

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410072

研究課題名(和文) 微小疎水空間を有する金属酵素モデルの創製と反応性制御

研究課題名(英文) Construction and regulation of the reactivity of metalloenzyme models containing hydrophobic micro-space

研究代表者

岡村 高明 (OKAMURA, Taka-aki)

大阪大学・理学研究科・准教授

研究者番号：90252569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：金属蛋白質内の「微小疎水空間」をモデル化した金属錯体を合成し、様々な知見を得た。モリブデン・タングステン酵素モデルでは、疎水空間内への基質の効率的な取り込みにより反応を加速させ、反応性の低い基質の還元、水溶性ミセル中での微小疎水空間の導入に成功し、非極性溶媒中での特異な反応性を明らかにした。非極性溶媒に可溶性マグネシウム含有ホスファターゼモデルでは水素結合の切り替えによる反応性制御を達成した。[4Fe4S]骨格を持つフェレドキシンモデルでは、疎水空間とNH...S水素結合により、クラスター構造や電子状態を制御できる事を示した。

研究成果の概要(英文)：Model complexes of metalloproteins containing "hydrophobic micro-space" were synthesized and their properties were investigated. Molybdenum- and tungsten-enzyme models showed enhancement of the oxygen-atom-transfer reaction of trimethylamine N-oxide or dimethyl sulfoxide by efficient uptake of the substrate into the active site in hydrophobic environment. Modeling of the hydrophobic microenvironment of water-soluble molybdenum enzyme in an aqueous micellar solution was successfully achieved. Unexpected reaction promoted by hydrogen bond in nonpolar solvents was observed. The regulation the hydrolytic activity of magnesium-containing phosphatase models by switching the mode of NH...O hydrogen bond was accomplished in nonpolar solvents. The combination of the hydrophobic space and NH...S hydrogen bonds also regulated the electronic structure of [4Fe4S] cluster in a ferredoxin model.

研究分野：化学

キーワード：生物無機化学 酵素 モデル 疎水空間 水素結合 鉄-硫黄クラスター モリブデン マグネシウム

1. 研究開始当初の背景

金属酵素あるいは金属蛋白質は、反応を行う活性中心の大きさに比べて分子量が高く、活性部位を取り囲む蛋白質が酵素活性や活性中心の安定化に必要不可欠である事は疑う余地が無い。蛋白質は適切なアミノ酸配列により特異な反応場を形成し、高活性な金属中心の安定化、基質の取り込み、三次元的な非対称空間による認識、電子伝達、各反応中間体の多段階的制御を行う事で高活性、高選択的な反応を実現していると考えられる。近年の遺伝子工学、蛋白質工学の目覚ましい発展により蛋白質を利用した様々な基質の反応が提案され達成されてきている。一方で、このような酵素活性部位を合成化学的手法で再創製する事は多くの困難を伴い、活性中心のみを錯体化学的手法で再現しても活性面では酵素に到底及ばないのが現状と言える。

2. 研究の目的

研究代表者は、予てより金属酵素活性中心周りの環境に着目し、研究を行ってきた。水溶性の金属蛋白質であっても活性中心は疎水的なアミノ酸残基に囲まれ、基質などの分子認識や結合、水素結合や静電相互作用など弱い相互作用が効果的に働く反応場を形成している。本研究では、これを「微小疎水空間」と呼ぶ。図1には、モリブデン酵素のうちジメチルスルホキシド還元酵素(DMSOR)ファミリーおよびタングステン酵素に共通する活性中心構造の概念図を示した。このような微小疎水空間は、極性分子が金属中心に接近、配位することや、結合の解離など分極を伴う構造変化を制御することで、反応中間体である配位不飽和あるいは歪んだ高活性な活性部位を安定化していると考えられる。実際、低極性溶媒中では配位子の解離を伴う分解反応は抑制され、水素結合は安定に形成される。本研究の目的は、(1)微小疎水空間内で反応性を効果的に制御し、高活性な金属モデルを構築すること、(2)極性溶媒中では合成困難な酵素活性部位モデルを微小疎水空間内(疎水的反応場)で活性状態を保ったまま安定化し、単離する事である。

