コアを有するシトクロム *c* は以下の手順で調製した。馬心筋由来 *cyt c* のアポ体 *apocyt c* と二核鉄ノナカルボニル錯体 Fe<sub>2</sub>(CO)<sub>9</sub> を混合した後に、4 °C で 12 時間キセノン光を照射した。反応後にサイズ排除カラムにより過剰の Fe<sub>2</sub>(CO)<sub>9</sub> を分離し、目的の鉄二核錯体が固定化した H-*apocyt c* を精製した。得られた H-*apocyt c* は、ESI-TOF MS、可視紫外吸収、赤外吸収により、二核中心に架橋ジチオラートと 6 つのカルボニル配位子がターミナルに配位した構造であることを決定した。

調製した H-*apocyt c* の水中における触媒活性の評価は以下の条件で行った。光増感剤にトリス(2,2'-ビピリジン)ルテニウム錯体 ([Ru(bpy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>)、犠牲還元剤にアスコルビン酸ナトリウムを用いた。[Ru(bpy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> は光励起後に犠牲還元剤と反応し、高い還元能を有する [Ru(bpy)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> となり、( $\mu$ -S<sub>2</sub>)[Fe<sup>I</sup>(CO)<sub>3</sub>]<sub>2</sub> コアへ電子注入し、プロトンから水素分子への変換反応が進行する。そこで、トリス塩酸緩衝液中 (pH 4.7) で N<sub>2</sub> 雰囲気下、25 °C でキセノン光 (410~770 nm) を照射し、反応後のサンプルの気相部分の水素ガス発生量をガスクロマトグラフィーにより定量分析した。H-*apocyt c* を使った光駆動水素発生反応の経時変化を追跡した結果を図 5 に示す。比較のために、Cys-XY-Cys の二つのシステイン残基を含むヘプタペプチド YKCAQCH を配位子とする二核鉄ヘキサカルボニル錯体 *apomincyt c* を別途調製した。また、錯体を含まない *apocyt c* についても同様に評価を行った。*apocyt c* のみの場合には水素発生は全く観測されないが、*apomincyt c* においては水素発生が検出され、その触媒回転数 (TON) は 3 時間で 12 であった。これに比べると、H-*apocyt c* の TON は 82 と大きく向上しており、非常に高い触媒活性を示すことが明らかとなった。H-*apocyt c* が高い触媒活性を示した要因の一つは、他のモデル金属触媒研究からアザジチオラート配位子のプロトン化した内部窒素が活性向上に重要であることが推測されていることも考慮すると、二核コア近傍に存在する His 残基の効果と考えられる。

H-クラスターモデル錯体である二核鉄カ

ルボニル錯体をシトクロム *c* のアポ体の Cys-X-Y-Cys のフラグメントに固定化した人工還元金属酵素の H-*apocyt c* 構築に成功した。この人工生体触媒 H-*apocyt c* は水中で安定に存在し、活性部位である二核鉄カルボニル中心は、光増感剤を用いた光駆動水素発生反応において高い触媒活性を有することを見出した。

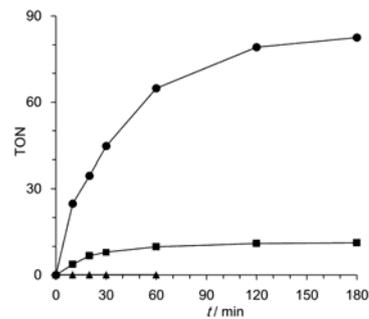


図5 人工 FeFe-ヒドロゲナーゼの光増感水素発生における触媒活性

②

[FeFe]-H<sub>2</sub>ase の活性中心で実現されているような、反応中心である鉄二核コアへの効率的な電子移動を達成する分子設計がより高活性な触媒開発には重要となる。これまでに触媒活性点である鉄二核コアに近接して、Rh 錯体あるいは Zn ポルフィリン等の光増感部位を連結し、光誘起の分子内電子移動を指向した機能モデルの構築が検討されてきたが、触媒的な水素活性化反応に成功した例はなかった。

