

研 究 報 告 書

「低級アルカンの物質変換を司る人工酵素の論理的開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 12 月～2019 年 3 月

研 究 者: 大洞 光司

1. 研究のねらい

近年、天然ガス、特に多く含まれるメタンの利用は、持続可能社会を実現する上で必須である。しかしながら、メタンの化成品原料への直接変換法の開発は未だ途上段階である。これは反応性の低さに伴い、選択的に目的の化合物に変換することが大変困難なためである。メタンに加えて、低級アルカン等を化学産業の原料として効率的に活用する分子触媒、不均一系触媒等の開発についても高効率化や高選択性実現に向けた改善が必要である。近年これらの有力な候補として、高活性高選択的な触媒の開発をめざした人工金属酵素の研究が盛んに行われている。非常にユニークな性質が見いだされているが、貴金属を使用する系が多く、また反応もオレフィンやカルボニルの水素化、Diels-Alder 反応など立体選択性等は高いものの、メタンを含む低級アルカンの活性化に比べると平易な反応の報告例のみである。一方で、本研究者はこれまでに補因子である金属錯体、ヘムを人工金属錯体により置換したヘムタンパク質を用いてエチルベンゼンの C-H 結合活性化を含む触媒的水酸化反応を実施してきた。この人工酵素は、活性中心である金属錯体の最適化と理論化学に基づくタンパク質マトリクスへの基質結合部位の導入により、低級アルカン(メタン、エタン、プロパン等)の物質変換に適応可能であると考えた。本研究課題では、想定される反応機構に基づいて、錯体化学の知識と技術を駆使して合成化学的に活性中心を作り込み、反応場となるタンパク質にメタン等の基質の認識・結合サイトを理論化学に基づいて設計し、遺伝子工学的に構築し、高活性で高選択的な人工酵素を創製する。また単純な触媒能の評価だけではなく、活性種の同定や反応性の評価にも積極的に焦点を当て、多角的に触媒能の向上を試みる。金属オキソ種を活性種とする C-H 結合水酸化に基づいて、困難なメタンを含む低級アルカンの物質変換の達成をねらい、金属ポルフィリノイド錯体のみでは実現することが難しい高い活性や選択性を、タンパク質が形成する反応場の作り込みによりめざす。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究課題では、低級アルカン(メタン、エタン、プロパン等)の物質変換に向けて、金属錯体とタンパク質を組み合わせた人工酵素の開発を実施した。人工酵素は、ヘムタンパク質における天然補因子として含まれる金属錯体であるヘム(ポルフィリン鉄錯体)を、人工的に合成した金属錯体に置換し、調製した(図 1)。まず、種々のポルフィリン類縁体の金属錯体を合成し、タンパク質に挿入し、実際に過酸化水素を末端酸化剤とするエチルベンゼンを基質とした水酸化反応を評価した。結果として、ポルフィリンの構造異性体であるポルフィセンのマンガニン錯体がタンパク質内で高い触媒能を示すことが明らかになった。次にさらに困難な反応で

あるヘキサンやプロパンの水酸化を試みた。天然のミオグロビンをマトリクスとする系では、触媒回転数は 1 程度であったが、適切な変異の導入により、10 倍以上の触媒能の向上が確認された。またヘキサンにおいては過剰酸化による副生成物は全く観測されず、タンパク質反応場における立体障壁的な効果と反応場の疎水的環境により選択性が実現されていることを確認した。またエタンの触媒的水酸化を確認し、末端の C-H 結合が水酸化可能であることを示した。

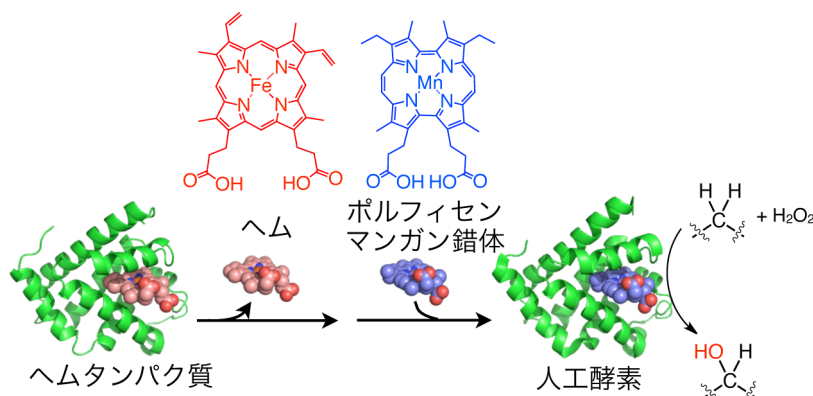


図 1. 本研究における人工酵素の調製の概念図

人工酵素の作用機序の解明とさらなる改良を目的として、活性種の同定と評価を試みた。溶液の急速混合により過渡的な化学種の変化が追跡可能であるストップフロー法を用いて、評価を行った。人工酵素に有機過酸を加えると、吸収スペクトルが変化し、活性種が約 2 秒で生成することを明らかにした。この活性種が Mn の高原子価種(Mn(V))であることを電子スピン共鳴法により確認し、さらにこの活性種と基質の反応を詳細に評価し、反応速度が基質の C-H 結合の強さに依存していることを明らかにし、C-H 結合の活性化が律速段階の一つであることを示した。