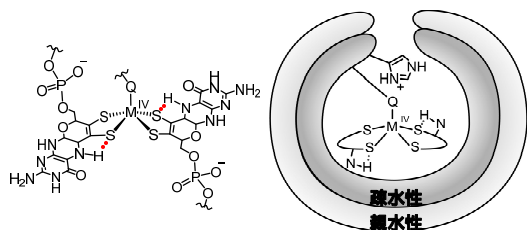


図1. モリブデン・タングステン酵素活性部位の構造(左図、M = Mo, W; Q = O, S, Se)と酵素全体の概念図。但し、イミダゾールは必須では無い。

3. 研究の方法

微小疎水空間の構築および反応性制御のために非常に嵩高い疎水基と分子内 NH...X (X = O, S)水素結合を有する配位子を用いる。NH

...X 水素結合については研究代表者が長年に亘り研究し、多くの知見を得ている。本研究では、従来の基本骨格を用い、嵩高いトリス(4-*t*-ブチルフェニル)アセチルアミノ基を導入することで非極性溶媒への可溶化と分子内水素結合の形成を達成する(図2)。

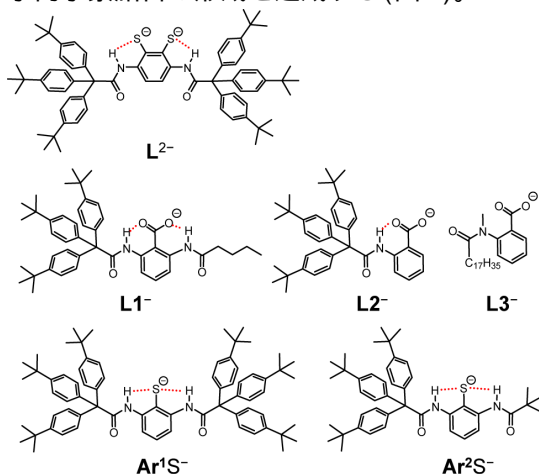


図2. 本研究で用いた非極性溶媒に可溶性配位子。点線は水素結合を示す。

4. 研究成果

(1)微小疎水空間を持つモリブデン・タングステン酵素モデルの合成

嵩高い疎水性置換基(Ar₃CCONH)を導入する事で、トルエンのような非極性溶媒への可溶化に成功した。従来、モデル錯体の溶解度の低さのため極性溶媒である *N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF)中での反応が報告されているが、テトラヒドロフラン(THF)、トルエン、と順に極性を下げて基質との反応を調べると反応速度で1桁以上の加速が見られた。

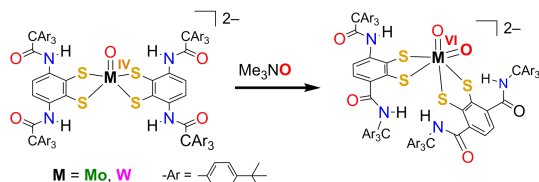


図3. アミン *N*-オキシド還元酵素のモデル反応

(2)微小疎水空間による基質の効率的な取り込みと還元反応

さらに酵素に近いデソキソモリブデン(IV)錯体[Mo^{IV}(OSi^tBuPh₂)(L₂)]を合成し、トルエン中で Me₃NO との反応を調べたところ、極めて速やかに酸素原子移動反応が定量的に進行し、対応するモノオキシモリブデン(VI)錯体を与えた。また、DMSOR の本来の基質である Me₂SO(DMSO)の還元にも成功した。これは微小疎水空間内の金属活性中心がトルエンのような非極性溶媒中の DMSO を効率的に取り込んだ結果だと解釈でき、DMSOR の活性部位周りの疎水的環境の重要性を改めて示した。

