

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20559002

研究課題名(和文) 非天然多核金属中心を有する人工タンパク質触媒の創製

研究課題名(英文) Construction of Artificial Biocatalysts containing a Nonnatural Dinuclear Active Site

研究代表者

小野田 晃 (ONODA AKIRA)

大阪大学・工学研究科・助教

研究者番号：60366424

研究成果の概要(和文)：

本研究では、タンパク質マトリクスを活用して多核金属中心を活性部位に導入することにより、新たな高機能生体触媒の創製に取り組んだ。酸素結合機能をもつ鉄二核タンパク質 DcrH-Hr の機能解析結果を踏まえて、活性部位近傍のアミノ酸変異導入し、鉄二核中心の反応性の変換に成功した。また、水素発生触媒活性を有する鉄二核ヘキサカルボニル中心を導入したヒドロゲナーゼ活性を有する新規な金属タンパク質が創出に成功した。

研究成果の概要(英文)：

Artificial metalloenzymes containing unnatural multinuclear core were constructed in this project. Dioxygen-binding diiron protein, DcrH-Hr, was studied to elucidate the characteristics and the approaches using a mutation of amino acid residues around the active site led to conversion of the oxygen-binding function. Successful incorporation of a diiron hexacarbonyl core into the protein matrix of cytochrome c provided us artificial hydrogenase capable of photocatalytic hydrogen evolution in an aqueous solution.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	0	1,300,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	630,000	4,030,000

研究分野：生体関連化学

科研費の分科・細目：生物無機化学

キーワード：金属タンパク質、多核金属錯体、鉄二核中心、人工タンパク質、酸化反応

1. 研究開始当初の背景

金属錯体は有機反応、高分子合成等のあらゆる工業的な局面で触媒として用いられており、近年、環境への配慮の観点から、高機能化に加えて水中での反応性を目指して触媒開発が進められている。一方で、生

体内には金属酵素が常温常圧の温和な条件下、水中で機能するが、複雑な構成のため実用化に困難なタンパク質も多い。そこで、化学と生物学のアプローチの両方の利点を組み合わせた新規触媒の創製が模索されており、合成金属錯体が有する機能とタンパク質が有する特異な反応場を組み合わせ、

高機能化した人工触媒が研究されている。研究開始当初から、新規金属タンパク質触媒の創製に向けて、変異体研究、非天然アミノ酸の導入や、天然ドメインの融合等の研究が国内外において勢力的に進められている。その中でも分子論的な設計に基づいて、非天然の単核金属錯体の導入及び酸化反応に成功した例としては、ヘムタンパク質のポケットに Mn サレン錯体やコロールを挿入した研究がある。また、スイスのグループは、Rh、Pd 等の錯体をピオチン-アビジンの強い認識を利用してタンパク質空間内に固定化し、水素化、C-C 結合生成の不斉反応に成功していた例があった。一方で、多核金属中心を持つ金属酵素の人工的な機能化は、大きく遅れている。本研究は、タンパク質マトリクス内に非天然の多核金属中心の構築を模索し、触媒反応への適用を目的としており、これまでの研究とは異なる独自の研究展開に位置づけられる。

2. 研究の目的

触媒化学の最も重要なターゲットとして、困難な反応を触媒するニトロゲナーゼ、ヒドロゲナーゼ等の多核金属中心を有するタンパク質と同様の機能をもつ錯体触媒の開発が精力的に研究されているが、多核金属触媒をタンパク質マトリクスと融合させた研究は極端に少なく、触媒として機能のあるものはほとんど例がない。本研究では、タンパク質マトリクス中を活用して、新たな多核金属中心を有する生体触媒の構築を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、多核中心を有する金属タンパク質を基盤として、新規生体金属触媒への変換を行う。具体的には、まず、鉄二核中心を有する DcrH-Hr タンパク質を選択し、その機能を明らかにするとともに、活性中心近傍のアミノ酸変異を駆使して、酸素結合能から酸化反応中心への変換を追求する。また、別のアプローチとして、機能性の多核錯体を、配位性アミノ酸を介してタンパク質マトリクス内固定化した人工タンパク質を創製する。