本系と類似の人工酵素であるポルフィセン鉄錯体を含むミオグロビンが、低級アルカンの物質変換ではないが、オレフィンのシクロプロパン化反応に有効であることを示し、活性種の評価と理論計算を含めてその作用機序を明らかにした。

上記のように、人工金属錯体を用いたヘムタンパク質の補因子置換により開発した人工酵素について、変異導入により C-H 結合水酸化の触媒能の向上を達成し、その活性種の同定と直接的な反応性評価に成功した。

(2) 詳細

研究テーマ A「活性中心となる人工金属錯体の合成と最適化」

ヘムタンパク質を基盤とした人工酵素の構築に向けて、天然ヘム(ポルフィリンの鉄錯体)と置換する人工金属錯体を設計した。ポルフィリノイドとしてポルフィセン、コロール、テトラデヒドロコリンを選択し、これらの鉄、マンガン、コバルト、ニッケル等の錯体をそれぞれ調製し、各種分光法により同定した。また一部は結晶構造解析により構造も明らかにしている。予備的にヘムタンパク質であるミオグロビンと複合化し、活性を調査した。結果として、合成した金属錯体の中では、ポルフィセンのマンガン錯体のみがアルカン類の物質変換に活性を示した。この錯体を研究テーマ B において、タンパク質側の最適化と合わせて、人工酵素として触媒能向上を試みた。

また、アルカン類の物質変換に活性がない場合でも他の反応に応用可能であることがわかったため、タンパク質と組み合わせた人工酵素として、あるいは錯体単体のみで他の触媒能の評価も実施した。具体的な例として、前者は、ポルフィセン鉄錯体がミオグロビン中でオレフィンのシクロプロパン化反応に対して活性な触媒として機能することを示し、後者は、コロールやテトラデヒドロコリンのコバルト錯体が電極触媒として中性条件における水素発生や二酸化炭素の一酸化炭素への還元に有用であることを示した。

研究テーマ B「タンパク質マトリクスへの変異導入による人工酵素の最適化」

ヘムタンパク質として主にミオグロビンを用いて、天然補因子であるヘムを人工金属錯体に置換し、人工酵素を調製した(概要内の図1参照)。人工金属錯体としてはポルフィセンのマンガン錯体においてのみ触媒活性が確認されたので、以後、この人工酵素においてのみ最適化を実施した。最適化に先立って、変異を導入していない天然のミオグロビンを基盤とした人工酵素の結晶を作成し、高分解能で構造を明らかにした。この構造をベースに変異体の設計を行った。人工酵素の変異体を複数作成し、過酸化水素を末端酸化剤とするアルカン類の水酸化触媒能の評価を実施した。研究期間の早い段階で、ガス状アルカンを含めたアルカン類の酸化生成物のガスクロマトグラフィ(FID 検出器)及びイオンクロマトグラフィによる微量の定量法を確立した。また反応系についても、当初は常温常圧を狙いの一つとしていたが、圧力をかけること、水溶媒で用いる温度であれば加温も工業的には全く問題がないため、オートクレーブを用いて、種々の温度条件下で触媒能の評価を実施した。結果として、数十種類の変異体を試行したが、ヘム結合部位近傍のアミノ酸の立体障害等を考慮して作成した変異体は触媒能を向上させる結果が得られた。分子動力学計算による構造予測やドッキングシミュレーションから基質のアクセスが改善されていることが示唆されている。最終的に、ヘキサンでは変異導入前の人工酵素の 13 倍の触媒回転数を示し、過剰の酸化生成物は確認されず、2-ヘキサノールおよび 3-ヘキサノールのみを与えた。また基質にヘキサノールを用いた場合もケトン等の生成物は検出されなかった。さらにモデル基質として、2-メチルペンタンの酸化反応を実施したところ、反応性から予想される 3 級ではなく 2 級アルコールが主生成物(>95 %)として得られた。このことから、立体的要因が大きく効いて、さらに補助的にタンパク質が疎水性の反応場として機能し、選択性が発現していることが予想される。またプロパンやエタンについても加圧条件下において、水酸化反応が進行することを予備的に確認しており、構造および条件を最適化した人工酵素は初期の人工酵素の 10 倍以上の活性を示した。これらの結果から、本研究の人工酵素が末端 C-H 結合の水酸化触媒能を示すことが明らかになった。

