

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22105013

研究課題名(和文)タンパク質マトリクスを用いた新触媒の開拓

研究課題名(英文)Construction of a New Catalyst Using a Protein Matrix

研究代表者

林 高史(Hayashi, Takashi)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20222226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 97,100,000円

研究成果の概要(和文)：生体内での生合成や代謝反応は、いわゆる直截的な有機合成反応の基本例である。その効率的な反応には生体触媒である酵素の関与が必須である。化学の立場で直截的反応を設計する際に、酵素を目的に応じて改変して利用することは、有効なアプローチの一つと言える。我々は、タンパク質の空孔に非天然の金属錯体を挿入することにより、天然の酵素では実現が難しい反応(C-H結合の活性化、C-C結合形成、水素発生等)の実施や反応の立体選択性の向上などに結びつくことを本課題研究で明らかにした。さらに、タンパク質空孔の反応場を遺伝子操作によってチューニングすることにより、反応の活性や選択性の更なる制御も可能となることを示した。

研究成果の概要(英文)：Biosynthesis and metabolic degradation are one of the fundamental examples which are related to the straight toward organic synthesis. The efficient reactions require enzymes as a biocatalyst. Therefore, it will be an appropriate approach for chemists to modify a protein to yield a useful catalyst. Our group has focused on the construction of a biohybrid catalyst in which an artificially created metal complex is linked into an aprotein after the removal of a cofactor heme of a hemoprotein. As a result, we have demonstrated that several biohybrid catalysts can promote reactions such as C-H bond activation, C-C bond formation or hydrogen evolution which seems to be difficult for natural enzymes. Furthermore, we indicate that the fine-tuning of the reaction scaffold of our biohybrid catalyst by mutagenetic approach is capable of controlling the reaction activity and stereoselectivity.

研究分野：生物無機化学

キーワード：タンパク質 反応場 物質変換 生体触媒 金属酵素

1. 研究開始当初の背景

既存の有機合成では難易度が高いとされる数々の反応を非常に穏和な条件下で進行させる酵素については、今日の物質変換化学においても、学ぶべき点が数多くある。特にそのなかでも、金属の関与した酵素(金属酵素)は、本来不活性な分子を水中で巧みに活性化し、様々な生体内分子変換に寄与している。これまで、生体反応をつかさどる金属酵素に対する研究は、主に生物無機化学の立場からその構造及び中間体の同定、反応機構の解明に全力が注がれ、既知の金属酵素のかなりの部分が明らかとなってきた。したがって、次の段階として、今までに得られた知見を駆使しながら、化学の立場から金属酵素を眺め、金属酵素のもつユニークな反応場や活性種を利用したり、我々の手で新しい酵素を創製し、有機合成の直截的反応に導くべき応用を図る時代が到来したと言える。

しかしながら、非常に魅力的な金属酵素の応用的研究は、まだきわめて少ない。そこで我々のグループでは、本課題研究を通じて生物無機化学の分野に新しい方向性を呈示するとともに、触媒化学や有機合成と新たな接点を共有できるものと考えている。特に代表的な金属酵素の一つであるヘムタンパク質の機能改変に対しては、我々のグループは、世界をリードしているが、それ以外の金属タンパク質についても、自在に機能性触媒に変換する例は少ない。したがって、有機化学、錯体化学に立脚した本課題研究はきわめて独創的なタンパク質工学的アプローチであり、本研究を契機としてユニークな活性種創製や反応開拓への新しい提案ができるものと考えた。

2. 研究の目的

我々のグループでは、上記の課題を意識し、いち早く金属酵素の機能改変・向上を図るべく、ヘムタンパク質の化学的修飾を実施してきた。このヘムタンパク質は、タンパク質マトリクス内に、補欠分子であるヘム(鉄ポルフィリン)を有し、ヘムとタンパク質の共同作業により、興味深い活性種を発生させ、従来困難な反応を触媒していることが知られている。我々は、活性中心のヘムを非天然の合成補欠分子に置換することにより、ヘムタンパク質の反応性を制御し、より活性の高い生体触媒の開発に挑戦している。その結果、天然のヘム酵素(ペルオキシダーゼ)の酸化活性を凌駕するタンパク質や、本来触媒能を持たないヘムタンパク質(酸素貯蔵ミオグロビン)を、酸化酵素へ変換することを国内外にさきがけで実施した。