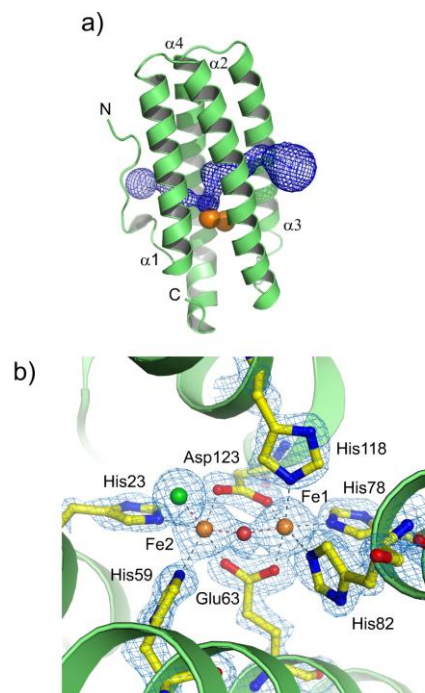
4. 研究成果

鉄二核中心を有する DcrH-Hr タンパク質を基盤とした人工タンパク質創製

メタンの水酸化反応を触媒するメタンモノオキシゲナーゼは、巨大タンパク質中の4本ヘリックスに囲まれた鉄二核が活性部位である。また、この活性部位には基質を導くチャンネルが存在する。一方で、酸素運搬体で

あるヘムエリスリン (Hr) に類似した DcrH-Hr タンパク質は、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 様のドメインであり、その鉄二核中心はオキソ/ヒドロキソ架橋された二つの鉄イオンに5つのヒスチジンが配位し、アスパラギン酸とグルタミン酸のカルボキシル基が架橋した Hr と同様の配位構造もち、酸素分子と結合するセンサータンパク質と推定されている。興味深いことに、この鉄二核中心は疎水的なチャンネルと連結している。そこで、酸素結合タンパク質 DcrH-Hr の鉄二核中心に着目し、その反応性を調節し、酸化活性をもつ酵素への変換を目指した。

まず、機能改変に向けて DcrH-Hr に特徴的な金属中心近傍に存在する疎水性空孔の機能解析を行った。Hr の鉄二核中心の5つの酸化状態を踏まえ、DcrH-Hr の速度論的な観点での詳細な酸素親和性および鉄二核中心の酸化状態について各種分光学的手法を用いて解析し、DcrH-Hr の活性中心近傍の疎水性空孔が機能に及ぼす影響について検討した。DcrH-Hr の酸素結合速度定数 k_{on} はレーザーフラッシュフォトリスを用いてオキシ体由来する 500 nm の過渡吸収変化から求めたところ、 $600 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と Hr よりも大きな値であった。ストップドフロー実験より解離速度定数 k_{off} (160 s^{-1}) は Hr よりも小さい値が得られ、自動酸化の半減期 $t_{1/2\text{auto}}$ (22 min) は Hr よりも短いことがわかった。DcrH-Hr は Hr に比べて、酸素親和性が10倍以上強く、自動酸化が30倍以上速いという事実より、金属中心近傍の疎水性空孔が活性



