

ヘム酵素を中心とする有機金属酵素の創成戦略

名古屋大学大学院理学研究科
渡辺 芳人

1 はじめに

1980年代はじめからヘム酵素による酸化反応に興味を持ち、合成モデル錯体による研究を行ってきた。90年代後半からヘムタンパク質を取り扱い、部位特異的なミューテーションによってミオグロビンに対して様々なヘム酵素の活性賦与の研究へと展開した。一連の研究から、蛋白質内部は非常に興味深い反応場であり、触媒としての金属錯体を蛋白質内部に適切に配置することで人工的な金属酵素を設計できるとの確信を得た。そこで、ミオグロビンからヘム部分を除き、金属錯体を挿入した有機金属蛋白質の作成を行い、触媒活性を賦与することができた。さらに、ヘムタンパク質から離れて、鉄イオン貯蔵蛋白質であるフェリチンの蛋白部分(アポフェリチンと呼ぶ)を利用したPd(0)クラスターの合成とサイズ選択的オレフィンの還元反応が高効率で進行することを見出した。本講演では、一連の研究における蛋白設計について詳しく紹介する。

2 ヘム酵素による酸化反応

合成反応の触媒という観点からヘム酵素を眺めると、アルキル基や芳香環を水酸化するP450が重要な酵素と考えられる。P450には蛋白質部分の構造の異なる様々な種類が知られている。例えば、緑膿菌由来のP450camは毎分1,000回程度の速度で*d*-camphorを5-*exo*-hydroxy camphorに変換する。しかし、合成反応への利用を考えた場合の問題点は、「P450による酸化活性種生成の特徴が酸素分子の還元的活性化」にあり、還元剤であるNADPHやNADHは、試薬としては非常に高価なことである。従って、P450を用いて酸化反応を行うときには、生成物に相当な付加価値がある場合以外採算が合わないということになる。

一方、ペルオキシダーゼは過酸化水素を酸化剤として用いており、活性種であるO=Fe(IV)ポルフィリンπ-カチオンラジカル(compound Iと呼ばれる)の生成速度は $10^7\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ と非常に速い¹⁾。従って、ペルオキシダーゼを用いて水酸化反応を行えば、有機合成上有用な生体触媒となりそうであるが、話はそれほど簡単ではない。それぞれのヘム酵素はそれぞれの決まった反応のみを触媒するために、ペルオキシダーゼによる水酸化反応はほとんど進行しない。こうしたヘム酵素間の反応性の違いがどこから生ずるかは、非常に興味深い問題である。そこで、ミオグロビン(Mb)を用いてこの問題に挑んだ。

2.1 ミオグロビンをペルオキシダーゼにするための構造的な検討

ミオグロビン(Mb)は酸素分子を筋肉中に貯蔵するという役割を担うヘム蛋白質である。もちろんペルオキシダーゼやP450の活性は無い。図1に示したミオグロビンのヘム鉄近辺のアミノ酸を検討した結果、Mbの29番目のアミノ酸であるロイシン(Leu29)と43番目のフェニルアラニン(Phe43)の位置にヒスチジンを導入すると、鉄?ヒスチジン間の距離がペルオキシダーゼやカタラーゼの場合に近くなる事が予想され、それぞれの位置にヒスチジンの導入を行った。その際、元々存在している遠位ヒスチジン(His64)は不要なので、それぞれのミュータントでは側鎖の小さなロイシンへの置き換えを行

った²⁾。この操作により、ヘム鉄のすぐ上に外来基質を取り込むための空間を準備することができた。つまり、それぞれのミュータントではヒスチジンの位置を動かし、本来ヒスチジンがあった場所にはロイシンを導入したダブルミュータントを2種類、H64L/L29H、H64L/F43H Mb を作成した。それぞれのミュータントの構造はX線による結晶構造解析により、ヒスチジン - 鉄間距離が前者では6.5Å、後者で5.7Åであることが分かった³⁾。なお、cytochrome *c* peroxidase (CcP)では、5.6Åであり、H64L/F43H Mb ミュータントはCcP様の反応を行うことが期待された。

