

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月10日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2015～2018

課題番号：15KT0144

研究課題名(和文)生物が使う鉄ヒドリド活性種の遷移状態：タンパク質空孔内における制御と反応開拓

研究課題名(英文) A transition state of biologically relevant Fe hydride: Reactivity studies in a protein cavity

研究代表者

小野田 晃 (Onoda, Akira)

大阪大学・工学研究科 准教授

研究者番号：60366424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、光エネルギーを利用して水を水素源に生成したFeヒドリドを活性種にもつFeバイオ触媒を開発した。マレイミド部を導入したジチオラート架橋Fe二核錯体を、強固なバレル構造をもつニトロバインディンの疎水空孔内に共有結合を介して連結し、Feバイオハイブリッド触媒を構築した。鉄二核錯体のジチオラート架橋配位子をアザジチオラートに変換し、第二配位圏にプロトンシャトルとなるアミノ酸残基を適切な位置にグルタミン酸やリジンなどの残基を導入することによって、水素発生の活性向上を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エネルギー・環境問題の克服が世界的に求められる中、環境負荷低減、資源的に豊富な元素の利用、光エネルギーの利用、を達成した上で、有用物質を高効率に変換する触媒開拓が必須である。オレフィン、イミン、カルボニルの水素化反応の均一系触媒が多数開発されているが、多くは貴金属錯体のため、資源的に豊富な金属への移行を目指す必要がある。本研究では、水を水素源、かつ光エネルギー利用し、Feヒドリドを活性種にもつFeバイオ触媒を開発した。第二配位圏にアザ部位、またプロトンシャトルとなるアミノ酸残基を適切な位置に導入することによって、水素発生の活性向上を達成しており、有機物の水素化反応への展開につながる成果である。

研究成果の概要(英文)：A structurally well-defined protein scaffold will provide a platform to build an artificial metalloenzymes with a designed outer coordination environment capable of accelerating important chemical transformation. To generate a [FeFe]-hydrogenase model, an H₂-evolving diiron complex with a bridging dithiolate ligand was covalently embedded within a nitrobindin cavity formed by a robust beta-barrel structure. Nearby the diiron site, an amide moiety was introduced using azadithiolate ligand and then positioning a proton shuttling residue was positioned by Glu at the residue 100. The diiron catalyst with the proton shuttle provides the highest photocatalytic evolution activity at pH 4. We here demonstrate that the approach unifying a synthetic metal catalyst and the structurally well-designed protein scaffold has immense potentials in proton shuttle during the catalysis.

研究分野：生体関連化学、生物無機化学

キーワード：バイオハイブリッド触媒 人工金属酵素 鉄ヒドリド

1. 研究開始当初の背景

エネルギー・環境問題の克服が世界的に求められる中、環境負荷低減、資源的に豊富な元素の利用、光エネルギーの利用、を達成した上で、社会で求められる物質を高効率に変換する触媒系を開拓することは必須の課題である。ファインケミカルや医薬品などの物質生産に組み込まれる極めて重要な物質変換方法の一つが、オレフィン、イミン、カルボニルの水素化反応である。いずれも貴金属錯体のため、資源的に豊富な金属への移行を目指す必要があり、水素化反応を触媒する Fe 錯体の開発が勢力的に研究されている。最近では、イソプロパノールのヒドロキシ基を水素源とする高活性なアミノ(イミン)ジホスフィン Fe 錯体やヒドロシロキサンを水素源とする Fe 錯体など、Si、P、N 配位の Fe 錯体触媒が有機溶媒中で活性な系として開発された。本研究は、水を水素源、かつ光エネルギー利用を視野に入れた、より汎用性の高い環境負荷低減型の水素化反応を実現する Fe バイオ触媒の開発に取り組んだ。鍵中間体である Fe ヒドリド種の遷移状態の制御を通して、反応応用に向けた Fe バイオ触媒の研究を推進することが狙いである。