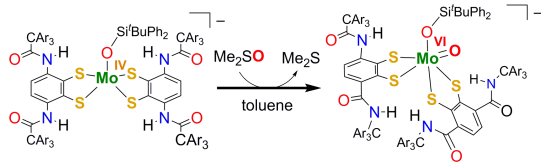


図4. トルエン中で再現された DMSOR モデル反応

(3)水中で微小疎水空間を有する水溶性モリブデン酵素のモデル化

中性のミセル化剤トリトン X-100 を用いて、微小疎水空間を持つモリブデン酵素モデル錯体を水溶性ミセル中に可溶化した。還元剤として、生体内で用いられている NADH の類似体であるニコチンアミド誘導体を用い、水系でアミン N-オキシドの触媒的還元成功した。重水を用いた反応速度解析により、水によるオキシ配位子へのプロトン化が律速過程であることが示された。

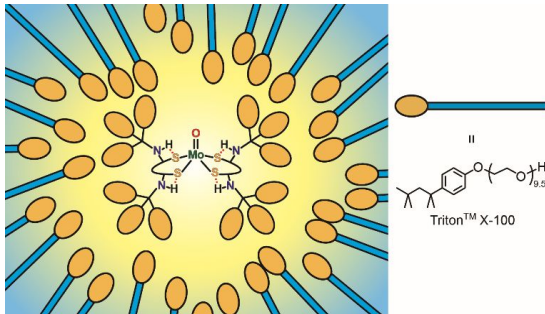


図5. 水溶性ミセル中でモデル化された水溶性モリブデン酵素中の微小疎水空間の模式図。黄色は疎水性、水色は親水性を示す。

(4)微小疎水空間で形成される強い NH⁺...O=Mo 水素結合で誘起される反応性

モリブデン酵素内の近傍のプロトン (図1) の役割を明らかにするため、錯体の対カチオンをプロトン化したトリエチルアンモニウムカチオン (Et₃NH⁺) に変えたモデル錯体を合成した。THF やアセトニトリルのような極性溶媒中では、4 価の錯体として安定に存在し、Me₃NO を還元して、2 電子酸化された 6 価の錯体を与えた (図6 左)。しかし、トルエン中では速やかに 1 電子酸化され、5 価を生じた。ピリジニウムカチオンを対カチオンに持つ場合は、トルエンに溶解させるだけで 1 電子移動反応が進行した (図6 右)。この予想外の結果は、酵素内の疎水空間内で形成される NH⁺...O=Mo が金属中心の電子状態や触媒

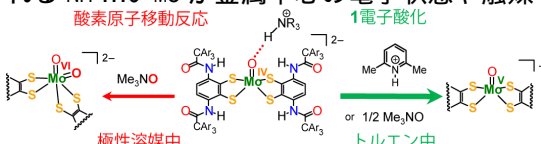


図6. トルエン中の強い NH⁺...O=Mo 水素結合で誘起された 1 電子酸化反応と通常の酸素原子移動反応。

サイクルに影響を与えている事を示唆する。

(5)モリブデン・タングステン酵素モデル錯体の比較研究による酵素の進化に関する考察

同族元素であるモリブデンとタングステンの比較研究は、酵素活性の違いが生じる原因や進化の過程を考察する上で意義深い。研究代表者らが独自に開発した分子内 NH...S 水素結合を 2 つ持つモデル錯体を系統的に合成し比較した。タングステンに比べ配位子の解離が容易で酸素配位を好むという錯体化学的な特徴は、現存するタングステン酵素とモリブデン酵素の進化の過程を考察する上で有効である。例えば、真核生物中のモリブデン酵素は DMSOR ファミリーに見られるようなジチオレン配位子が 1 つしか存在せず、代わりに酸素原子が配位している。類似モデル錯体同士で水素結合の強さと酸化還元電位への影響を比較すると、タングステン錯体の方が形成される水素結合の強さは見かけ上弱い、効果は大きい事が明らかとなった (図7)。この結果から、進化の過程でタングステンからモリブデンへの置換反応が起こったとしても、NH...S 水素結合存在下では、あまり活性を低下させる事が無かったのではないかと推測できる。

