

メタン発生酵素モデルを指向したポルフィリノイドニッケル錯体を含む再構成ヘムタンパク質の調製と評価

大阪大学大学院 工学研究科

応用化学専攻

林研究室

博士前期課程二年

宮崎 雄大

1. 緒言

現代社会において、「メタンや二酸化炭素などの天然炭素資源の効率的変換による化成品やエネルギーへの変換」とそれに伴う「石油依存問題の解決や二酸化炭素排出低減」が望まれている。しかし、非常に安定な炭素源を直接変換するプロセスは難易度が高く、比較的扱いやすい別の化合物を経由する水蒸気改質などの間接的プロセスを利用しているのが現状である。一方、自然界においては、有機合成化学的に困難な反応に対して、酵素が温和な条件下（常温、常圧、水中）で高活性な触媒として働き、基質特異的、立体・位置特異的な物質変換を支援する。この機能を模倣・向上させた人工生体触媒による環境負荷軽減型の物質変換が近年注目されており、その実現に向けて、天然酵素の詳細な反応機構解明と機能再現が改めて必要となっている¹。

本研究では、炭素源の効率的変換を目指した人工生体触媒構築を見据え、メタン細菌中で、その存在環境によりメタン発生と逆反応のメタン分解を触媒するメチル補酵素M還元酵素(MCR)に注目し、そのモデル構築と反応特性の検討を行った。MCRは、活性中心として補因子のF430（ポルフィリノイドニッケル錯体）を有し、菌中のメタン発生反応の最終段階において基質のメチル補酵素M($\text{CH}_3\text{-SCoM}$)と補酵素B(H-SCoB)からメタンとジスルフィド化合物(CoMS-SCoB)を生成する。また、ニッケル1価種が活性種として提唱されているが、酵素・活性中心ともに非常に複雑な分子構造であり、反応機構や作用機序は完全には理解されていない(図1(A))²。これまで機構解明をめざし、活性中心を模したモデル錯体の合成と錯体化学的研究が行われてきたが、どの報告も有機溶媒中において水銀ナトリウムアマルガム（酸化還元電位：約 -1.96V vs. SHE ）などの強力な還元剤を用いており、実際の酵素反応が進行する水中での反応系とは大きく異なっている³。また、天然酵素のタンパク質が酵素反応に重要な役割を果たすはずであるが、これを考慮したモデルの設計や実験には至っていない。これらの問題点を解決するために酵素を形成するタンパク質の特徴を含む機能モデルを構築・評価することで、酵素の反応機構の解明につながることを期待される。本研究では、ヘムタンパク質の構造と補因子置換能に着目し、ヘムの除去と人工補因子の導入を行う「再構成法」⁴を利用したMCRの新規機能モデルの構築を試みた。具体的には

酵素を形成するタンパク質の特徴を含む機能モデルを構築・評価することで、酵素の反応機構の解明につながることを期待される。本研究では、ヘムタンパク質の構造と補因子置換能に着目し、ヘムの除去と人工補因子の導入を行う「再構成法」⁴を利用したMCRの新規機能モデルの構築を試みた。具体的には