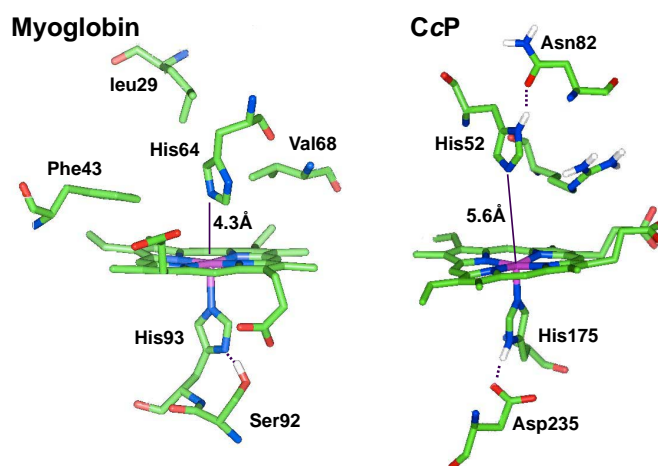


図1 MbとCcPのヘム近傍構造の比較。

2.2 ミオグロビンミュータントによる酸化反応

得られた2種類のダブルミュータントおよびミオグロビン自身によるスルフィドとオレフィンの酸化反応を検討した。酸化剤は、ペルオキシダーゼを意識して過酸化水素を用いた。H64L/L29H Mbはミオグロビンに比して10~40倍の反応性を示し、驚く事に、スルフィド酸化では最大で97%(R)という高い光学選択性が示された。お手本としたCcPと同様に、ヒスチジン - 鉄間距離が5.7ÅであったH64L/F43H Mbに至っては、300倍以上の酸化活性の向上が見られ、光学選択性も85%と高い値が得られている(表1)²⁾。一方、スチレンのエポキシ化でも高い光学選択性でR体が得られている。外来基質を取り込む空間を導入したことにより、こうした高い光学選択性が現れたものと解釈している。¹⁸Oで標識した過酸化水素を用いているので、スルフォキシドとエポキシドに導入された酸素源が過酸化水素由来か否かを検討することが出来る。驚いたことに、ミオグロビンによるエポキシ化では、過酸化水素の酸素が使われていない。この段階で、ミュータントとミオグロビンによる酸化反応の本質的な差異が出てきている。

表1 ミオグロビンによる不斉基質酸化反応。

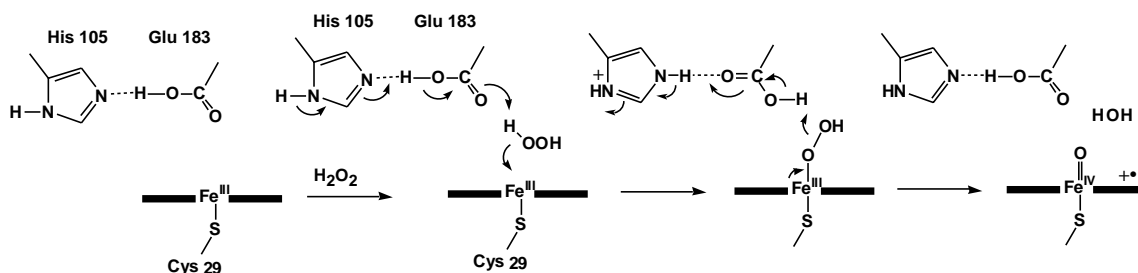
Protein	Turn over (/min)	¹⁸ O content	e.e. (R)
Sperm Whale Myoglobin	0.13	92	25
L29H/H64L	5.5	97	97
F43H/H64L	47	96	85