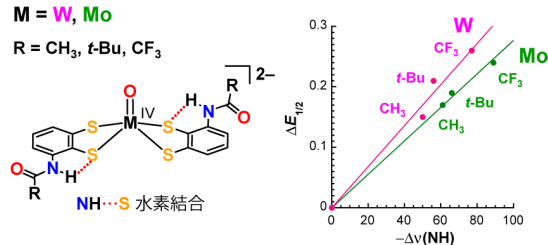


図7. NH...S 水素結合の強さ (-Δv(NH)) と M^{IV}/M^V の酸化還元電位の無置換体からのシフト値の関係。

(6)非極性溶媒に可溶なマグネシウム含有ホスファターゼモデルの合成

従来のマグネシウムカルボキシラート錯体は非極性溶媒に難溶である。極性溶媒に溶解できたとしても、配位子は既に解離してマグネシウムカチオンは溶媒和した状態にあり、錯体の溶液構造や反応について、調べる事は不可能であった。本研究で作成した錯体は、トルエンに可溶であり溶液構造の議論を可能にした。また、水素結合がリン酸エステルの加水分解反応に与える影響をはじめ明らかにした。興味深い事に NH...O 水素結合が配位酸素原子に形成されると反応性は低下し、非配位酸素原子のみに水素結合した場合は反応が加速する事を見出した。これは、マグネシウム含有ホスファターゼが水素結合の切り替えにより、反応性を自由に制御できる事を示している。また、亜鉛置換体では、

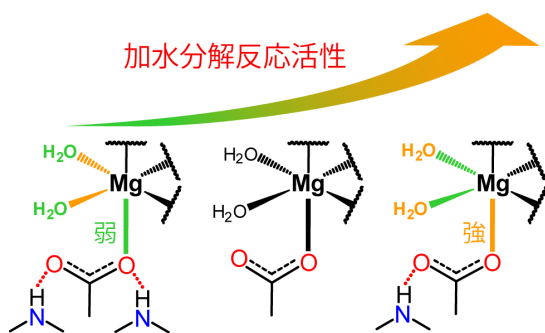


図 8. 水素結合の切り替えによるエステル加水分解反応活性の変化。

水素結合の様式や有無による反応性の差は減少し、酵素がマグネシウムイオンを利用している必然性を示唆している。

(7)チオラートのヨウ素酸化反応中間体の NH...S 水素結合水素結合による安定化

一般的にチオラートはヨウ素酸化によりジスルフィドを与える。嵩高いチオラートの場合、立体障害により中間体のヨウ化スルフェニル(図9では Ar¹S-I)の段階で単離できる事が知られていた。本研究課題を推進する中で、偶然にも NH...S 水素結合がチオラートとヨウ素の反応直後の中間体を安定化し、結晶として単離できる事を見出した。

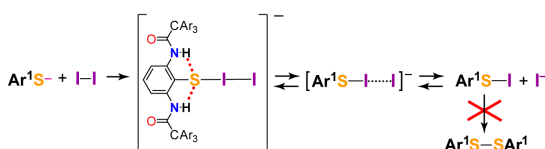


図 9. NH...S 水素結合により安定化された反応中間体。ヨウ化スルフェニルがジスルフィドに変換されないのは、立体障害に因る。

(8)微小疎水空間と NH...S 水素結合がもたらすフェレドキシン - HiPIP の構造変換

鉄 - 硫黄クラスターのうち、キューバン型の [4Fe4S] 骨格を持つものは、以前から [Fe₄S₄]^{2+/+} の酸化還元状態をとるフェレドキシンと [Fe₄S₄]^{3+/2+} の酸化還元状態をとる高電位鉄 - 硫黄蛋白質 (HiPIP) が知られている。その違いは NH...S 水素結合の数、クラスター周辺の疎水的環境などが原因だと言われてきているが、これまで報告された低分子モデル錯体を見ると、電子供与性の嵩高い置換基を導入した場合にのみ HiPIP 型が得られるものの、一般的にはフェレドキシン型として単離されている。一方で、金属蛋白質ではアミノ酸配列の相違はあるが、何れもシステイン残基由来のチオラートが配位しており、モデル錯体のような電子供与性の置換基は存在せず、現在でもフェレドキシンと HiPIP の差を決定づける原因については議論がなされている。