次の段階として、単なる酸化反応だけではなく、もっと反応に多様性を持たせることと、金属や配位子を変換して、ユニークな活性種をタンパク質マトリクス内で発生させることが必要と考えた。また、ヘムタンパク質だけでなく、様々なタンパク質マトリクスと

金属イオンの相互作用を介した人工生体触媒の創製を試み、新しい活性種の探索とともに、直截的有機合成に寄与すべく新反応の開発や、穏和な条件では困難とされていた反応に対する触媒を設計し、環境負荷軽減型の有機合成に寄与することが、本課題研究の目的である。

3. 研究の方法

本課題研究の基本概要は、ユニークな空孔を有するタンパク質に金属錯体を挿入したハイブリッドを合成し、その触媒活性や反応の立体選択性を評価することにある。その中でも特にどのような空孔を有するタンパク質を選択するか、あるいはさらに一步踏み込んで、選択したタンパク質の空孔を遺伝子組み換え技術を駆使して、さらに反応に有利な空孔に改変することも視野に入れた。また、金属錯体に関しては、錯体の種類とタンパク質空孔に固定化するための形状(金属配位子の分子構造や、空孔と接続するリンカーの鎖長など)を吟味し、より適切な金属錯体の設計と合成を行った。その上で、両者を複合化(ハイブリッドタンパク質を調製)し、難易度の高い物質変換反応の生体触媒としての検証を実施した(図1)。

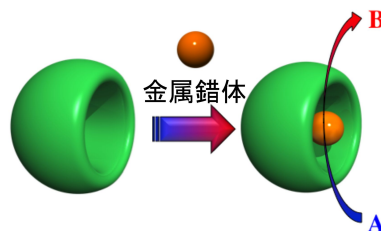


図1 ハイブリッドバイオ触媒の概念図

4. 研究成果

(1) ミオグロビンのペルオキシダーゼへの変換

酸素貯蔵タンパク質であるミオグロビンは、酵素活性はほとんど示さない。一方、ヘムを補欠分子として有する西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)は、高いペルオキシダーゼ活性を示すが、両者は同じヘムを有し、配位環境も類似している。ミオグロビンの低ペルオキシダーゼ活性の理由の一つは、酵素に備わる基質結合部位を持ち合わせないことにある。そこで、我々のグループではヘム末端を修飾した再構成ミオグロビンを調製し、疎水性基質のヘムポケット近傍への誘導を介した活性の向上を試みた。具体的には、過酸化水素を酸化剤として、グアイアコール(2-methoxyphenol)を基質とした一電子酸化反応によるグアイアコール2量体生成物の追跡を行った。その結果、プロピオン酸側鎖の片方の末端にだけ、集中してベンゼン環ユニットを導入した新しい修飾ヘム2(図2)とミオグロビンのヘムポケッ

トへのアミノ酸の変異を施した H64D 変異体 (ミオグロビンのアミノ酸の 64 番目のヒスチジンをアスパラギン酸に変換) において、触媒効率の指標となる k_{cat}/K_m 値、 k_{cat} 値が明らかに向上し、 k_{cat}/K_m 値は、HRP の値を超えていた。本来、ミオグロビンのペルオキシダーゼ活性は極めて乏しいが、ヘムプロピオン酸側鎖の修飾とヘムポケットの特定のアミノ酸を適切なものに変異させることにより、数千倍の酵素活性を獲得し、天然の酵素と遜色ないタンパク質に改変可能であることを示した。