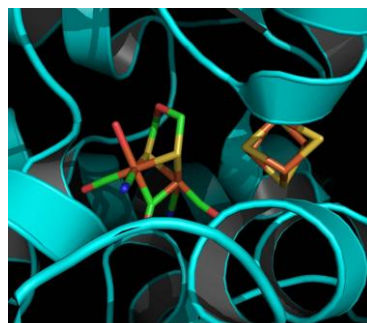
中心への酸素分子や水分子のアクセスを容易にしていることが明らかとなった。

Hr ではメト体からデオキシ体への還元過程において二種類の Fe(II)Fe(III)の混合原子価状態 (セミメト O 体とセミメト R 体) を経由する。Hr の二つの混合原子価状態はデオキシとメト体へと速く不均化するため単離されていない。DcrH-Hr において様々な pH の条件下においてDcrH-Hr のメト体の一電子還元、デオキシ体の一電子酸化による混合原子価状態の生成を検討したところ、セミメト O 体は生成しない一方でセミメト R 体は長時間安定に存在することが ESR 測定の結果から示唆された。さらに、安定化によって、Cl⁻ が結合したセミメト R 体の結晶解析 (1.8 Å) にも成功した (図 1)。中心近傍の疎水性空隙のために鉄二核中心が溶媒分子に露出されており、水酸化イオン等の鉄イオンへの配位が促進され、セミメト R 体が安定化したと推察される。

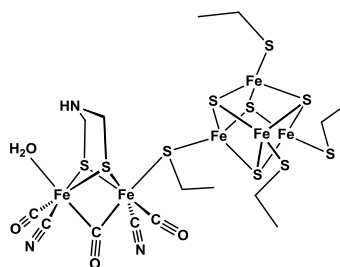
次に、二核鉄の配位アミノ酸及び近傍のアミノ酸変異体を調製し、その発現と機能解析を行った。例えば、ヒスチジン 118 番をアスパラギン酸に置換した変異体、非配位性のイソロイシン 119 番を配位性アミノ酸残基であるヒスチジン、グルタミン酸へと置換した変異体等の改変タンパク質を作製した。その結果、酸素等の外部配位子との結合挙動が異なる I119E 変異体を見いだした。この変異体のアジドやフェノールとの結合モードを紫外可視吸収とラマン分光測定により調べたところ、I119E 変異体において導入したグルタミン酸のカルボキシラートが二核鉄に直接配位しているか、または二核鉄の配位水分子に水素結合している可能性が示唆された。さらにこの変異体は、過酸化水素を酸化剤、グアイアコールを基質とした酸化反応において、野生型にはない反応性を有する事を見出した。

水素発生を触媒する鉄二核ヘキサカルボニル中心を有する人工還元酵素の創製

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り、その中の一つである鉄ヒドロゲナーゼ ([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 2)。また、H-クラスターは隣接した四核鉄硫黄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とり、H-クラスターと四核鉄硫黄クラスター間の多電子移動を伴う電子の授受を円滑に行う。このような [FeFe]-H₂ase の活性中心である H-クラスターがもつ優れた機能をめざし、有機溶媒中におけるモデル化合



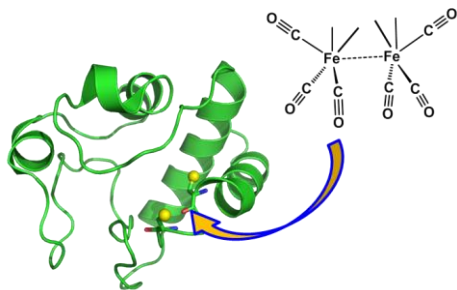
PDB: 3C8Y



物として二核鉄カルボニルクラスターから構成される多くの金属錯体が報告されてきた。近年になって、水中において安定に存在するジチオラート架橋鉄二核ヘキサカルボニルクラスター錯体が報告されているが、完全水中における触媒的な水素活性化反応を直接確認した例は僅かである。そこで、水中でヒドロゲナーゼ活性を有する新しい人工還元金属酵素の構築をめざして、鉄ヒドロゲナーゼの活性中心類似構造体である二核鉄ヘキサカルボニルクラスターを導入したタンパク質を調製し、その触媒機能評価を実施した。

