

氏 名 大 橋 雅 卓

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第660号

学位授与の日付 平成15年3月24日

学位授与の要件 数物科学研究科 構造分子科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Construction of Artificial Metalloproteins:
Noncovalent Insertion of Metal Complex Catalysts
into Protein Cavities

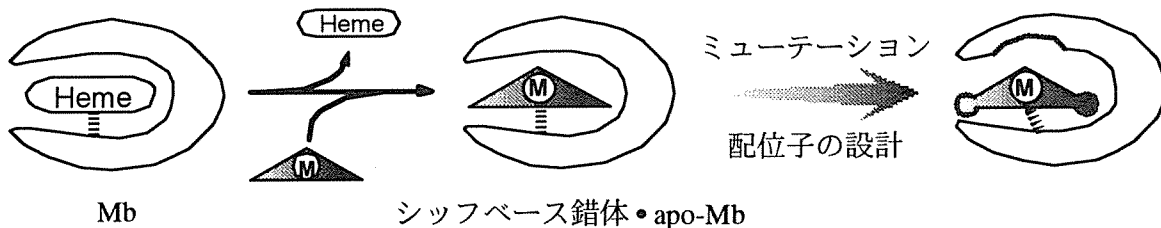
論 文 審 査 委 員 主 査 教授 永瀬 茂
教授 田中 晃二
助教授 岡本 祐幸
助教授 鈴木 敏泰
教授 渡辺 芳人 (名古屋大学)
助教授 林 高史 (九州大学)

論文内容の要旨

【序論】 蛋白質の機能改変及び人工蛋白質の創成は生物無機化学の重要なテーマの一つである。蛋白質は生体内で種々の特異的な機能を発現しており、これを自由かつ容易に制御できれば、新しい機能性材料や分子触媒として利用できる。これまでの金属蛋白質の機能改変は、酸素貯蔵蛋白質であるミオグロビン(Mb)を中心に展開されており、新規機能を賦与するためにヘム近傍アミノ酸の部位特異的変異、ヘムの修飾、蛋白質表面の化学修飾が行われてきた。しかしこれらの方法では、ヘムの触媒能を引き出すことはできても、大きな機能改変は困難である。そこで本論文では、蛋白質キャビティーを制御可能な反応場と捉え、そこへ触媒機能を持つ非天然金属錯体を特定の部位に挿入する事で人工金属蛋白質の構築を目指した。

【第一部】 アポミオグロビンとシッフベース錯体の複合化による人工金属蛋白質の構築

シッフベース錯体をアポ Mb (apo-Mb)へ非共有結合的に挿入することでシッフベース錯体・apo-Mb 複合体の構築を行った。さらに Mb への部位特異的変異の導入やシッフベース配位子の構造の差異による複合体の反応速度、選択性、安定性の制御を目指した。(スキーム 1)



スキーム 1. ミオグロビンを用いた人工酵素の構築法

具体的には、シッフベース錯体としてサロフェン錯体を用いた(図 1)。サロフェン錯体及びその誘導体は、比較的容易に合成可能で、中心金属を変える

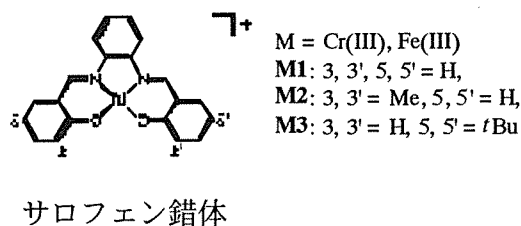
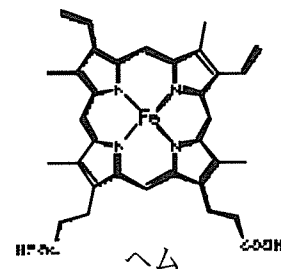


図 1. シッフベース錯体



ことで酸化、加水分解、水素化、C-C 結合形成などの触媒として機能する。サロフェン錯体はヘムとは全く異なる骨格構造をとるが、ヘムと同程度の分子サイズであり、平面構造をとることから apo-Mb へ十分に挿入可能であると考えた。実際に、分光学的な測定により基質取り込み過程を検討することが可能な鉄(III)サロフェン錯体と、人工酸化酵素の構築のためにクロム(III)サロフェン錯体を用いて、そ

れぞれ apo-Mb との複合体の形成を試みた。

さらに、複合体の機能制御を行うために Mb のデザインを行った。Insight II/Discover3 による複合体の構造計算から、71 位のアラニンがサロフェン錯体に近接する事が示唆された。そこでサロフェン錯体・apo-Mb 複合体の安定性を高めるために、71 位のアラニンをグリシンで置換した A71G Mb を構築した。さらに、渡辺らの報告をもとに、人工酸化酵素の構築を目指し、6 4 位のヒスチジンをアスパラギン酸に置換することで基質の反応場を構築した H64D Mb を調製した。