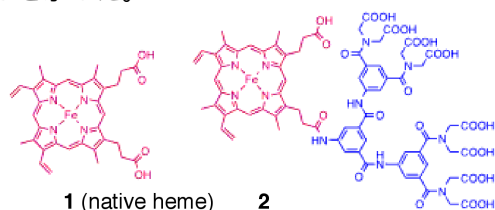


図2 修飾ヘム2の分子構造

(2) 不活性 C-H 結合の活性化を介したアルカンの水酸化反応

酸素貯蔵タンパク質であるミオグロビンは、水酸化酵素として働くチトクロム P450 と分子構造がまったく同じであるヘム *b* (プロトヘム IX) を補欠分子として有している。しかしながら、ミオグロビンの水酸化反応活性はほとんど無いことが知られていた。しかし今回、ヘムの代わりにマンガンポルフィセン錯体をヘムポケットに挿入し、さらに過酸化水素を用いて酸化反応を実施することにより、エチルベンゼンから 1-フェニルエタノールがスムーズに得られた (図3)。この得られた再構成ミオグロビンを用いて、エチルベンゼンの水酸化を実施した。pH 8.5、25 °C の条件下で 20 μ M の触媒を添加したところ、1 時間経過した段階でターンオーバー (TOF) 値は約 13 であった。同様の条件下、補欠分子としてマンガンポルフィセン錯体の代わりにマンガンポルフィリン、あるいは鉄ポルフィセン錯体を有するミオグロビンでは、まったく活性を示さなかった。次に、他の基質としてトルエンやシクロヘキサンでも同様な反応が進行し、それらの反応速度は、C-H 結合解離エネルギーと一次の相関があることが明らかとなった。また、重水素化した基質を反応に用いることによって、反応速度に明らかな同位体効果が見られ、反応の律速段階は本来不活性な C(sp³)-H 結合の切断であることが判明した。

さらに、エチルベンゼンを基質とした生成物 1-フェニルエタノールの光学純度について評価した。天然のタンパク質を反応場とした場合、生成物のアルコールは、15% ee (*S*) であった。しかしながら、ヘムポケット内の His64 を Asp あるいは Ala に置換したところ、43% ee (*R*) および 48% ee (*R*) と比較的高い値が得られた。この結果は、基質がある程度ヘムポケット内に一定の方向から接近し、

反応が進行していることを示唆している。以上、今回ミオグロビンのヘムポケットに天然のヘムの代わりにポルフィセンマンガン錯体を挿入することにより、初めて水酸化反応の触媒として機能することが明らかとなった。

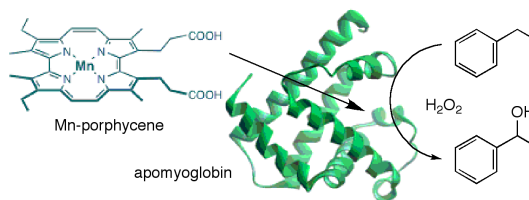


図3 マンガンポルフィセンを有するミオグロビンを触媒として用いた基質の水酸化反応

(3) 水素発生をつかさどるヒドロゲナーゼモデル

ヒドロゲナーゼは、主に嫌気性生物の中で、分子状水素の可逆的な酸化還元反応を触媒する酵素である。様々なタイプのヒドロゲナーゼが存在するが、その多くは非常に複雑で、かつ不安定なものが多い。一方、触媒する反応および活性中心の錯体はきわめて興味深く、これまで数多くのヒドロゲナーゼ構造・機能モデルが提案されている。その中でも、鉄二核中心を有する [FeFe] ヒドロゲナーゼについては、様々な鉄カルボニル錯体がモデルとして提案されている。しかしながら、そのほとんどは、実際に水素発生活性がごくわずかであったり、水に不安定で可溶性有機溶媒中でのみの議論にすぎなかった。そこで、我々のグループでは、近年、水 (プロトン) から水素を水中で発生させる新しい生体触媒の開発に着手した。

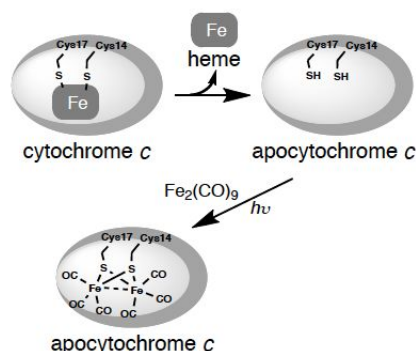


図4 アポチトクロム *c* への鉄二核錯体の挿入によるヒドロゲナーゼモデルの構築

具体的には、チトクロム *c* のヘムポケット内部に位置する 2 つのシステイン Cys14、Cys17 に着目し、ヘムを常法で除去した後に、嫌気下で Fe₂(CO)₉ を添加し、図4に示すような二核鉄カルボニル錯体 (μ -S-Cys)₂Fe₂(CO)₆ 錯体を得た。本再構成タンパク質とその内部に位置する錯体は UV-vis、MS、IR で同定し、既存の類似錯