錯体を導入するタンパク質として、二つのシステイン残基とチオエーテル結合を介して共有結合的にヘムを保持している電子伝達タンパク質であるシトクロム c (cyt c) を選択した。ヘムを化学的処理により除去した後、得られる cyt c のアポ体 (apocyt c) に二つのシステイン残基を配位部位として二核鉄ヘキサカルボニルクラスターを導入することで、新たに人工還元金属酵素 (H-apocyt c) の構築をおこなった (図 3)。さらに、得られる H-apocyt c と光増感剤を使った光駆動化学水素発生反応を行い、H-apocyt c の触媒活性評価を実施した。

窒素雰囲気下、得られた apocyt c と原料錯体である Fe₃(CO)₉ を pH 8 のトリス塩酸緩衝液中で混合し、キセノン照射下、4 °C で 12 時間反応させた後に、過剰の Fe₂(CO)₉ を除去し、目的の人工還元金属酵素 H-apocyt c を得た。H-apocyt c は ESI-TOF 質量分析により二核鉄ヘキサカルボニルクラスターと apocyt c が配位結合した化学種に相当するシグナルを与えた。また、330 nm 及び 400-550 nm に



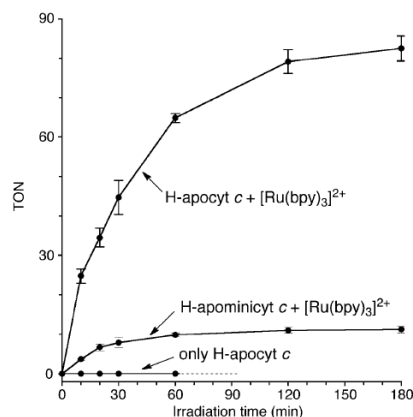
ショルダーピークをもつ特徴的な吸収が観測されたこと、2077, 2040, 2003 cm^{-1} にジチオール架橋二核鉄ヘキサカルボニル錯体に帰属される赤外吸収をもつことから、ジチオラート架橋二核鉄ヘキサカルボニルクラスターコアが apocyt c のタンパク質マトリクス中に導入されたことが明らかとなった。

H-apocyt c の触媒活性は、光増感剤にトリス(2,2'-ビピリジン)ルテニウム錯体を用いた水素発生により評価した。光励起された光増感剤 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ は犠牲還元剤と反応し、高い還元能を有する $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^+$ となる。続いて二核鉄ヘキサカルボニルクラスターを還元し、プロトンから水素分子への変換反応を触媒する。窒素雰囲気下、25 $^{\circ}\text{C}$ でキセノン光 (410-770 nm) を照射することで、光駆動水素発生反応をおこなった (図4)。その結果、25 $^{\circ}\text{C}$, pH 4.7 で3時間反応させた際の触媒回転数は 82 であり、高い触媒活性であることが確認された。さらに、比較として、二核鉄ヘキサカルボニルクラスターを同様にシステインで固定したヘプタペプチド YKCAQCH を別途調製し、同様の条件を用いて光化学水素発生反応を実施したところ、触媒回転数は 12 であった。したがって、H-apocyt c は、二核鉄ヘキサカルボニルクラスターが apocyt c のタンパク質マトリクス中に取り込まれた結果、高い触媒活性を達成したことが明らかになった。また、より pH が高い領域ではプロトン濃度が低下するため、また、pH が低い領域では犠牲還元剤であるアスコルビン酸イオンが不活性化するため、H-apocyt c の触媒活性は、pH 4.7 で最大であった。

以上の成果より、シトクロム c のアポ体を用いて水中で安定に存在する H-クラスターモデル化合物である二核鉄カルボニルクラスター含有人工還元金属酵素の H-apocyt c の構築に成功した。さらに、得られた二核鉄カルボニルクラスター含有タンパク質を使って、光増感剤を用いた光化学水素発生反応を検討したところ、完全水中において高い触媒活性をもつモデル系であることを明らかにした。

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 12 件)