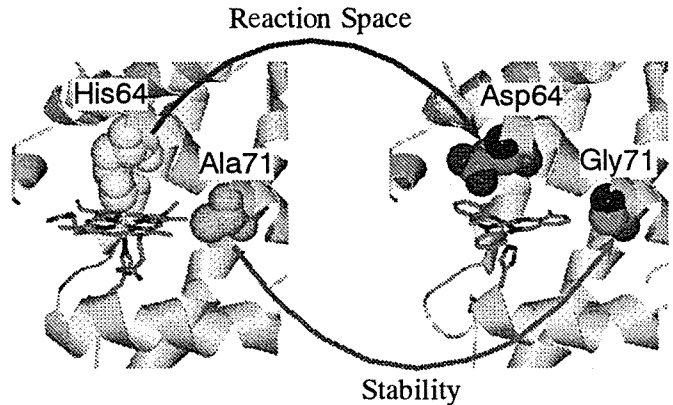


図 2. Mb キャビティーの設計

【第一章】 鉄(III)シッフベース・apo-Mb 複合体の構築と X 線結晶構造解析

鉄(III)シッフベース錯体 Fe_2 は apo-Mb 及び apo-A71G Mb と複合体を形成し、どちらも結晶化に成功した。X 線結晶構造解析の結果、 Fe_2 ・apo-Mb はキャビティー内部に Fe_2 と考えられる電子密度が観測されたが、詳細な構造は決定できなかった。これは Fe_2 がキャビティー内部で動いている、あるいはランダムな入り方をしているためであると考えられる。一方、 Fe_2 ・apo-Ala71Gly Mb は、当初予想したとおり、 Fe_2 がキャビティー内部に存在しており、配位子の 3, 3' 位のメチル基が 107 位イソロイシンを挟み込む様にして挿入されていた (図 3)。 Fe_2 は水と His93 のイミダゾール基が配位した 6 配位構造をとり、結合距離はそれぞれ 2.34 Å, 2.32 Å であった。また His64 は軸配位した水と水素結合を形成していることが分かった。 Fe_2 ・apo-Mb 及び Fe_2 ・apo-Ala71Gly Mb の構造解析の結果から、Ala71 は Mb キャビティー内部でのシッフベース錯体の固定化に大きく寄与している事が示唆された。

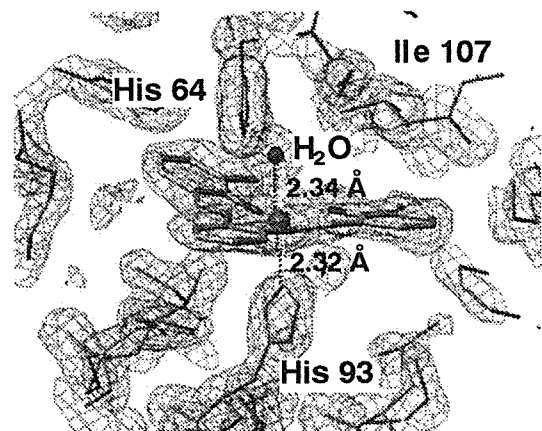


図 3. Fe_2 ・apo-A71G Mb の結晶構造 (分解能 1.8 Å)

【第二章】 金属錯体による複合体の機能制御

非共有結合的な相互作用を利用する複合化の利点は、中心金属や配位子を変えることで機能制御が行える点である。そこで、配位子上に置換基を導入した鉄(III)シッフベース錯体を用いて複合体を構築

し、配位子の置換基が、鉄へのシアンイオンの結合過程に与える影響について検討した。その結果、各複合体のシアンイオンの結合速度は、 $\text{Fe1} \cdot \text{apo-Mb}$ ($202 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) $>$ $\text{Fe3} \cdot \text{apo-Mb}$ ($7.3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) $>$ $\text{Fe2} \cdot \text{apo-Mb}$ ($2.2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)となり、配位子の置換基により 100 倍程の差が生じた。また複合体の熱的安定性は $\text{Fe2} \cdot \text{apo-Mb} > \text{Fe3} \cdot \text{apo-Mb} > \text{Fe1} \cdot \text{apo-Mb}$ となった。この差は、配位子の構造による金属錯体の挿入様式の違いに起因していると推定できる。つまり Fe1 はキャビティー内部での自由度が高く、Fe3 は中心金属がキャビティー入口付近に位置する為にシアン結合速度が速くなっており、逆に Fe2 は配位子の置換基によってキャビティーの深部にしっかりと固定化されているため、シアンイオンの結合速度は遅いが、熱的安定性が高くなっていると推測される (図 4)。この結果は配位子の構造による金属錯体の挿入様式の違いを利用して複合体の機能と熱的安定性の制御が行える事を示している。