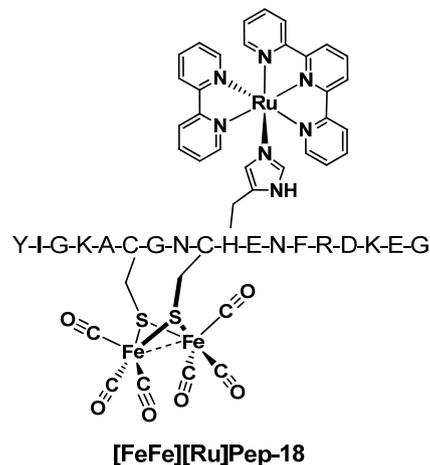


図6 光増感部位 Ru 錯体を近接させた FeFe-ヒドロゲナーゼの活性部位

本研究では、光増感部位と触媒活性点の鉄二核中心をペプチド鎖テンプレート上において近接させ、水中で分子内光誘起電子移動を達成する新規の水素発生触媒の構築を行った。具体的には、タイプ *c* ヘムタンパク質がもつ特徴的なアミノ酸配列

Cys-XY-Cys-His に着目して、二つのシステイン残基を二核鉄ヘキサカルボニル錯体の結合部位として利用し、さらにそれに隣接したヒスチジン残基を介して Ru 錯体をオリゴペプチド鎖と連結することにより二つの金属中心間が極めて近接した水素発生触媒の構築をおこなった (図 6)。この系の水素発生触媒活性を評価し、ペプチド配位子内における分子内光誘起電子移動の効果を検証した。

ペプチド配位子として、シトクロム *c* 群の一つであるシトクロム *c*<sub>556</sub> がもつコンセンサスなアミノ酸配列 Cys-XY-Cys-His を含む 18 残基オリゴペプチド Pep-18 (YIGKACGNCHENFRDKEG) を Fmoc 固相法により合成した。比較として Ru 錯体を配位により連結する His10 を Ala に置換したオリゴペプチド Pep-18(H10A) (YIGKACGNCAENFRDKEG) を合成した。N<sub>2</sub> 雰囲気下、Pep-18 と原料錯体の Fe<sub>2</sub>(CO)<sub>9</sub> を pH 8 のトリス塩酸緩衝液中で混合し、キセノン光照射下、4 °C で 12 時間反応させた。次に、反応後のペプチド錯体からサイズ排除カラムを使い過剰の Fe<sub>2</sub>(CO)<sub>9</sub> を除去し、二つのシステイン・チオラートが二核鉄ヘキサカルボニル錯体に架橋配位したペプチド錯体 [FeFe]Pep-18 を精製した。続いて、[FeFe]Pep-18 と (2,2'-ビピリジン)(2,2':6',2''-ターピリジン)アクアルテニウム錯体 ([Ru(bpy)(tpy)(H<sub>2</sub>O)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>) を pH 8.5 のトリス塩酸緩衝液中で 25 °C で 72 時間反応した後に、Sephadex-G10 カラムにより余剰の Ru 錯体を除去し、光増感部位と触媒活性部位を近接導入した目的のペプチド錯体 [FeFe][Ru]Pep-18 を精製した (図 6)。得られたペプチド錯体 [FeFe][Ru]Pep-18 は、ESI-TOF MS、可視紫外吸収、赤外吸収により、二核中心に架橋ジチオラートと 6 つのカルボニル配位子がターミナルに配位した構造に加えて、Ru 錯体が結合していることを確認した。

分子内光誘起電子移動による水素発生が期待される [FeFe][Ru]Pep-18 の水中における触媒活性の評価を行った。犠牲還元剤として大過剰のアスコルビン酸イオンを使用し、トリス塩酸緩衝液中 (pH 8.5) で光駆動水素発生反応を行ったところ、[FeFe][Ru]Pep-18 は 3 時間後の TON は 9 であった。この値は、既報の分子内光誘起電子移動型の水素発生反応と比べ、十分に高い触媒活性であった。一方で、分子間で光誘起電子移動を伴う比較実験として、別途調製した Ru 錯体がないペプチド錯体 [FeFe]Pep-18(H10A) にイミダゾール配位の Ru 錯体 [Ru(bpy)(tpy)(im)]<sup>2+</sup> を加え、同様の条件で光駆動水素発生反応を行った場合には水素発生反応は全く観測されなかった。この結果より、[FeFe][Ru]Pep-18 は、光増感部位と触媒活性部位間の近接効果によって効率的な分子内光誘起電子移動を達