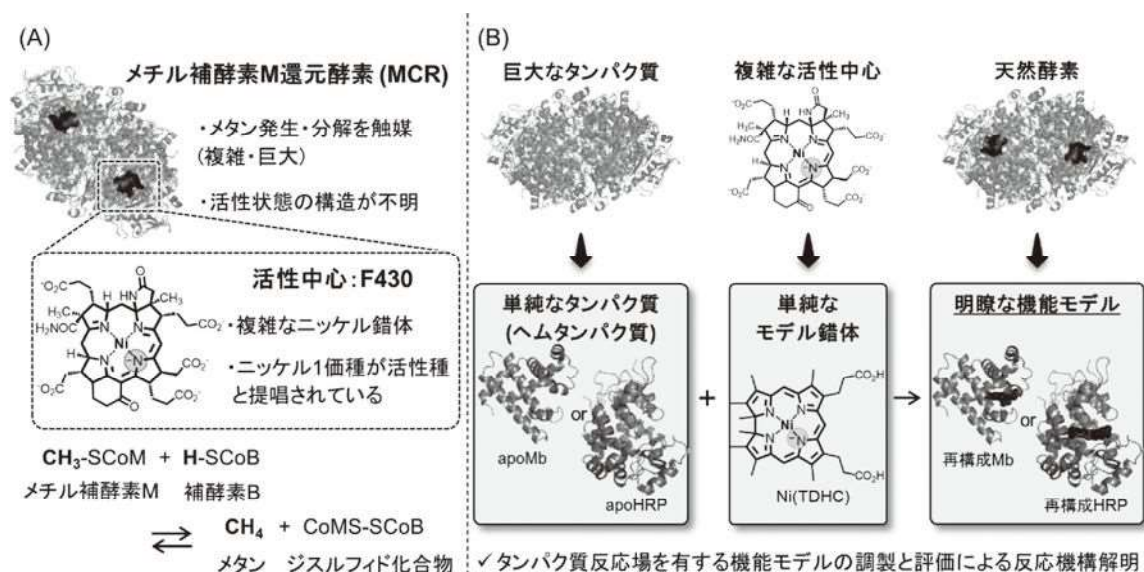


図1. (A) MCRおよびF430の特徴, (B) 研究コンセプト

単純な構造のヘムタンパク質にF430のモデル錯体として合成したポルフィリノイドニッケル錯体を挿入することで、タンパク質反応場を有するMCRの機能モデルの構築法を初めて開発し、反応性の評価を行った(図1(B))。

2. 再構成ヘムタンパク質の調製

タンパク質として構造が単純であること、疎水性反応場を持つこと、MCRと同様に軸配位可能なアミノ酸残基を持つことなどから、ヘムタンパク質の一種であるミオグロビン(Myoglobin, Mb)と西洋わさびペルオキシダーゼ(Horseradish peroxidase, HRP)を研究対象として選択した。これらのタンパク質は活性中心として補因子のヘム(ポルフィリン鉄錯体)を有し、分子量はそれぞれca. 17 kDaとca. 43 kDaの扱いやすいヘムタンパク質であることや、一般に再構成法を用いた補因子の置換による機能改変を容易に行うことができることからMCRの最適なタンパク質モデルとなり得ると考えた。モデル錯体としてF430と同等のモノアニオン性テトラピロール配位子を持ち、金属低原子価種の安定化が期待されるニッケルテトラデヒドロコリン(Nickel tetrahydrocorrin, Ni(TDHC))を選択し、再構成法により新規機能モデルを構築した。以下にその手順の概要と同定について記す。

まず、リン酸緩衝溶液中においてそれぞれのヘム

タンパク質に対し、酸処理と有機溶媒によるヘムの抽出、中性条件における透析を行うことでヘムを除去したそれぞれのヘムタンパク質のアポ体(apoMbとapoHRP)を調製した。続いて合成したNi^{II}(TDHC)(2価ニッケル錯体)をN₂雰囲気下、リン酸緩衝溶液中においてジチオナイト(弱い還元剤, 酸化還元電位: 約-0.42V vs. SHE)で還元してNi^I(TDHC)(1価ニッケル錯体)とし、これを先に調製しておいたアポ体の各水溶液に滴下することで機能モデルとしての再構成Mb、再構成HRPをそれぞれ得た(図2(A))。モデル錯体へのアポタンパク質の滴下前後で紫外可視吸収(UV-vis)スペクトルを測定すると、特徴的なスペクトル変化を示し、質量測定などから錯体とタンパク質の1対1の複合体の形成を確認した(図2(B))。さらに円偏光二色性(Circular dichroism, CD)スペクトルの測定においては、タンパク質の α ヘリックスの巻き戻りの強さを示す222 nmの領域に注目すると、再構成Mbの場合はapoMbのみの場合に比べてより強い吸収を示したことから、モデル錯体のタンパク質中への挿入によりタンパク質の3次元構造が回復したことが示唆された(図2(C))。また、再構成Mbに対し、電子スピン共鳴(Electron paramagnetic resonance, EPR)測定を行うことで、シミュレーション結果に合致するニッケル1価種に特徴的なスペクトルを実験的に観測したことから、天然酵素と同様に還元条件下のタ