Protein	Turn over (/min)	H ₂ ¹⁸ O ₂	e.e. (R)
Sperm Whale Myoglobin	0.015	20	9R
L29H/H64L	0.14	94	80R
F43H/H64L	4.5	94	68R (70R*)

* mCPBA was used as the oxidant

2.3 ミオグロビンミュータントの高活性化

上記で紹介したミオグロビンミュータントは、ペルオキシダーゼのヘム近傍構造を反応論の立場から理解し、それに基づいて一般酸塩基触媒としてのヒスチジンをミオグロビンのヘム近傍に適切に配置した例である。天然に存在する様々なペルオキシダーゼの中で、水酸化反応やエポキシ化反応を最も高い活性で行うのがクロロペルオキシダーゼ(CPO)と呼ばれるヘム酵素である⁴⁾。本来の機能は、炭化水素の塩素化を pH2 前後で行う事である。この酵素の構造的な特徴は、軸配位子が P450 と同様にシステインであり、遠位側にはグルタミン酸 - ヒスチジンが一組となって一般酸塩基触媒として作用しているところにある。スキーム1にそれらをまとめて示す。



スキーム1 クロロペルオキシダーゼによる酸化活性種生成機構。

そこで、CPO を意識してミオグロビンの遠位ヒスチジン(His64)をアスパラギン酸(Asp)に置換したミュータント(H64D Mb)を作成した¹¹⁾。H64D Mb は過酸化水素と高い反応性を示し、ミオグロビンと比べてチオアニソールおよびスチレンの酸化活性がそれぞれ 580、820 倍であった。しかしながら、高い活性と引換に、不斉選択性がほとんど失われるという結果が得られた。そこで H64D の結晶化を行い、その構造を検討し、基質結合ポケットを構成するアミノ酸残基の一つである Val68 を体積の異なるアミノ酸で置換することによって(H64D/V68(X) Mb)、基質取り込み部位の体積と構造に変化を加え、チオアニソールの酸化への影響を調べた。その結果、酸化活性はほぼ保ったままで 80% 以上の高い不斉選択的酸化反応をおこなうミュータント(H64D/V68A Mb、H64D/V68S Mb)を作成することに成功した⁵⁾。

2.4 高難度酸化反応への挑戦

以上紹介してきたように、ミオグロビンの活性部位の設計によってスルフィドやスチレンなどの不斉酸化反応を達成することが出来た。しかしながら、表1から分かるように、反応性の低いオレフィンのエポキシ化反応はスルフィド酸化よりも一桁反応速度が遅い。当然、炭化水素の水酸化反応はほとんど進行しない。高い水酸化反応活性を示す P450 の結晶構造を見れば分かることであるが、P450 は休止状態(反応前の安定な状態)ですでに基質をヘム近傍に取り込んでいる。これに対して、我々が作成したミオグロビンミュータントは、単にヘム近傍に外来基質を取り込むことが出来る空間を準備しただけである。そこで、ヘム近傍への基質の固定化を考えた。具体的には、ミオグロビンの 43 番目のアミノ酸であるフェニルアラニン(F43)を基質であるトリプトファン(W)に置き換え、同時に立体的に邪魔な遠位ヒスチジン(H64)はロイシンに置換したダブルミュータント F43W/H64L Mb を作成した。結晶化に成功していないために結晶構造は示せないものの、力場計算によって得られた構造を図2に示す。計算ではトリプトファンの C6、C7 炭素がヘム鉄に一番近く、その距離はおおよそ 5Å

と予想される。なお、力場計算の信頼性であるが、我々が結晶構造を明らかにしたミオグロビンミュータントに関しては、0.1Åの誤差範囲でほぼ正確に構造予測している。

酸化剤である *m*CPBA を順次加えていくと、4当量の *m*CPBA で反応はほぼ完結し、MALDI-TOF マス、¹H および ¹³C NMR、アミノ酸分析などから、その構造はスキーム 2 に示す 1 と同定した。1 はインドール骨格が 6 電子酸化を受けたキノン型の生成物である。従って、化学量論的には、酸化剤である *m*CPBA は蛋白質に対して 3 当量必要ということになるが、本反応は 4 当量の *m*CPBA 添加時点でほとんど修了している。すなわち、用いた酸化剤の 70% 近くが酸化反応に用いられており、非常に高い効率で酸化反応が進行したことになる⁶⁾。

