

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25620044

研究課題名(和文) 新規な人工二核金属酵素の開発と触媒反応への応用

研究課題名(英文) Development of Novel Artificial Dinuclear Metalloenzymes and Application to Catalytic Oxidation Reactions

研究代表者

伊東 忍 (Itoh, Shinobu)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30184659

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)： 新規な人工金属酵素の開発と触媒反応への応用をめざして研究を行った。その結果、二核銅酸化酵素であるチロシナーゼ、およびその各種変異体の還元型、メト型、酸化型の結晶構造と分光学的および磁気的特性の解明に成功した。さらに、触媒活性や、構造活性相関について系統的に検討し、効率的なフェノール類の触媒的酸化反応系を構築した。また、超好熱菌由来の金属結合タンパク質 TM1459を用いたZn、Cu、Ni、Co、Fe、Mn、Cr、V、Ru、Os含有人工金属酵素を合成し、過酸化水素などを酸化剤として用いた環境適合型触媒的酸化反応系の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)： In this study, novel artificial metalloenzymes have been developed using dicopper copper monooxygenase tyrosinase and metal-binding protein TM1459 from hyperthermophiles. The crystal structures of the deoxy-, met-, and oxy-forms of tyrosinase from *Aspergillus oryzae* and its mutants have been determined, and their spectroscopic and magnetic characteristics as well as the catalytic activity have been explored in detail. On the basis of those information, artificial dicopper enzymes have been developed for the catalytic phenol oxidation reactions. Furthermore, novel metalloenzymes containing several transition-metal ions such as Zn, Cu, Ni, Co, Fe, Mn, Cr, V, Ru, Os have been developed by using a simple metal-binding protein from *Thermotoga maritima*, and their crystal structures as well as the spectroscopic, magnetic properties and catalytic activity have been examined in detail.

研究分野：生物無機化学

キーワード：人工金属酵素 酸化酵素 遷移金属錯体 金属結合タンパク質 チロシナーゼ 超好熱菌 コウジ菌

1. 研究開始当初の背景

金属酵素の構造や機能改変に基づく新しい人工金属酵素触媒の開発は、生物無機化学や触媒化学の分野における新しい研究テーマとして、近年国内外において活発に研究が展開されている。しかし、これまでの研究では、活性中心に比較的剛直な構造を有するヘムタンパク質が主流であり、チロシナーゼのような非ヘム金属酵素の研究は少なかった。これは、非ヘムタンパク質にはヘム鉄のような強い吸収を有する発色団が存在しないことと、構造の柔軟性や多様性由来する制御の難しさが原因であった。しかし、各種モデル錯体を用いた最近の研究により、分光・磁気特性や反応性に関する詳細な情報が蓄積され、非ヘム金属酵素を利用した人工金属酵素の開発のための準備が整ってきた。

2. 研究の目的

本研究では、(1)二核銅酸化酵素であるチロシナーゼの金属活性部位に様々な変異を導入した新規な人工非ヘム二核金属酵素の開発と触媒反応への応用をめざした。また、(2)超好熱菌由来のシンプルな金属結合タンパク質(TM1459)を用い、様々な遷移金属(Zn、Cu、Ni、Co、Fe、Mn、Cr、V、Ru、Os)を導入した、新規な人工金属酵素を開発し、詳細な構造、分光学的・磁気的特性を明らかにすると共に、効率的な酸化反応触媒への応用を目的とした。

3. 研究の方法

(1)コウジ菌由来のアポ型チロシナーゼおよび各種変異体の大量発現系を構築し、それらに銅イオンを挿入した各種二核銅酸化酵素を調製した。得られた二核銅酸化酵素については、銅イオンの含有量をICP分析により決定するとともに、分光学的(紫外可視吸収スペクトルなど)および磁気的特性(EPR)について系統的に検討を加えた。さらに、単結晶X線結晶構造解析により、構造の詳細を明らかにし、構造と分光学的特性の相関関係について詳細に考察を行った。次に、還元剤存在下で、分子状酸素と反応させ、生成する活性酸素種の構造を単結晶X線構造解析により明らかにするとともに、分光学的特性(紫外可視吸収スペクトルや共鳴ラマンスペクトル)および磁気的特性(EPRスペクトル)について同様に検討した。さらに、酸素の結合挙動やフェノール類の酸化反応における触媒活性を検討し、構造-活性相関を明らかにし、新たな変異体のデザインへと応用した。この様な検討をくりかえして行い、更に活性の高い人工二核銅酵素の開発を行った。

(2)活性部位に4つのヒスチジン残基を有する(図1)超好熱菌由来の金属結合タンパク質TM1459の大量発現系を構築し、それらに第一遷移金属イオン(Zn、Cu、Ni、Co、Fe、Mn、Cr、V、Ru、Os)を導入し、ICP分析により金属の取り込み量を確認した。単離精製後、結