2. 研究の目的

生体に目を向ければ、Fe ヒドリドが酵素反応においても重要であることが知られている。その代表例が [FeFe]ヒドロゲナーゼであり、プロトンと水素分子間の可逆的変換反応を触媒する。その活性中心は H クラスターと呼ばれ、Fe 二核コアと鉄硫黄クラスター ([4Fe4S])より構成される(図1)。Fe 二核コアは、架橋アザジチオラート、カルボニルおよびシアニ化物が配位した有機金属型の特殊な構造であり、活性な Fe ヒドリドを生成する。この Fe 二核コアは、システインで架橋した隣接の [4Fe4S] クラスターから迅速な電子移動、またプロトンチャネルを経由した効率的なプロトン供給を受け、円滑な水素への変換を達成する。[FeFe]ヒドロゲナーゼの活性中心がもつ優れた触媒機能に着目し、水素発生能を有する金属錯体触媒が近年勢力的に研究されている。特に $(\mu\text{-S}_2)[\text{Fe}^{\text{I}}(\text{CO})_3]_2$ 型のモデル錯体では、電気化学的あるいは光還元により高活性な水素発生系が複数報告されている。このヒドロゲナーゼの Fe ヒドリド種は、水系で生成可能であり、かつ高い反応性を有するので、Fe ヒドリド種の特性を制御して水中かつ光エネルギーを利用した Fe 触媒による水素化反応の開発が可能であることに着眼した。

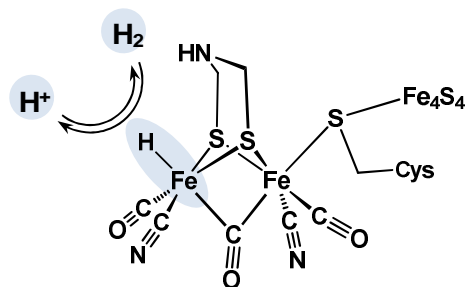


図1 [FeFe]ヒドロゲナーゼの活性中心の構造

本研究代表者は、天然酵素の反応性や選択性とは異なる機能を発現する人工バイオ触媒の開発が専門であり、水中においてヒドロゲナーゼ活性を有する新しいバイオ触媒の構築に世界に先駆けて成功した。ヒドロゲナーゼ活性中心に類似した $(\mu\text{-S}_2)[\text{Fe}^{\text{I}}(\text{CO})_3]_2$ コアをタンパク質内部に配位結合あるいは錯体を共有結合で固定化した人工 Fe バイオ触媒系を構築し、光駆動による水素発生能を達成した。ヒドロゲナーゼモデル中心をタンパク質マトリクスに閉じ込めて触媒活性を保持する系は、本研究代表者が独自に発展させたものであり、他に報告はない。このバイオ触媒系を活用して、空孔内で生成した Fe ヒドリド種の特性を制御することによって、Fe バイオ触媒による有機合成応用への足掛かりになると考えた。この系は、水を水素源として、かつ光エネルギーを利用するだけでなく、タンパク質の反応場をチューニングすることにより、不斉水素反応や官能基選択的な反応を達成可能である。以上の経緯により、ヒドロゲナーゼが使う Fe ヒドリド種をタンパク質空孔内で制御して有機反応へ応用する本研究を着想するに至った。

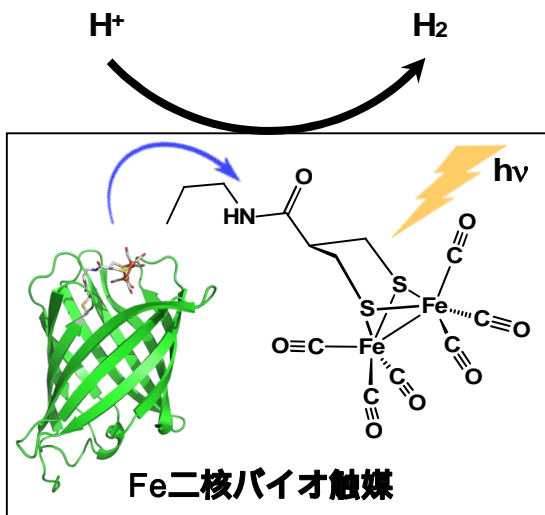


図2 Fe 二核錯体を活性部位にもつ Fe 二核バイオ触媒により生成する Fe ヒドリドを活用した光駆動水素発生反応

3. 研究の方法

鉄二核錯体を固定化するタンパク質には、強固なβバレル構造を有するニトロバインディン(NB)を利用した。これまでも、本研究代表者らは、NB とその他の金属錯体を連結したバイ