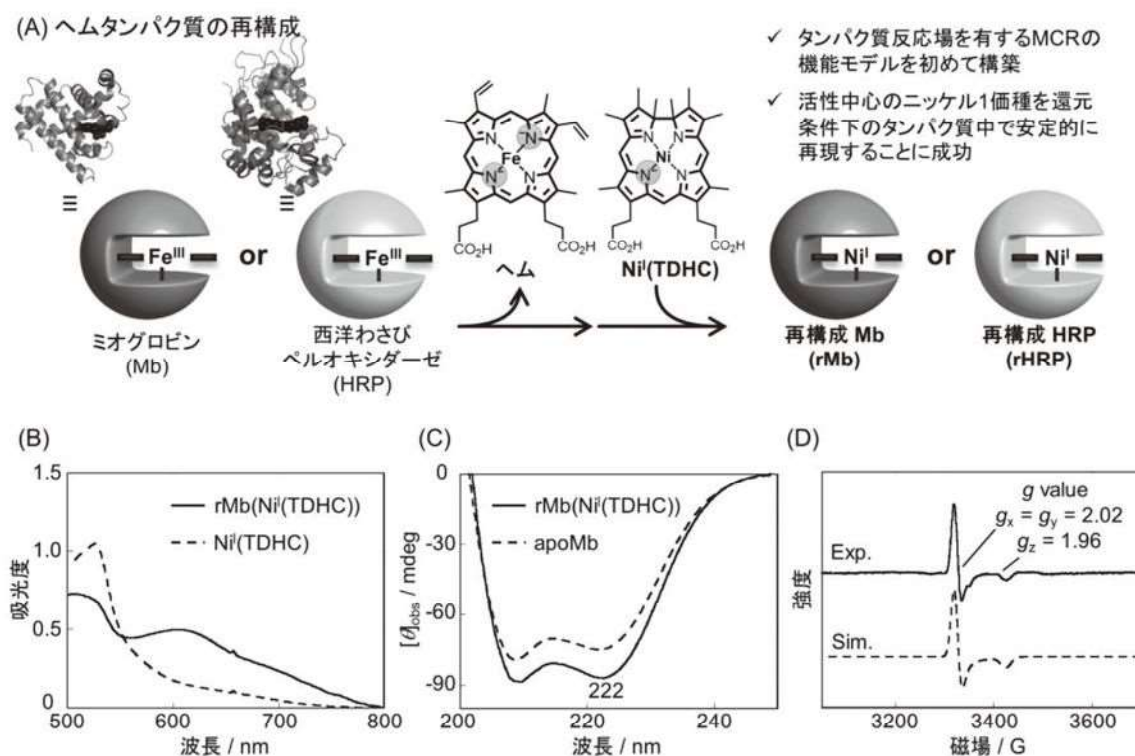


図2. (A) ヘムタンパク質の再構成の模式図, ミオグロビンを用いた場合の再構成前後における (B) 紫外吸収スペクトルの変化と (C) 円偏光二色性スペクトルの変化, (D) 再構成ミオグロビンの電子スピン共鳴スペクトル (温度: 20K)

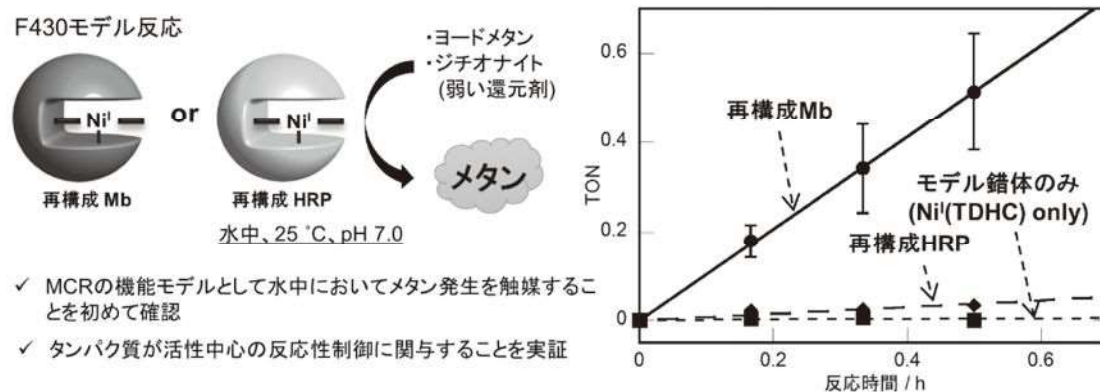


図3. メタン発生反応の評価 (100mMリン酸緩衝溶液 pH7.0, 25°C, N₂雰囲気下)