体データと一致していることが明らかとなった。次に、得られた再構成タンパク質について、水素発生のモニターを実施した。その際の電子源としては、光増感剤として Ru 錯体を共存させ、アスコルビン酸を犠牲試薬として添加する系を利用した。可視光を照射しながら、Ru 錯体からタンパク質中の鉄カルボニル錯体への光駆動型電子移動反応を促し、pH や触媒の量比を変化させながら、ガスクロマトグラフィーで水素発生の定量を行った。その結果、再構成タンパク質を用いた場合は、触媒回転数(TON)は、約 90 となり、比較的スムーズな水素発生が occurring していることが明らかとなった。至適 pH は、4.7 であることも合わせて明らかとなった。次に、タンパク質の効果を評価するために、チトクロム *c* 配列の中で 2 つのシステインを含む 11 残基のオリゴペプチドを別途作成し、そのペプチドを含む鉄カルボニル錯体を参照化合物として合成した。この触媒活性を求めたところ、再構成タンパク質に比べ圧倒的な活性の低下が認められた。この結果は、チトクロム *c* のヘムポケットが何らかの形で鉄カルボニル錯体による水から水素の触媒的発生を支援していることを示している。以上、今回本来電子伝達タンパク質であるチトクロム *c* からヘムを除去したアポタンパク質に鉄二核カルボニル錯体を導入した複合体を用いて、水中で水素発生を触媒する新しい生体触媒を提案した。

(4) 高分子合成を支援する生体触媒の構築

生体内では酸化還元や加水分解、あるいは転位反応等をつかさどる様々な金属酵素が知られている。しかしながら、有機金属化学で頻繁に見られるような炭素-炭素結合形成や炭素-水素結合活性化反応は殆ど見られない。したがって、我々のグループでは、天然に存在する酵素では通常みられない反応を触媒する新型の人工生体分子触媒を設計し、水中・温和な条件下で新しい触媒反応を立体選択的に進行させることを試みている。本課題研究は、フェニルアセチレンの重合反応をとりあげた。具体的には、 β バレル構造を有するニトロバインディン(NB)の適切なサイズの空孔内に合成したロジウム錯体 **Rh** を共有結合で固定化して、フェニルアセチレンの触媒的重合を実施した。図 5 に示すように、ロジウム錯体 **Rh** は Cp を配位子とし、末端にはシステイン残基のチオールと選択的に共有結合を有するマレイミド部位を導入したものを合成した。一方、タンパク質については、本来はヘムタンパク質として NO を結合するニトロバインディンに着目し、 β バレル構造の内部のアミノ酸の 1 つ (96 番目のグルタミン) を遺伝子工学的な手法でシステインに変異させたもの(Q96C)を発現、調製した。両者を混合することにより、ロジウム錯体をタンパク質マトリクス内に有する新規の有機金属タンパク質を調

製し、質量分析等で同定を行った。また、CD スペクトルより、ニトロバインディンの特徴的な β バレル構造は、**Rh** を導入しても、まったく崩れていないことを示した。

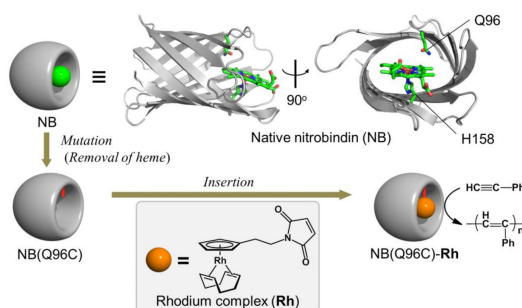


図 5 アポニトロバインディンへのロジウム錯体の挿入によるフェニルアセチレンの重合触媒の構築

得られた人工生体分子触媒 NB(Q96C)-**Rh** を用いて、フェニルアセチレンの重合を実施した。pH 8、25 °C の条件下で 10 μ M の触媒を添加したところ、24 時間経過した段階で $M_n = 42600$ 、 $M_n/M_w = 2.2$ のポリマーが得られた。同様の条件下、タンパク質の表面に **Rh** を導入した触媒 (具体的には、ミオグロビンの 125 番目のアラニンシステインに変換した変異体 Mb(A125C)-**Rh**) でも、同様の分子量分布のポリマー生成物が得られた。しかしながら、ポリマーの *trans/cis* 比を評価したところ、NB(Q96C)-**Rh** を用いて得られたポリマーは 53 : 47 に対して、Mb(A125C)-**Rh** では、7 : 93 となった。一方、本来 **Rh** のような Rh 錯体のみでは、生成物はほぼ完全に *cis* 体が生成することが知られており、**Rh** を THF 中に加えてフェニルアセチレンの重合を行った場合にも、*trans/cis* 比は 7 : 93 であった。したがって、NB(Q96C)-**Rh** を用いた重合では、タンパク質の空孔が生成物の立体を制御していることが明らかであり、その結果として本来の反応機構とは異なる経路で、*trans* 体がある程度優先して生成したことを示唆している。次に、ニトロバインディンの空孔の形状をさらに検討し、NB(Q96C/H76L/H158L)-**Rh** (図 6) を用いると、さらに *trans* 体の比が 7 割近くまで向上することが明らかとなった。