才触媒を作製し、いくつかの触媒反応において高い活性を示すことを報告しており、NB を選択した。マレイミド基を有する鉄二核錯体を、NB 空孔内の 96 番の位置に導入したシステインと共有結合を介して固定化した。配位性アミノ酸残基による鉄への非特異的な配位を回避するために、75、148 番目のメチオニン、76、158 番目のヒスチジンをロイシンへと変異導入した NB4 を使用した。この他に、ヘムの軸配位となる 158 番目のヒスチジン及び遠位に存在する 76 番目のヒスチジンをそれぞれロイシンに置換した。ヒスチジンをロイシンに置換することで NB はヘムを持たないアポ体の状態で調製される。NB4 を基準として、さらにグルタミン酸、リジン、トリプトファンやフェニルアラニンを空孔近傍の様々な位置に導入した変異体を調製した。それぞれの NB 変異体は、Strep-tag によるアフィニティー精製により調製した。

Fe バイオハイブリッド触媒の水素発生の評価は次のように実施した。反応溶液をグローブボックス内で調製した後に、可視光源としてカットオフフィルター ($420 \text{ nm} < \lambda < 770 \text{ nm}$) を通した Xe 光を照射下に水素発生反応を 25°C で行い、その経時変化を GC MS により追跡した。

4. 研究成果

1) 鉄二核バイオ触媒の調製

Fe 活性点を形成する金属錯体には、プロパンジチオラートが架橋配位したヘキサカルボニル鉄二核錯体を出発点としてこれまで研究してきたが、Fe ヒドライド種の特性を制御するために、プロトンアクセプターとなるアミン部位を導入したアザジチオラート配位子を含む錯体 **1** を新たに合成した。アミノ基よりマレイミド基を導入し、タンパク質との連結に備えた。同様の分子設計で、マレイミド基をつなぐリンカー長の異なる鉄二核錯体 **2**、またアザ部位を含まない **3** を比較のために合成した。次に、これらの錯体を NB と連結したバイオ触媒を調製した。アポ体として発現、精製した NB をグローブボックス内で過剰のジチオスレイトールを用いてシステイン残基を還元処理した後に、鉄二核錯体 **1** のジメチルスルホキシド溶液と反応させて、さらにサイズ排除カラムにより精製して NB-1 を得た。NB-1 はタンパク質に特徴的な

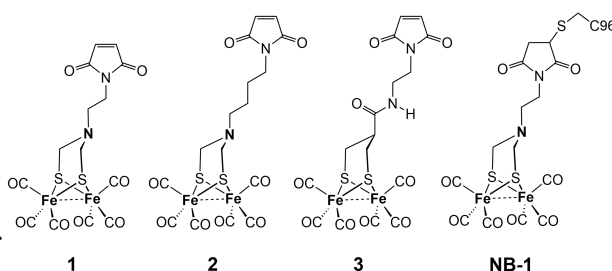


図3 Fe 二核錯体の構造

280 nm の吸収に加えて、鉄二核錯体 **1** に特徴的な 330 nm 付近の紫外部の吸収をもつ。また、円二色性スペクトルでは β シート構造に由来するコットン効果を観測したことから、鉄二核錯体の導入によって NB に大きな構造変化はないことが確認された。さらに、FT/IR スペクトルからはジチオラート架橋鉄二核カルボニル錯体に特徴的な CO 伸縮振動のピークを 2072、2032、1993 cm^{-1} に観測した(図4)。以上より、鉄二核錯体 **1** が NB と連結していることが明らかとなった。

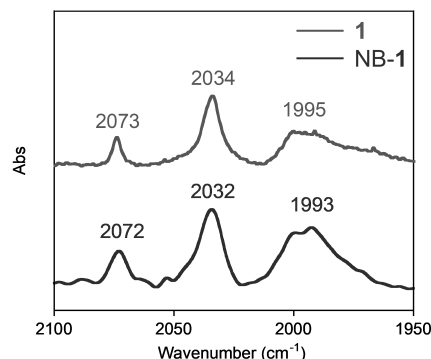


図4 Fe 二核バイオ触媒の赤外吸収スペクトル

2) 鉄二核バイオ触媒のタンパク質反応場の改変

天然の水素発生酵素であるヒドロゲナーゼには、Fe 活性中心にプロトンを導くチャンネルが存在しており、高活性な水素発生を達成していると考えられている。そこで、ヒドロゲナーゼが有するプロトンチャンネルを模倣した活性中心への効率的なプロトン運搬ルートとして活性中心近傍の残基へのグルタミン酸およびリジン残基の変異導入を行った。NB の 98 番目のトレオニン (T98)、100 番目のロイシン (L100)、125 番目のアラニン (A125)、126 番目のセリン (S126)、128 番目のバリン (V128)、150 番目のトレオニン (T150) に着目し、グルタミン酸またはリジンを導入した種々の NB 変異体を調製した(図5)。