晶化を行い、単結晶X線構造解析により、結晶構造の詳細を明らかにした。次に、過酸化水素などを酸化剤として用い、アルコール、アミン、フェノール誘導体、オレフィンなどの触媒的酸化反応について系統的に検討し、ガスクロマトグラフやNMRを用いて生成物の同定、定量を行った。

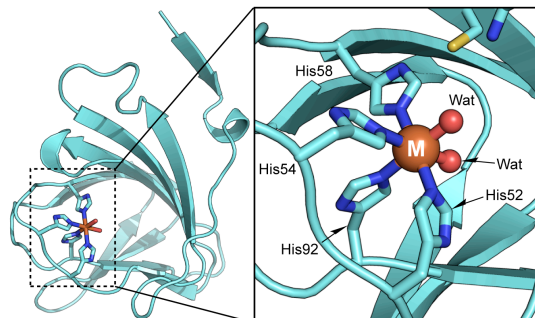


図1. TM1459タンパク質の金属結合部位

4. 研究成果

(1)の研究テーマに関しては、金属結合部位の第一配位圏および第二配位圏のアミノ酸残基を系統的に変化させた変異体を調製し、それらの酸素結合能やフェノール類の酸化反応における触媒活性、ならびにオキシ型(酸化型)の分光学的特性(紫外可視吸収スペクトル、共鳴ラマンスペクトルなど)を明らかにした。酸素結合能や触媒活性が認められたものについては、デオキシ型(還元型)、メト型(休止型)、およびオキシ型(酸化型)の高分解能結晶構造を決定し、構造と活性の相関関係を明らかにした(図2)。また、得られた構造情報を基にして、金属の取り込み機構や金属活性中心付近に生起する翻訳後化学修飾(システインとヒスチジン間の共有結合の形成)の機構を明らかにすることが出来た。更に、プロ型酵素から活性型酵素の生成機構についても検討し、C末端部位の役割や加水分解酵素による切断様式を明らかにした。得られた情報を基にして、さらに高い活性を有する人工二核銅金属酸化酵素の設計を行った。

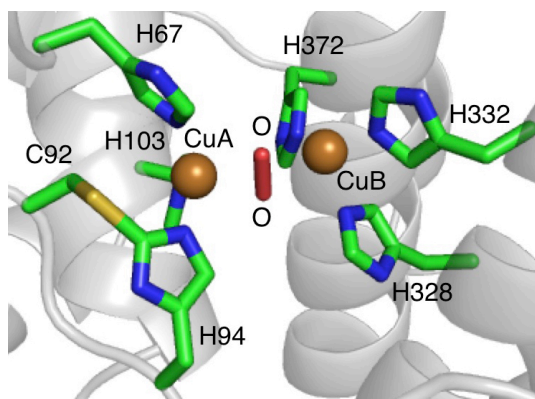


図2. オキシ型チロシナーゼの銅結合部位

(2)のテーマに関しては、超好熱菌由来の金属結合タンパク質 TM1459 への第一遷移金属導入法を確立すると共に、得られた金属タンパク質の高分解能 X線結晶構造を明らかにすることができた。その結果、金属結合中心の構造は、銅結合型タンパク質の場合、5配位四角錐型構造を示しているのに対して、それ以外の金属タンパク質 (Zn, Ni, Co, Fe, Mn, Cr, V, Ru, Os) では、6配位 8面体構造を有していることが判った (図3)。全ての場合において活性中心に存在する四つのヒスチジン残基は導入した金属に配位していることが確認できた。次に、得られた金属結合型タンパク質を用いて、過酸化水素を酸化剤とするアルコール、アミン、フェノール誘導体、オレフィンの触媒的酸化反応をスクリーニングした。その結果、特にマンガンやオスミウムを含む金属タンパク質が高い酸化活性を示した。特にオスミウムタンパク質を触媒とするオレフィンのジオール化反応では非常に高い触媒回転数が達成され、有機合成触媒としての応用の可能性を見いだした。得られた結果を基にして、構造と触媒活性の相関を明らかにすると共に、更に高活性触媒の開発を目指して、種々の変異体の設計を行った。

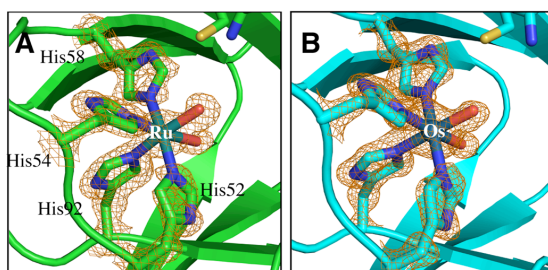


図3. Ru-TM1459 (A)、Os-TM1459 (B) タンパク質結晶構造

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)

- ① Activation Mechanism of *MelB* Tyrosinase from *Aspergillus oryzae* by Acidic Treatment. Nobutaka Fujieda, Michiaki Murata, Shintaro Yabuta, Takuya Ikeda, Chizu Shimokawa, Yukihiro Nakamura, Yoji Hata, Shinobu Itoh *J. Biol. Inorg. Chem.* **18** (1), 19-26 (2013). DOI: 10.1007/s00775-012-0945-5.
- ② Crystal Structures Of Copper-Depleted And Copper-Bound Fungal Pro-Tyrosinase: Insights Into Endogenous Cysteine-Dependent Copper Incorporation. Nobutaka Fujieda, Shintaro Yabuta, Takuya Ikeda, Takuji Oyama, Norifumi Muraki, Genji Kurisu, and Shinobu Itoh *J. Biol. Chem.* **288** (30), 22128-22140 (2013).