ンパク質中において活性中心のニッケル 1 価種を安定に再現することに成功した (図 2 (D))。

3. メタン発生反応評価

温和な条件下、メチル化剤を用いて上記の再構成ヘムタンパク質を用いたメタン発生を試みた。それぞれの再構成ヘムタンパク質水溶液に室温、還元条件下においてヨードメタンを加え、サンプルを調製した。また、コントロールとしてタンパク質を含まないモデル錯体だけのサンプルも調製した。反応開始から一定時間後、発生気体をガスクロマトグラフィー (Gas chromatography, GC) で測定したところ、モデル錯体のみでは気体の生成が確認されなかったが、それぞれの再構成ヘムタンパク質を用いた場合はメタンの発生が確認された。また、用いた再構成ヘムタンパク質の種類によりメタン発生量に違いが見られ、再構成Mbを用いた場合の触媒回転頻度 (Turnover frequency, TOF) は、再構成HRPを用いた場合の約 6 倍であった (図 3)。これらの実験結果より軸配位や疎水性反応場等のタンパク質が持つ特徴的な環境が内包する活性中心の反応性を制御することが示唆された。さらにpHやメチル化剤の濃度など反応条件の最適化を行うことで、再構成Mbに対するメタン発生量の触媒回転数 (Turnover number, TON) が1.6に達し、再構成Mbを介してメタンが触媒的に発生し、本系が機能モデルとして作用することを明らかにした。

4. 結論と今後の展開

本研究はメタン発生酵素に対してタンパク質反応場を含む機能モデルを構築した初めての例である。また、タンパク質にモデル錯体を挿入することで飛躍的なメタン発生量の向上が観測され、メタン発生酵素モデルにおいてタンパク質の特性 (軸配位や疎

水性環境) が活性中心の反応性制御に大きく関与することを実験的に示した。

今後の研究ではMCRの機能モデルの最適化による機構解明とそれを応用した人工生体触媒の構築と活用を目指す。具体的には、今回調製した機能モデルに対し、特に評価目的に応じたタンパク質への変異導入などにより活性中心の物性と構造解析の両面から反応機構の解明を実施する。さらに本機能モデルは高度に制御されたタンパク質内の配位環境を持つため、適切な反応場の改変を行い、新規反応 (メチル基転移反応やメタン分解反応) を高効率に達成する人工生体触媒として利用する。

【謝辞】

本研究は、大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻 林研究室にて実施されました。林 高史教授には常日頃から多大なるご支援とご指導を頂いており、ここに厚く御礼申し上げます。また多くのアドバイスを頂いた同研究室の小野田 晃准教授、大洞 光司助教に心から感謝致します。

【参考文献】

- 1) a) K. Oohora, Y. Kihira, E. Mizohata, T. Inoue, T. Hayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 17282-17285. b) H. M. Key, P. Dydio, D. S. Clark, J. F. Hartwig, *Nature* **2016**, *534*, 534-537.
- 2) a) U. Ermler, W. Grabarse, S. Shima, M. Goubeaud, R. K. Thauer, *Science* **1997**, *278*, 1457-1462. b) T. Wongnate, D. Sliwa, B. Ginovska, D. Smith, M. W. Wolf, N. Lehnert, S. Raugei, S. W. Ragsdale, *Science* **2016**, *352*, 953-958.
- 3) a) G. K. Lahiri, L. J. Schussel, A. M. Stolzenberg, *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 4991-5000. b) I. Zilbermann, G. Golub, H. Cohen, D. Meyerstein, *Inorg. Chim. Acta* **1994**, *227*, 1-3. c) L. Signor, C. Knappe, R. Hug, B. Schweizer, A.

Pfaltz, B. Jaun, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 3508-3516. d) J. Nishigaki, T. Matsumoto, K. Tatsumi, *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 5173-5187.

- 4) T. Hayashi, Y. Morita, E. Mizohata, K. Oohora, J. Ohbayashi, T. Inoue, Y. Hisaeda, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 12560-12563.



大阪大学大学院工学研究科
応用化学専攻 博士後期課程1年
日本学術振興会特別研究員(DC1)

有機化学・錯体化学・生化学を融合させた「応用生物無機化学」の観点から新規触媒・生体材料の創製に向け、研究に取り組んでいます。