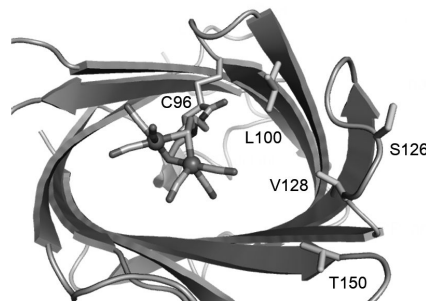


図5 Fe 二核バイオ触媒の計算構造と変異導入した近傍のアミノ酸残基

3) 鉄二核バイオ触媒の反応性評価

鉄二核バイオハイブリッド触媒の水素発生反応における触媒活性を評価した。犠牲試薬にアスコルビン酸ナトリウム (100 mM)、光増感剤にトリス(2,2-ピピリジル)ルテニウム (II) 錯体 ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$) (140 μM) をもちいて、可視光を照射し、光触媒的な水素発生反応を触媒濃度 7.8 μM 、50 mM トリスバッファー (pH 4.1)、200 mM NaCl の条件で行った。反応開始から 10、20、30、60、120 分の間隔で水素発生反応の経時変化をガスクロマトグラフィーにより追跡した。NB4-1 の触媒回転数(TON) は

2 時間で 111 であったのに対して、リンカーの炭素鎖の長い錯体 **2** を固定化した触媒 (NB4-2) では TON は 80 であり、アザを含まないプロパンジチオラート架橋を有する鉄二核カルボニル錯体 **3** を固定化した触媒 (NB4-3) では、71 であった。この結果は、第二配位圏を構成するアザ部位が触媒活性に寄与していること、また、タンパク質空孔内での鉄二核錯体の配置も重要であることを示している。

次に、L100, S126, V128 の位置にグルタミン酸あるいはリジン残基を導入し、カルボキシル基あるいはアミノ基が水素発生に及ぼす効果を検証した。活性中心近傍の 100 番の位置にグルタミン酸残基を導入した NB16-1 では TON は 136 に達した。一方で、その他の NB 変異体を用いて調製したバイオ触媒では、TON の向上は見られなかった。以上より、活性中心近傍の残基数 100 番の位置へグルタミン酸を導入することが、水素発生反応の加速に有効であることが明らかとなった。また、NB16-2 では、初速の加速が観測されず、水素発生反応の加速にはアザ部位とグルタミン酸側鎖の位置関係も重要であることが示唆された。

NB4-1 とグルタミン酸を導入した NB16-1 における水素発生反応性の pH 依存性を検討した。pH 4.0 に加えて pH 6.0、7.0 の条件で評価したところ、pH 7.0、6.0 では両者に差はみられない一方で、pH 4.0 では顕著な差があることから、pH 4 付近に pK_a をもつグルタミン酸側鎖のカルボキシル基が反応に関与していることが示唆された。即ち、カルボキシル基がプロトンシャトルとして Fe ヒドリドの生成に寄与していると考えられる。

4) 鉄二核バイオ触媒の構造解析

Fe バイオ触媒の構造を明らかにするために、NB16 のアポ体の結晶に対して鉄二核錯体の DMSO 溶液を添加し、結晶中 *in crystallo* での共有結合形成による鉄二核錯体の固定化を行った。NB16 の結晶をアガロースゲルの内部で結晶化を行う固相ゲル結晶化法 (GAIN 法) によって調製した。得られたアポ体の結晶に対して、DMSO に溶かした錯体 **1** をゆっくりと加えた。X 線結晶構造解析の結果、**1** はマレイミド部位からアザ部位の窒素原子までを特定することができた (図 6)。一方で、**1** のリンカーが長いから、鉄中心の構造決定には至らなかった。NB16-1 の平均温度因子は、NB16 と比較して約 4 倍に増加しており、NB16 の空孔内に鉄二核錯体が保持されていることを示唆する結果である。