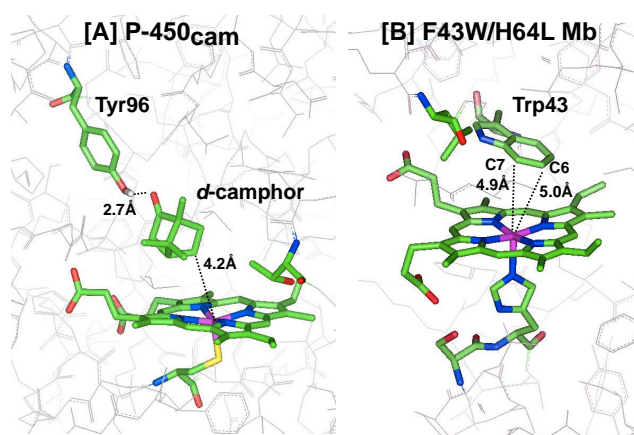
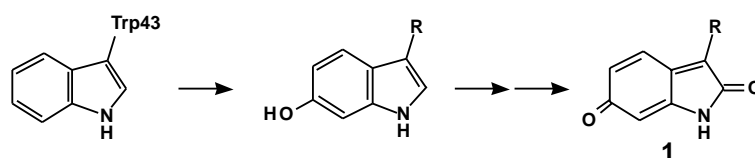


図2 P450camとF43W/H64L Mbのヘム近傍構造の比較.



スキーム 2 F43W/H64L Mbのトリプトファン酸化.

3 ヘムを他の金属錯体で置き換える

以上の研究から、ミオグロビンのヘム近傍の設計によって機能性アミノ酸残基の適切な配置を達成すれば、我々が望む反応の触媒、すなわち酵素へと返還できることが明らかとなった。このコンセプトを一歩進めると、ミオグロビンの蛋白質を利用して、有機溶媒で高い触媒活性を示す金属錯体をヘムと入れ替えることができれば、これまでにない触媒機能をミオグロビンに賦与できる可能性がある。まさに、有機金属酵素の創製である。こうしたアイディアの可能性を探るために、金属(salen)錯体をヘムを除いたミオグロビン(アポミオグロビンと呼ぶ)内部に挿入することを試みた。話としては簡単そうであるが、金属錯体の蛋白内部での親和性が低ければ、精製段階で錯体は蛋白内部から抜けてしまうため、ヘムのように安定に蛋白質内部に存在可能な錯体にたどり着くのに約三年にわたる泥こね(?)が必要であった。最終的に、図3に示すようにCr, Mn, Fe(salophen)錯体をミオグロビン内部にあたかもヘムのように挿入・単離生成することができ、それらの結晶構造も明らかとした⁷⁾。ここで注目してもらいたいのは、単にミオグロビンのヘムを金属錯体に置き