研究代表者は、以前に分子内 NH...S 水素結

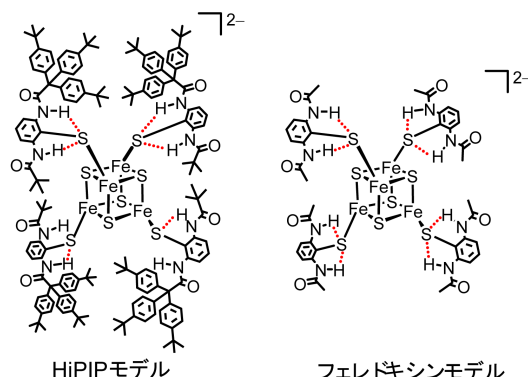


図 10. 本研究で合成した HiPIP モデルと従来のフェレドキシンモデル¹。

合を有するフェレドキシンモデル錯体を報告している(図 10 右)¹。本研究で合成したモデル錯体の配位子は、Ar²S⁻であり、フェレドキシンモデル錯体と末端のメチル基が嵩高い疎水基 Ar₃C に変換された以外は基本的に同一である。しかし、本研究で合成した錯体は、THF より極性の高い溶媒中で配位子の解離を伴い分解し、結晶構造ではクラスター骨格は天然のフェレドキシンより HiPIP に近く、NH...S 結合の一部の切断も観測された。また、酸化還元電位はフェレドキシンモデル錯体に比べ負側に観測された。これは、電子供与性基による直接的な置換基効果では説明がつかず、置換基により形成された疎水的環境と立体障害が原因だと結論される。つまり、クラスター周辺に疎水的環境を形成し、立体障害などの歪みや水素結合の数によりクラスターの電子状態を制御する事で、天然のフェレドキシンから HiPIP へと変換できる事をモデル錯体により示した。

<引用文献>

N. Ueyama, Y. Yamada, T. Okamura, S. Kimura, A. Nakamura, *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 6473-6484.

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18件)

T. Okamura and S. Seno, Strategic Construction of Chiral Helices: Expanded Poly(L-leucine) Containing *p*-Phenylene Moieties, *Macromolecules*, **2017**, *50*, 3500-3509. 査読有、DOI: 10.1021/acs.macromol.7b00718

T. Okamura, T. Kaga, S. Yamashita, R. Furuya, and K. Onitsuka, Snapshot of Oxidation of Thiolate by Diiodine: Stabilization of Intermediate by NH...S Hydrogen Bonds, *J. Org. Chem.*, **2017**, *82*, 2187-2192. 査読有、DOI: 10.1021/acs.joc.7b00160

T. Okamura, Y. Omi, Y. Hirano, and K. Onitsuka, Comparative studies on the contribution of $\text{NH}\cdots\text{S}$ hydrogen bonds in tungsten and molybdenum benzenedithiolate complexes, *Dalton Trans.*, **2016**, 45, 15651-15659. 査読有、DOI: 10.1039/c6dt02250b

T. Okamura, T. Yamada, Y. Hasenaka, S. Yamashita, and K. Onitsuka, Unexpected Reaction Promoted by $\text{NH}^+\cdots\text{O}=\text{Mo}$ Hydrogen Bonds in Nonpolar Solvents, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2016**, 2016, 2952-2961. 査読有、DOI: 10.1002/ejic.201600081

T. Okamura, Y. Omi, M. Fujii, M. Tatsumi, and K. Onitsuka, Significant differences of monooxotungsten(IV) and dioxotungsten(VI) benzenedithiolates containing two intramolecular $\text{NH}\cdots\text{S}$ hydrogen bonds from molybdenum analogues, *Dalton Trans.*, **2016**, 44, 18090-18100. 査読有、DOI: 10.1039/c5dt03278d