- 1) “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).
- 2) “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., 8229–8231 (2011).
Inside Front Cover.
- 3) “A Chemically-controlled Supramolecular Protein Polymer Formed by a Myoglobin-based Self-assembly System”
K. Oohora, A. Onoda, H. Kitagishi, H. Yamaguchi, A. Harada, T. Hayashi
Chem. Sci., 2, 1033–1038 (2011). **Backside Cover.**
- 4) “Preparation and Reactivity of a Tetranuclear Fe(II) Core in the Metallothionein α -Domain”
Y. Sano, A. Onoda, R. Sakurai, H. Kitagishi, T. Hayashi
J. Inorg. Biochem., 105, 702–708 (2011).
- 5) “Supramolecular Hemoprotein–Gold Nanoparticle Conjugates”
A. Onoda, Y. Ueya, T. Sakamoto, T. Uematsu, T. Hayashi
Chem. Commun., 9107–9109 (2010).
Front Cover.
- 6) “DNA-binding Hemoproteins Tethering Polyamine Interface”
A. Onoda, H. Nagai, S. Koga, T. Hayashi
Bull. Chem. Soc. Jpn., 83, 375–377 (2010).

- 7) “Supramolecular Protein-Protein Complexation via Specific Interaction Between Glycosylated Myoglobin and Sugar-binding Protein”
H. Nagai, A. Onoda, T. Matsuo, T. Hayashi
Supramol. Chem., 22, 57–64 (2010).
- 8) “Alignment of Gold Clusters on DNA via a DNA-recognizing Zinc Finger-Metallothionein Fusion Protein”
S. Ariyasu, A. Onoda, R. Sakamoto, T. Yamamura
Bioconjugate Chem., 20, 2278–2285 (2009).
- 9) “Minimal Motif Peptide Structure of Metzincin Clan Zinc Peptidases in Micelles”
A. Onoda, T. Suzuki, H. Ishizuka, R. Sugiyama, S. Ariyasu, T. Yamamura
J. Pep. Sci., 15, 832–841 (2009).
- 10) “Porphyrin Arrays Responsive to Additives. Fluorescence Tuning”
T. Yamamura, S. Suzuki, T. Taguchi, A. Onoda, T. Kamachi, I. Okura
J. Am. Chem. Soc., 131, 11719–11726 (2009).
- 11) “Circular Dichroism of Neutral Zinc Porphyrin-Oligonucleotide Conjugates Modified with Flexible Linker”
A. Onoda, M. Igarashi, S. Naganawa, K. Sasaki, S. Ariyasu, T. Yamamura
Bull. Chem. Soc. Jpn., 82, 12880–1286 (2009).
- 12) “Conjugation of AuI1 Cluster with Cys-rich Peptides Containing the α -domain of Metallothionein”
S. Ariyasu, A. Onoda, R. Sakamoto, T. Yamamura
Dalton Trans., 21, 3742–3747 (2009).

[学会発表] (計 15 件)