研究テーマ C「活性種の同定と反応性の評価」

ミオグロビンとポルフィセンのマンガン錯体を組み合わせた人工酵素について、触媒メカニズム解明の観点から、活性種の同定を試みた(図2)。急速な2種以上の溶液の混合により過渡的な化学種の変化が追跡可能であるストップフロー法を用いて、評価を行った。人工酵素に有機過酸として過安息香酸を加えると、吸収スペクトルが変化し、活性種が約 2 秒で生成し、基質等の非存在下で数十秒の寿命を持つことを明らかにした。この活性種が Mn の高原子価種(Mn(V))であることを perpendicular mode および parallel mode の電子スピン共鳴法によ

り確認した。さらにストップフロー法において、この生成した活性種に、水溶性の高いエチルベンゼン、トルエン、シクロヘキサンのスルホン酸ナトリウム誘導体をモデル基質として添加し、反応性を評価した。活性種の吸収スペクトルが過酸と反応前のスペクトルに戻ることを確認し、擬一次反応として反応速度定数を決定し、基質の濃度との相関から二次速度定数を決定した。またその二次速度定数が基質の C-H 結合の強さに依存していることを示し、C-H 結合の活性化が本系の律速段階の一つであることは明らかになった。また変異導入により触媒能を向上させた人工酵素について、同様に活性種の反応性評価を行ったところ、この活性種と基質の反応速度の向上が確認された。このことから、単純に触媒の耐久性が上がり、触媒回転数が向上したわけではなく、活性種自身の反応性あるいは基質のアクセスが改善され、触媒回転数が向上したことが明らかになった。

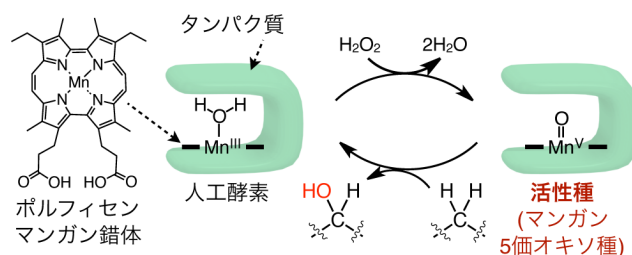


図 2. 活性種評価から考察される水酸化反応の触媒メカニズム

上記の通り、適切な人工金属錯体とタンパク質マトリクスを組み合わせることで、高難度な末端 C-H 結合を含むアルカンの触媒的水酸化を達成した。また活性種の反応性を通じて、金属オキシ種を経由して触媒反応が進行していることを明らかにした。

3. 今後の展開

本研究課題において、適切な金属錯体とタンパク質マトリクスを組み合わせることで、論理的に人工酵素を構築可能であることを示した。本系は、天然酵素のような基質特異性は見られず、様々な基質に適用でき、比較的小さなタンパク質マトリクスで触媒能が発現できることに特徴がある。しかしながら、特定の基質に最適化された天然の酵素に比べると触媒活性は低く、さらなるタンパク質マトリクスの探索と作り込みが必要である。現在、末端酸化剤は過酸化水素を用いているが、今後は酸素等の安価な酸化剤での駆動へと展開したい。また目的とする触媒反応と競合して触媒の分解が起こっていることも解決すべき問題であり、その過程を明らかにし、耐久性の高い人工酵素へ改善する必要がある。これらを多角的に、論理的に解決し、実際に活用できる人工酵素の開発を精力的にめざしたい。

4. 自己評価

本研究課題において、当初エチルベンゼンしか触媒的に水酸化できない人工酵素を、適切な変異の導入により、1000 倍以上反応性の低いアルカンの末端 C-H 結合の触媒的水酸化が達成できた点は非常に大きな研究の進展であったと実感している。自身の掲げた戦略に基づいて、本研究における人工酵素が最終目標であるメタンの水酸化に向けて着実に近づいていると自負している。また天然の酵素では評価が難しい活性種についても同定と反応性の評価を達成でき、人工酵素の優位性を示すことができた。さきがけの領域会議や CREST との交流会では領域アドバイザーをはじめ同じ目標に向かって進む研究者から多数の助言が得られ、