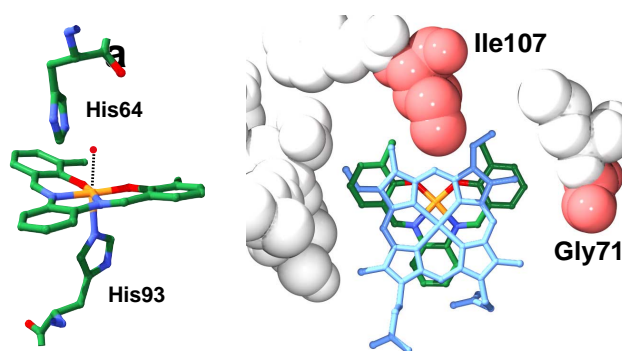


図3 Mn(salophen)•apoA71GMbの結晶構造(左)とヘムとの比較(右)。

換えたのではなく、蛋白部分もミューテーションによって錯体との立体反発を取り除き(A71 G)、疎水性相互作用が最大になるような工夫を行っていることである。

このようにして作成した金属シッフ塩基・アポミオグロビン複合体はスルフィド類の不斉酸化反応を触媒するが、これまで我々が作成してきたMbミュータントによる不斉酸化の選択性・活性には遠く及ばないのが現状である。しかし、蛋白質内部に安定に金属錯体を導入するための方法論を作り上げた意義は大きく、今後様々な展開が期待される。

4 ヘム以外の蛋白を反応場として利用する有機金属酵素への第一歩

ミオグロビンに対する部位特異的なミューテーションの研究から、自在な酵素活性の賦与が可能であることが分かった。さらに、有機溶媒中で様々な反応を触媒する金属錯体をミオグロビンのヘムと置き換え、ミューテーションによる金属錯体近傍の蛋白構造の設計によって人工金属酵素を作り上げるための方法論の開拓まで進んだが、利用可能な蛋白質をヘム蛋白質に限る必要はない。しかし、金属錯体や有機金属化合物を導入し、目的の機能を賦与する蛋白質複合体の条件として、(1) pH や熱に対する安定性が高く、(2) 結晶構造が明らかとなっており、(3) 自在にアミノ酸置換がおこなえる必要がある。そこで、本研究ではフェリチンを用いた。フェリチンは外径12nm、内径8nmの24量体から成る球状複合体である(Fig.4)。鉄イオンの貯

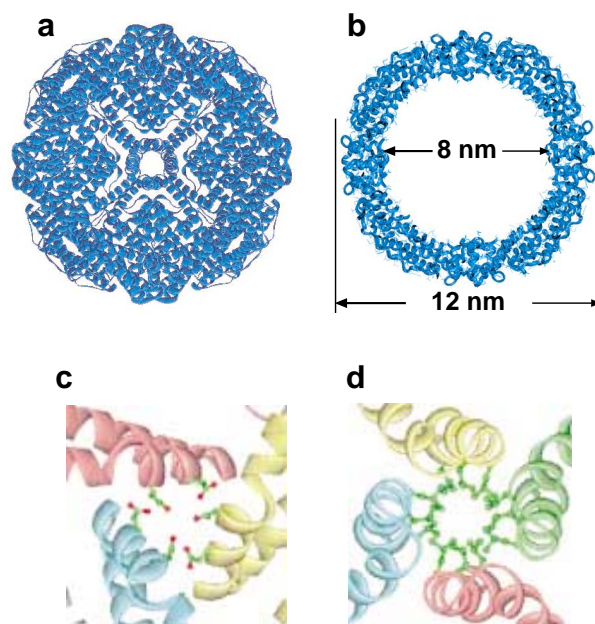
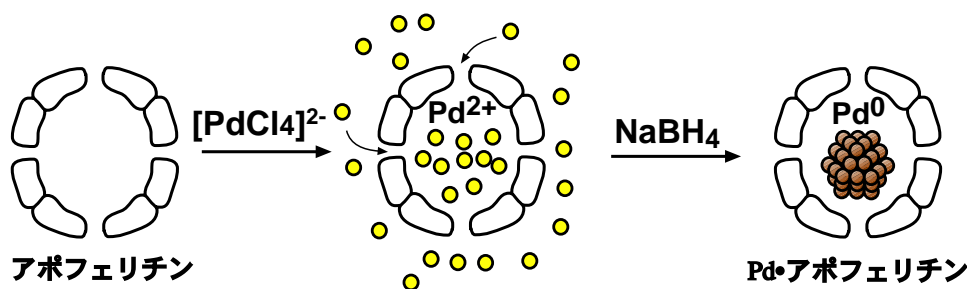


図4 馬脾臓フェリチンの結晶構造: 全体構造 (a); 内部空間 (b); 3回対称チャンネル(c); 4回対称チャンネル (d).