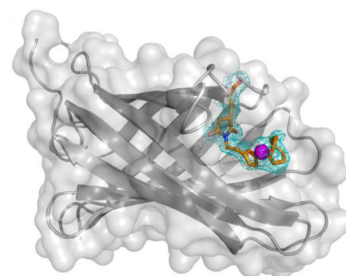


図 6 NB(Q96C/H76L/H158L)-**Rh** の結晶構造

以上、ロジウム錯体 **Rh** をタンパク質マトリクスの中に固定することより、活性を保持したまま、錯体のみで行った重合反応とは異なる生成物の立体に導くことを示した。また、本系はアミノ酸の配置を遺伝子工学的手法によって調整することにより、生成物の構造を目的に応じて制御可能と言える。

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 16 件)

- (1) *meso*-Dibenzoporphycene has a Large Bathochromic Shift and a Porphycene Framework with an Unusual Cis Tautomeric Form
Oohora, K.; Ogawa, A.; Fukuda, T.; Onoda, A.; Hasegawa, J.; Hayashi, T.
Angew. Chem. Int. Ed. **2015**, *54*, 6227–6230.
- (2) Artificial Hydrogenase: Biomimetic Approaches Controlling Active Molecular Catalysts
Onoda, A.; Hayashi, T.
Curr. Opin. Chem. Biol. **2015**, *25*, 133–140. [Front Cover]
- (3) Generation of New Artificial Metalloproteins by Cofactor Modification of Native Hemoproteins
Hayashi, T.; Sano, Y.; Onoda, A.
Isr. J. Chem. **2015**, *55*, 76–84.
- (4) Co(II)/Co(I) Reduction-induced Axial Histidine-flipping in Myoglobin Reconstituted with a Cobalt Tetrahydrocorrin as a Methionine Synthase Model
Hayashi, T.; Morita, Y.; Mizohata, E.; Oohora, K.; Ohbayashi, J.; Inoue, T.; Hisaeda, Y.
Chem. Commun. **2014**, *50*, 12560–12563.
- (5) Photoinduced Hydrogen Evolution Catalyzed by a Synthetic Diiron Dithiolate Complex Embedded within a Protein Matrix
Onoda, A.; Kihara, Y.; Fukumoto, K.; Sano, Y.; Hayashi, T.
ACS Catal. **2014**, *4*, 2645–2648.
- (6) A Rhodium Complex-linked Hybrid Biocatalyst: Stereo-controlled Phenylacetylene Polymerization within an Engineered Protein Cavity
Fukumoto, K.; Onoda, A.; Mizohata, E.; Bocola, M.; Inoue, T.; Schwaneberg, U.; Hayashi, T.
ChemCatChem **2014**, *6*, 1229–1235. [Front Cover]
- (7) H₂O₂-dependent Substrate Oxidation by an Engineered Diiron Site in a Bacterial Hemerythrin
Okamoto, Y.; Onoda, A.; Sugimoto, H.; Takano, Y.; Hirota, S.; Kurtz, D. M., Jr.; Shiro, Y.; Hayashi, T.
Chem. Commun. **2014**, *50*, 3421–3423. [Front Cover]
- (8) C(sp³)-H Bond Hydroxylation Catalyzed by Myoglobin Reconstituted with Manganese Porphycene
Oohora, K.; Kihira, Y.; Mizohata, E.; Inoue, T.; Hayashi, T.
J. Am. Chem. Soc. **2013**, *135*, 17282–17285.
- (9) Crystal Structure, Exogenous Ligand Binding and Redox Properties of an Engineered Diiron Active Site in a Bacterial Hemerythrin
Okamoto, Y.; Onoda, A.; Sugimoto, H.; Takano, Y.; Hirota, S.; Kurtz, D. M., Jr.; Shiro, Y.; Hayashi, T.
Inorg. Chem. **2013**, *52*, 13014–13020.
- (10) Chemically Programmed Supramolecular Assembly of Hemoprotein and Streptavidin with Alternating Alignment
Oohora, K.; Burazerovic, S.; Onoda, A.; Wilson, Y. M.; Ward, T. R.; Hayashi, T.
Angew. Chem. Int. Ed. **2012**, *51*, 13818–13821 [Front Cover Picture].
- (11) Photocurrent Generation of Hierarchical Zinc-substituted Hemoprotein Assemblies immobilized on Gold Electrode
Onoda, A.; Kakikura, Y.; Uematsu, T.; Kuwabata, S.; T. Hayashi, T.
Angew. Chem. Int. Ed., **2012**, *51*, 2628–2631.
- (12) Creation of an Artificial Metalloprotein with a Hoveyda–Grubbs Catalyst Moiety through the Intrinsic Inhibition Mechanism of α -Chymotrypsin
Matsuo, T.; Imai, C.; Yoshida, T.; Saito, T.; Hayashi, T.; Hirota, S.
Chem. Commun., **2012**, *48*, 1662–1664.
- (13) A Hydrogenase Model System Based on the Sequence of Cytochrome *c*: Photochemical Hydrogen Evolution in Aqueous Media.
Y. Sano, A. Onoda and T. Hayashi,
Chem. Commun. **2011**, *47*, 8229–8231