Y. Hasenaka, T. Okamura, and K. Onitsuka, Modeling of the hydrophobic microenvironment of water-soluble molybdoenzymes in an aqueous micellar solution, *Dalton Trans.*, **2015**, 44, 12618-12622. 査読有、DOI: 10.1039/c5dt01112d

T. Okamura, R. Furuya, and K. Onitsuka, Synthesis and structures of soluble magnesium and zinc carboxylates containing intramolecular $\text{NH}\cdots\text{O}$ hydrogen bonds in nonpolar solvents, *Dalton Trans.*, **2015**, 44, 7512-7523. 査読有、DOI: 10.1039/c5dt00053j

Y. Hasenaka, T. Okamura, and K. Onitsuka, Efficient uptake of dimethyl sulfoxide by the desoxomolybdenum(IV) dithiolate complex containing bulky hydrophobic groups, *Dalton Trans.*, **2015**, 44, 6260-6267. 査読有、DOI: 10.1039/c5dt00075k

T. Okamura, R. Furuya, and K. Onitsuka, Regulation of the Hydrolytic Activity of Mg^{2+} -Dependent Phosphatase Models by Intramolecular $\text{NH}\cdots\text{O}$ Hydrogen Bonds, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 14639-14641. 査読有、DOI: 10.1021/ja509006x

Y. Hasenaka, T. Okamura, M. Tatsumi, N. Inazumi, and K. Onitsuka, *Dalton Trans.*, **2014**, 43, 15491-15502. 査読有、DOI: 10.1039/c4dt01646g

〔学会発表〕(計 7件)

加賀 俊久、岡村 高明、鬼塚 清孝、非極性溶媒に可溶性亜硫酸オキシダーゼモデル錯体の合成、日本化学会第 97 春季年会(2017)、2017.3.17、慶應義塾大学日吉キャンパス(神奈川県横浜市)

中森 祐未、岡村 高明、鬼塚 清孝、かさ高いアシルアミノ基を持つアレーンチオラートが配位した鉄-硫黄クラスターの交換反応、錯体化学会第 66 回討論会、2016.9.11、福岡大学七隈キャンパス(福岡市城南区)

中森 祐未、岡村 高明、鬼塚 清孝、かさ高いアシルアミノ基を持つアレーンチオラート配位に覆われた[4Fe-4S]クラスターの溶液構造と反応性、日本化学会第 96 春季年会(2016)、2016.3.26、同志社大学京田辺キャンパス(京田辺市)

中森 祐未・山下 聡史・岡村 高明・鬼塚 清孝、非常にかさ高いアシルアミノ基を持つアレーンチオラート配位を用いた[4Fe-4S]クラスターの合成、錯体化学会第 65 回討論会、2015.9.22、奈良女子大学(奈良市)

長谷中 祐輝、岡村 高明、鬼塚 清孝、水溶性金属酵素のモデル化を目指した微小疎水空間を有するミセル型モリブデン錯体の合成、第 63 回高分子討論会、2014.9.25、長崎大学文教キャンパス(長崎市)

山下 聡史、古屋 遼介、岡村 高明、鬼塚 清孝、非常に嵩高いアシルアミノ基を持つビス(アレーンチオラート)金属錯体の合成と構造、錯体化学会第 64 回討論会、2014.9.19、中央大学後楽園キャンパス(東京都文京区)

長谷中 祐輝、岡村 高明、鬼塚 清孝、ミセル中微小疎水空間を有するモリブデン錯体による水溶性金属酵素のモデル化、第 63 回高分子年次大会、2014.5.29、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

〔図書〕(計 1件)

T. Okamura, Polyethylene (PE; Low Density and High Density) in *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2015**, pp 1826-1829.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 高明 (OKAMURA, Taka-aki)
大阪大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号: 90252569