- 1) 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、2011.11.5、大阪大学銀杏会館
- 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) 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、筑波大学筑波キャンパス
- 4) 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
 - 5) 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
 - 6) 福本和貴・小野田晃・林高史、アポニトロフォリン内部空間への共有結合を介したロジウム錯体の導入、日本化学会第 91 春季年会、2011.3.29、神奈川大学
 - 7) 福本和喜・小野田晃・林高史、Artificial Metalloenzyme Constructed by a Covalently-linked Rhodium(I) Complex within a Protein Matrix、Pacificchem2010, Molecular Design in Bioinorganic Chemistry #173、平成 22 年 12 月 19 日、ホノルル
 - 8) 岡本泰典・小野田晃・林高史、Functional Characteristics of Hemerythrin-like Domain from the Perspective of its Large Substrate Tunnel、Pacificchem2010, Molecular Design in Bioinorganic Chemistry #173、平成 22 年 12 月 19 日、ホノルル
 - 9) 岡本泰典・小野田晃・杉本宏・城宜嗣・林高史、ヘムエリスリン様タンパク質内部の疎水性空孔近傍に位置する鉄二核中心の構造と反応性、第 60 回錯体化学討論会、平成 22 年 9 月 28 日、大阪国際交流センター
 - 10) 小野田晃・佐野洋平・岡本泰典・福本和貴・林高史、鉄二核中心を有するヘムエリスリン様タンパク質の機能解析、第 4 回バイオ関連化学シンポジウム、平成 22 年 9 月 24 日、大阪大学豊中キャンパス
 - 11) 小野田晃、Characteristics of Diiron Site nearby Substrate Tunnel in Hemerythrin-like Domain of DcrH: Stable Mixed-Valent State and Dioxygen Binding Kinetics、第 2 回阪大 GCOE・ストラスブール大学シンポジウム、平成 22 年 7 月 1 日、ストラスブール大学、フランス
 - 12) 佐野洋平・小野田晃・林高史、システイン含有金属結合タンパク質を用いた多核金属クラスターの構築、第 59 回錯体化学討論会、平成 21 年 9 月 25 日、長崎大学文教キャンパス

- 13) 小野田晃・岡本 泰典・林高史、鉄二核中心を有するヘムエリスリン類縁タンパク質の調製とその機能改変、第59回錯体化学討論会、平成21年9月25日、長崎大学文教キャンパス
- 14) 岡本 泰典・小野田晃・林高史、Artificial Diiron Center in Dioxygen-binding Protein、第14回国際生物無機化学会議(ICBIC14)、平成21年7月27日、名古屋国際会議場
- 15) 佐野洋平・櫻井利恵・小野田晃・林高史、Novel Protein Catalysts Containing multinuclear Metal Cluster、第14回国際生物無機化学会議(ICBIC14)、平成21年7月27日、名古屋国際会議場

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計6件)

- 1)
名称：複数の金属ナノ粒子とヘムタンパク質2量体由来のアポタンパク質との複合体
発明者：林高史、小野田晃、植屋佑一
権利者：大阪大学
種類：特許
番号：PCT/JP2010/065625
出願年月日：2010/9/10
国内外の別：国外
- 2)
名称：ヘムタンパク質ポリマーが架橋された構造体
発明者：林高史、大洞光司、小野田晃
権利者：大阪大学
種類：特許
番号：PCT/JP2010/065536
出願年月日：2010/9/9
国内外の別：国外
- 3)
名称：複数の金属ナノ粒子とヘムタンパク質2量体由来のアポタンパク質との複合体
発明者：林高史、小野田晃、植屋佑一
権利者：大阪大学
種類：特許
番号：特願 2010-054960
出願年月日：2009/9/9
国内外の別：国内
- 4)
名称：ヘムタンパク質ポリマーが架橋された構造体
発明者：林高史、大洞光司、小野田晃
権利者：大阪大学

種類：特許
番号：特願 2009-208054
出願年月日：2010/9/9
国内外の別：国内

5)
名称：酸素吸蔵機能を有する1次元・2次元ヘムタンパク質超分子な構造体の構築
発明者：林高史、北岸宏亮、大洞光司、小野田晃、柿倉泰明
権利者：大阪大学
種類：特許
番号：PCT/JP2009/054569
出願年月日：2009/3/10
国内外の別：国外

6)
名称：酸素吸蔵機能を有する1次元・2次元ヘムタンパク質超分子な構造体の構築
発明者：林高史、北岸宏亮、大洞光司、小野田晃、柿倉泰明
権利者：大阪大学
種類：特許
番号：特願 2008-061373
出願年月日：2008/3/11
国内外の別：国外

○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/~haya-shiken/>

6. 研究組織
(1)研究代表者
小野田 晃 (ONODA AKIRA)
大阪大学・工学研究科・助教
研究者番号：60366424