[Inside Cover Picture].

- (14) A Chemically-Controlled Supramolecular Protein Polymer Formed by a Myoglobin-Based Self-Assembly System. Oohora, K.; Onoda, A.; Kitagishi, H.; Yamaguchi, H.; Harada, A.; Hayashi, T. *Chem. Sci.*, **2011**, 2, 1033–1038.
- (15) Precise Design of Artificial Cofactors for Enhancing Peroxidase Activity of Myoglobin: Myoglobin Mutant H64D Reconstituted with a "Single-Winged Cofactor" Is Equivalent to Native Horseradish Peroxidase in Oxidation Activity. Matsuo, T.; Fukumoto, K.; Watanabe, T.; Hayashi, T. *Chem.-Asian J.*, **2011**, 6, 2491–2499 [Inside Cover Picture].
- (16) Supramolecular Hemoprotein–Gold Nanoparticle Conjugate Onoda, A.; Ueya, Y.; Sakamoto, T.; Uematsu, T.; Hayashi, T. *Chem. Commun.* **2010**, 9107–9109.

[学会発表] (計 6 件)

- (1) 8th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP8) "Structure and Physicochemical Properties of Supramolecular Hemoprotein Assembly Using a Cytochrome *b*₅₆₂ Mutant" [Invited] Hayashi, T. June, 2014. Istanbul, Turkey
- (2) 7th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC7) "Structural Model of Methionine Synthase by Myoglobin Reconstituted with a Cobalt Corrin Derivative" [Invited] Hayashi, T. December, 2014. Gold Coast, Australia
- (3) 4th Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry (CanBIC-5) "Alkane Hydroxylation Catalyzed by Myoglobin Reconstituted with Mn-Porphycene" [Invited] Hayashi, T. May, 2013. Parry Sound, Canada
- (4) 16th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC16) "Construction of a Methionine Synthase Model by Apomyoglobin–Cobalt Corrin Complex" [Keynote] Hayashi, T. July, 2013. Grenoble, France
- (5) 15th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC-15) "Functionalization of Hemoproteins with Artificially Created Modified Heme" [Keynote] Hayashi, T. August, 2011. Vancouver, Canada
- (6) The 3rd Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry (CanBIC-3) "Water Expelling Mechanism from the Substrate-Binding Site in Cytochrome P450cam" [Invited] Hayashi, T. June, 2011. Parry Sound, Canada

[図書] (計 2 件)

- (1) Artificial Metalloenzymes Containing an Organometallic Active Site Onoda, A.; Hayashi, T.; Salmann, M. In *Bioorganometallic Chemistry*; Jaouen, G.; Salmann, M. Eds.; Wiley VCH, Weinheim, 2015, pp. 310–337.
- (2) Generation of Functionalized Biomolecules Using Hemoprotein Matrices with Small Protein Cavities for Incorporation of Cofactors Hayashi, T. In *Coordination Chemistry in Protein Cages*; Watanabe, Y.; Ueno, T. Eds.; Wiley VCH, Hoboken, NJ, 2013, pp. 87–110.

[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

(3) 連携研究者

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