単独で研究を進めていては得られない発想や情報が得られ、研究の進捗に大きく影響した。研究期間中、2名の大学院生の補助を受けて、また領域内外にかかわらず共同研究として、様々な実験を試行し、本課題に取り組むことができた。また予算は、追加支援を含めて、これまで挑戦できなかった多数の錯体合成および変異体作成や高圧条件下での反応、極低温での分光測定など、徹底的に触媒能の向上と活性種評価のために使用することができた。本成果の一部に関して、講演旅行を行い、北米の5つの大学の本研究に関連のある研究者を訪問し、セミナーと議論を行い、人工酵素開発に関して重要な知見を得た。本課題で得られた研究成果は、科学技術の発展に向けて、非天然の金属錯体が人工酵素の構築を可能にする点で非常に意義があり、これまで天然酵素の変異導入、つまり天然の多様性の中での酵素の改変に加えて、天然を超えた多様性により、さらなる高活性高選択的な人工酵素の開発への展開が期待できる。社会・経済について、基質の特異性を示さない論理的に設計可能な人工酵素は、本課題でめざした低級アルカンの選択的な水酸化だけでなく、医薬品等の付加価値の高い化合物合成へ応用でき、ライフサイエンスの観点から還元できる。また得られた知見は触媒のみではなく、タンパク質の自在設計に基づく材料の開発等へ、広く応用可能であると考えられる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Koji Oohora, Hiroyuki Meichin, Yushi Kihira, Hiroshi Sugimoto, Yoshitsugu Shiro, Takashi Hayashi, Manganese(V) Porphycene Complex Responsible for Inert C-H Bond Hydroxylation in a Myoglobin Matrix, *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139 (51), 18460–18463.
2. Koji Oohora, Hiroyuki Meichin, Liming Zhao, Matthew W. Wolf, Akira Nakayama, Jun-ya Hasegawa, Nicolai Lehnert, Takashi Hayashi, Catalytic Cyclopropanation by Myoglobin Reconstituted with Iron Porphycene: Acceleration of Catalysis due to Rapid Formation of the Carbene Species, *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139 (51), 17265–17268.
3. Yoshitsugu Morita, Koji Oohora, Akiyoshi Sawada, Takashi Kamachi, Kazunari Yoshizawa, Takashi Hayashi, Redox Potentials of Cobalt Corrinoids with Axial Ligands Correlate with Heterolytic Co-C Bond Dissociation Energies, *Inorganic Chemistry*, 2017, 56(4), 1950–1955.
4. Tsuyoshi Mashima, Koji Oohora, Takashi Hayashi, Substitution of an Amino Acid Residue Axially Coordinating to the Heme Molecule in Hexameric Tyrosine-coordinated Hemoprotein to Enhance Peroxidase Activity, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2017, 21(12), 824–831.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 学会発表

Koji Oohora, Kosuke Nitta, Natsuno Chiba, Tomoya Tanaka, Takashi Hayashi "Manganese

Porphycene in a Myoglobin Matrix toward a Model of Cytochrome P450” ICC2018, (仙台国際センター、宮城) 2018 年 7 月 31 日、口頭発表

2. 学会発表

Koji Oohora, Tang Ning, Yoshitsugu Morita, Takashi Hayashi, “Hemoproteins reconstituted with synthetic cobalt corrinoid toward models of vitamin B₁₂-dependent enzymes” ICPP10, (Westin Grand in Munich, Germany) 2018 年 7 月 3 日、招待講演

3. 学会発表

Koji Oohora, Kosuke Nitta, Natsuno Chiba, Takashi Hayashi “Hemoprotein Engineered with Manganese Porphycene toward Artificial Monooxygenase” International Conference on Molecular System Engineering (University of Basel, Basel) 2017 年 8 月 29 日、口頭発表

4. 学会発表

Koji Oohora, Kosuke Nitta, Natsuno Chiba, Takashi Hayashi “Hemoprotein reconstituted with a manganese porphycene complex toward catalytic hydroxylation of inert C-H bonds” 14th International Conference on Applied Inorganic Chemistry (Centre d’Enseignement et de Congrès Hôpital Pierre Paul Riquet, Toulouse) 2017 年 6 月 3 日、口頭発表

5. 受賞

PCCP Prize 2019, 大洞 光司、Hemoprotein Engineering by Chemical Modification toward Biomaterials and Artificial Enzymes

6. プレスリリース発表:

2017 年 12 月 15 日 大阪大学、科学技術振興機構(JST)、兵庫県立大および理化学研究所における共同発表「安定な C-H 結合を室温で水酸化できる人工酵素の活性メカニズムを解明」

大阪大学研究リリース速報 ResOU

http://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2017/20171215_1

理化学研究所プレスリリース(研究成果)2017

<http://www.riken.jp/pr/press/2017/>

科学技術振興機構(JST)HP

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20171215-2/index.html>

兵庫県立大学 HP

http://www.u-hyogo.ac.jp/outline/media/press/2017/monthly/2017_12.html#PRESS171215

本プレスリリース内容は、日本経済新聞電子版等に掲載された。

https://www.nikkei.com/article/DGXLRSP466311_V11C17A2000000/?au=0