成した初めての触媒と位置づけられる。より酸性側では TON の向上が期待されるが、この場合は [FeFe][Ru]Pep-18 が His のプロトン化により Ru 錯体との配位が維持できないと予測される。しかし、pH 8.5 の条件においても、TON 9 を達成している点は分子内の効率的な電子移動に起因すると考えられる。

分子内光誘起電子移動型の水素発生触媒として、シトクロム *c* 群に特徴的なアミノ酸配列 Cys-XY-Cys-His を活用し、触媒活性部位である二核鉄カルボニル中心および光増感部位である Ru 錯体を導入したペプチド錯体 [FeFe][Ru]Pep-18 を構築した。この異種金属中心を近接してペプチド鎖上に固定化した水素発生触媒システムは、光駆動水素発生反応の触媒活性を有していることを明らかにした。この系は、ヒドロゲナーゼモデル鉄二核コアへの分子内電子移動を伴った完全水中における水素発生を達成した初めての例である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

① “Photocatalytic Hydrogen Evolution by a Diiron Hydrogenase Model Based on a Peptide Fragment of Cytochrome *c*<sub>556</sub> with an Attached Diiron Carbonyl Cluster and an Attached Ruthenium Photosensitizer”

Y. Sano, A. Onoda, T. Hayashi

*J. Inorg. Biochem.*, 105, 159–162 (2012).

② “Crystal Structure and Spectroscopic Studies of a Stable Mixed-Valent State of the Hemerythrin-like Domain of a Bacterial Chemotaxis Protein” A. Onoda, Y. Okamoto, H. Sugimoto, Y. Shiro, T. Hayashi, *Inorg. Chem.*, 50, 4892–4899 (2011).

③ “A Hydrogenase Model System Based on the Sequence of Cytochrome *c*: Photochemical Hydrogen Evolution in Aqueous Media”, Y. Sano, A. Onoda, T. Hayashi, *Chem. Commun.*, 48, 8229–8231 (2011). **Inside Front Cover.**

④ “Preparation and Reactivity of a Tetranuclear Fe(II) Core in the Metallothionein  $\alpha$ -Domain” Y. Sano, A. Onoda, R. Sakurai, H. Kitagishi, T. Hayashi

*J. Inorg. Biochem.*, 105, 702–708 (2011).

[学会発表] (計 4 件)

① 佐野洋平、小野田晃、林高史「機能改変を指向した酸素運搬鉄二核タンパク質の配位アミノ酸変異体の調製および反応性の検討」第 61 回錯体化学討論会、2011 年 9 月 11 日、岡山

②岡本泰典、小野田晃、林高史「機能改変を指向した酸素運搬鉄二核タンパク質の配位アミノ酸変異体の調製および反応性の検討」第44回酸化反応討論会、2011年11月5日、吹田

③岡本泰典、小野田晃、林高史「ヘムエリスリン類縁タンパク質の機能解析とその活性部位近傍に変異を導入したグルタミン酸の影響」第22回金属の関与数r生体関連反応シンポジウム、2012年5月31日、金沢

④木原佳彦、小野田晃、林高史「水溶性[FeFe]ヒドロゲナーゼ活性中心モデルへのアプローチ：鉄二核カルボニル錯体とβバレルタンパク質キャビティ内に変異導入したシステムとの錯形成反応」日本化学会第93春季年会、2013年3月22日、草津

[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

小野田 晃 (ONODA AKIRA)

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：60366424

### (3) 連携研究者

林 高史 (TAHASHI TAKASHI)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：20222226