DOI: 10.1074/jbc.M113.477612

- ③ Redox Properties of Mononuclear Copper(II)-Superoxide Complex. Tetsuro Tano, Yuri Okubo, Atsushi Kunishita, Minoru Kubo, Hideki Sugimoto, Nobutaka Fujieda, Takashi Ogura, and Shinobu Itoh *Inorg. Chem.* **52** (18), 10431-10437 (2013). DOI: 10.1021/ic401261z
- ④ Geometric Control of Nuclearity in Copper(I)/Dioxygen Chemistry. Tsukasa Abe, Yuma Morimoto, Tetsuro Tano, Kaoru Mieda, Hideki Sugimoto, Nobutaka Fujieda, Takashi Ogura, and Shinobu Itoh *Inorg. Chem.* **53** (16), 8786-8794 (2014). DOI: 10.1021/ic501461n

[学会発表] (計18件)

- ① Mononuclear Copper Active Oxygen Complexes Relevant to the Reactive Intermediate Involved in Copper Monooxygenases (Invited Talk). Shinobu Itoh 16th International Conference of Biological Inorganic Chemistry (ICBIC16) Grenoble, France, July, 22-26, 2013.
- ② Oxygen Activation Chemistry at Mononuclear Copper Reaction Center (Invited talk). Shinobu Itoh The 4th Asian Conference on Coordination Chemistry (ACCC4), Jeju, South Korea, November 4-7, 2013.
- ③ Recent Advances in Copper-Dioxygen Chemistry (Invited Lecture). Shinobu Itoh Symposium on Modern Trends in Inorganic Chemistry-XV Indian Institute of Technology (IIT) Roorkee, Roorkee, India, December 13-16, 2013.
- ④ 金属酵素から探る酸素活性化のストラテジー (基調講演) 特別企画「分子活性化：生命化学から有機合成化学へのメッセージ」伊東 忍 日本化学会第93春季年会、立命館大学、南草津、平成25(2013)年3月25日
- ⑤ 菌体由来チロシナーゼの成熟過程の分子機構 (招待講演) 伊東 忍・藤枝伸宇・藪田真太郎・池田拓也 第13回蛋白質科学会年会、ワークショップ、鳥取、平成25年6月14日
- ⑥ C-H Bond Activation by Copper

Active-oxygen Complexes (Invited Lecture).
Shinobu Itoh
International Conference on Hydrogen Atom
Transfer (iCHAT 2014)
Rome, Italy, June 22-26, 2014.

- ⑦ Controlling Reactivity of Copper-Peroxide
Complexes (Invited Talk).
Shinobu Itoh
41th International Conference on
Coordination Chemistry (ICCC-41)
Suntec Singapore Convention & Exhibition
Center, Singapore, July 21-25, 2014.
- ⑧ Molecular Oxygen Activation by Copper
Proteins and Models (Plenary Lecture).
Shinobu Itoh
9th International Copper Meeting, Vivo
Equense, Italy, October 5-10, 2014.
- ⑨ Oxygen Activation at Mononuclear Copper
Reaction Center (Keynote Lecture).
Shinobu Itoh
7th Asian Biological Inorganic Chemistry
Conference (AsBIC7), Gold Coast, Australia,
November 30-December 5, 2014.
- ⑩ Developing Mononuclear Copper Reaction
Site for Oxygen Activation.
Shinobu Itoh
Gordon Research Conference (Metals in
Biology), Ventura, California, USA, January
25-30, 2015.
- ⑪ The Chemical Function of Bio-related Copper
Active-Oxygen Complexes (学術賞講演)
○ITOH, Shinobu
日本化学会第 95 春季年会 (2015)、日本大
学、平成 27 年 3 月 26 日～29 日

〔図書〕 (計 1 件)

- ① Fungal Pro-tyrosinase
Nobutaka Fujieda and Shinobu Itoh
*Handbook of Metalloproteins to the
Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic
Chemistry*, Huber, R.; Poulos, T.; Wieghardt,
K. Eds, John Wiley & Sons, UK, **2015**, in
press.

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊東 忍 (ITOH, Shinobu)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：30184659

(2) 連携研究者

杉本秀樹 (SUGIMOTO, Hideki)

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：00315970

(3) 連携研究者

藤枝伸宇 (FUJIEDA, Nobutaka)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：00452318