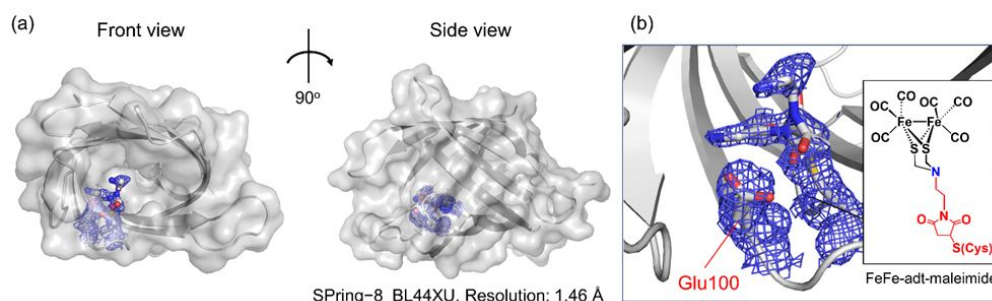


図 6 NB16-1 の X 線構造解析の結果 (全体図 a と拡大図 b)

5) まとめ

天然の水素発生酵素であるヒドロゲナーゼを模倣して、第二配位圏としてアザジチオラート架橋配位子を有する鉄二核ヘキサカルボニル錯体を連結した Fe バイオ触媒を新規に構築した。さらに、Fe 錯体に含まれるアザ部位の近傍にグルタミン酸を導入したタンパク質反応場との組み合わせにおいて、光駆動の水素発生反応において反応速度が加速し、TON も向上することを見出した。人工的なタンパク質反応場を活用して、鉄中心近傍の第二配位圏、さらにプロトンシャトルの構築することによって、Fe ヒドリドの反応特性の制御を達成した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

“A Pyrene-linked Cavity within a β -Barrel Protein Promotes an Asymmetric Diels-Alder Reaction”

T. Himiyama, N. Taniguchi, S. Kato, A. Onoda,* T. Hayashi*

Angew. Chem. Int. Ed., 56, 13618–13622. (2017). Front Cover. 査読有り

DOI: 10.1002/anie.201704524.

“Construction of a Hybrid Biocatalyst Containing a Covalently-linked Terpyridine Metal Complex within a Cavity of Aponitrobindin”

T. Himiyama, D. F. Sauer, A. Onoda,* T.P. Spaniol, J. Okuda, T. Hayashi*

J. Inorg. Biochem., 158, 55–61 (2016). 査読有り

DOI:10.1016/j.jinorgbio.2015.12.026

“金属タンパク質キャビティー内に固定化したハイブリッドバイオ触媒”

小野田 晃

触媒, 触媒研究の最前線 ~ とびたて若き研究者たち ~ 155-158 (2016). 査読無し

〔学会発表〕(計 4 件)

“Shuttling Protons: Hydrogen Evolution Catalyzed by a Synthetic Diiron Azadithiolate Complex Embedded within a Protein Matrix”

Akira Onoda

IMS Asian International Symposium, Japan-China Joint Interdisciplinary Symposium on Coordination-based Hybrid Materials 分子科学研究所、岡崎、2017/6/22.

“SHUTTLING PROTONS: Hydrogen Evolution Catalyzed by a Synthetic Diiron Azadithiolate Complex Embedded within a Protein Matrix”

Akira Onoda

Biotechnology and Chemistry for Green Growth 淡路島夢舞台、淡路島、2017/3/7.

“Hybrid Biocatalysts Harboring a Synthetic Catalyst within a Protein Cavity”

Akira Onoda

Japan-Korea-Taiwan Bioinorganic Chemistry Symposium 2016 分子科学研究所、岡崎、2016/9/30.

“Hybrid Biocatalysts : A Synthetic Metal Complex Embedded within a Protein Scaffold”

Akira Onoda,

Telluride Science Research Center Workshop, Structure and Function of the Hydrogenase Mimics” テルライド、コロラド、2015/7/3.

〔図書〕(計 1 件)

“人工金属酵素” 小野田晃, 林 高史、フロンティア生物無機化学、三共出版 (2016).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔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)研究協力者

研究分担者氏名：林 高史

ローマ字氏名：Takashi Hayashi

所属研究機関名：大阪大学

部局名：大学院工学研究科

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：20222226

(2)研究協力者

研究協力者氏名：氷見山 幹基

ローマ字氏名：Tomoki Himiyama

(3)研究協力者

研究協力者氏名：立川 賢悟

ローマ字氏名：Kengo Tachikawa

(4)研究協力者

研究協力者氏名：青木 亜由美

ローマ字氏名：Ayumi Aoki