蔵の機能を有し、内部の空間に鉄を $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ の状態で貯蔵する。既に結晶構造が明らかとなっており、pH 2-11、80°Cまで安定に複合体を保持することができ、変異体作成のための発現系も確立されている。

スキーム3に示す手順でフェリチン内部でPdナノ粒子を「その場合成」し、オレフィンの水素化触媒を構築したところ、電子顕微鏡によって確認されたフェリチン内部のPd微粒子は平均で2.1nmの直径を持つ。次に、精製したPd・apo-ferritinを用いてオレフィンの水素化反応について評価した。



スキーム3 フェリチン内部空間へのPdナノ粒子の作成.

その結果を表 2 に示す。TOF (turnover frequency)は 1 時間当たり、Pd 原子 1 個の触媒能を表す。TOF の値は、¹H NMR の基質と生成物の積分比、及び原子吸光と BCA 法から算出した。なお表 2 の水素化反応の TOF=71.5 の値は、フェリチン 1 分子あたりに換算すると、TOF=37,000 となる。明らかに基質のサイズ選択が行われている。これは、図 4(c)のチャンネルを基質が通過して蛋白内部に入り込む必要があり、この段階でサイズ選択性が起こることも分かった⁸⁾。

表 2 Pd•apo-ferritin を触媒としたオレフィン水素化反応^[a]の結果.

オレフィン	TOF (/Pd•apo-ferritin)	TOF (/free Pd)
CH ₂ =CHCONH ₂ (1)	71.5	63.5
CH ₂ =CHCOOH (2)	6.3	–
CH ₂ =CHCONH- <i>i</i> Pr (3)	51	–
CH ₂ =CHCONH- <i>t</i> Bu (4)	31	5.5
CH ₂ =CHCO-Gly-OMe (5)	6	–
CH ₂ =CHCO-D,L-Ala-OMe (6)	Not detected	22.2

^[a]TOF の値は、Pd 原子一個当たりの数字。

5 まとめ

以上、駆け足でミオグロビンの基本骨格を利用した酸化酵素への機能変換、金属錯体置換ミオグロビンによる有機金属酵素作成の第一歩、さらにアポフェリチン内部での Pd(0)クラスター構築と、サイズ選択的オレフィンの水素化反応の例を紹介した。なお、ヘム酵素の創成に関しては最近総説にまとめたので、そちらもご参照いただきたい⁹⁾。

文 献

- 1) H.B. Dunford, *Heme Peroxidases*; Wiley-VCH, New York (1999).
- 2) S. Ozaki, T. Matsui, Y. Watanabe, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 6666 (1997).
- 3) T. Matsui, S. Ozaki, E. Liang, G.N. Phillips, Y. Watanabe, *J. Biol. Chem.*, **273**, 2838 (1999).
- 4) M. Samdramooh, J. Ternner, T.L. Poulos, *Structure*, **3**, 1367 (1995).
- 5) S. Kato, H.-J. Yang, T. Ueno, S. Ozaki, G.N. Phillips, Jr., S. Fukuzumi, Y. Watanabe, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 8506 (2002).
- 6) I. Hara, T. Ueno, S. Ozaki, S. Ito, K. Lee, N. Ueyama, Y. Watanabe, *J. Biol. Chem.*, **276**, 36067 (2001).
- 7) M. Ohashi, T. Koshiyama, T. Ueno, M. Yanase, H. Fujii, Y. Watanabe, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 1005-1008 (2003).
- 8) T. Ueno, M. Suzumi, T. Goto, T. Matsumoto, K. Nagayama, Y. Watanabe, *Angew. Chem. Int. Ed.*, in press (2004).
- 9) Y. Watanabe, T. Ueno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **76**, 1309-1322 (2003).