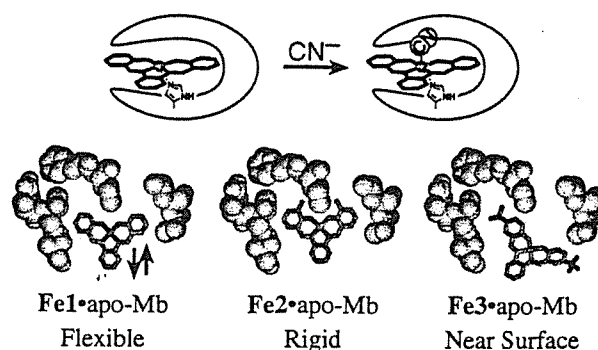


図 4. 鉄(III) シッフベース錯体 $\cdot \text{apo-Mb}$ の推定構造

【第三章】 クロム(III)シッフ塩基錯体挿入による酸化反応触媒のデザイン

彼の人工酵素構築法の利点は、様々な錯体を蛋白質に挿入し、触媒反応を水溶液中で制御できる点である。そこで有機溶媒中で酸化反応触媒として働くクロム(III)シッフベース錯体と apo-Mb との複合体を作成し、人工酸化酵素の構築を目指した。はじめに、X線結晶構造解析により、クロム(III)シッフベース錯体が apo-Mb と複合体を形成する事を確認した(図 5)。 $\text{Cr2} \cdot \text{apo-Ala71Gly Mb}$ と wild-type Mb の結晶構造を比較すると、クロム(III)シッフベース錯体は、ヘムに比べてキャビティー深部に固定されている事が分かった (図 6)。また鉄(III)シッフベース $\cdot \text{apo-Mb}$ 複合体の熱安定性、シアンイオンの結合速度の結果をもとに、 Cr3 を活性中心として apo-Mb と複合体を形成させることで、人工酸化酵素

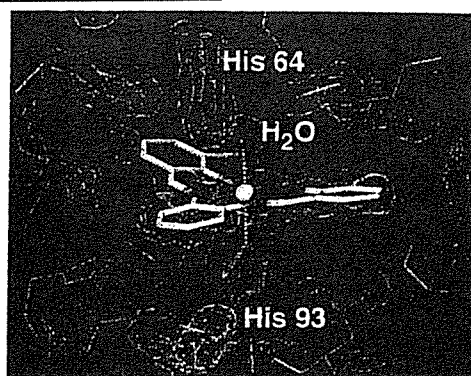


図 5. $\text{Cr2} \cdot \text{apo-A71G Mb}$ の結晶構造 (分解能 1.45 \AA)

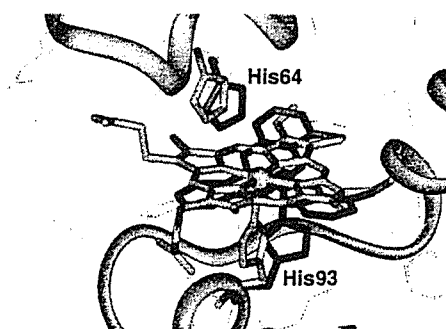


図 6. $\text{Cr2} \cdot \text{apo-A71G Mb}$ (赤) と wild-type Mb (黄) の結晶構造の比較

を構築した。この複合体を用いてチオアニソールの酸化反応を行った (図 7)。その結果、クロム(III)シッフベース錯体は水溶液中では不活性であるが、apo-Mb と複合化することにより水溶液中でチオアニソールの酸化反応を触媒した。さらに、クロム(III)シッフベース錯体近傍のアミノ酸残基に対して、基質との反応場の構築 (64 位ヒスチジンをアスパラギン酸) と複合体の安定

化 (71 位アラニンをグリシン) を考慮して設計したミュータントを用いることで、不斉酸化反応触媒として機能させる事に成功した。これらの結果は、天然の酵素が用いている反応場を利用して非天然金属錯体の反応性を制御できることを示している。

【第二部】 有機金属蛋白質の構築

第一部で得た知見は、シッフベース錯体以外へも応用する事ができる。第二部では、より高活性で酸化反応以外の機能へ応用するために、他の有機金属錯体と蛋白質の複合化による有機金属蛋白質の構築を目指した。具体的には、蛋白質との複合化システムによって、有機金属のもつ触媒活性を水中で発現させ、さらに不斉選択性を賦与することを目指した。すでに ESI-TOF MS による複合体のスクリーニングから、種々の有機金属触媒が apo-Mb と特異的に複合体を形成することを明らかにした。現在、これらの有機金属蛋白質の構造や化学変換について検討中である。

以上、第一部及び第二部で示した蛋白質と非天然金属錯体との複合化方法を用いることによって、人工酵素の構築だけではなく、非天然分子の様々な機能を蛋白質との複合化システムによって制御できると考えられる。

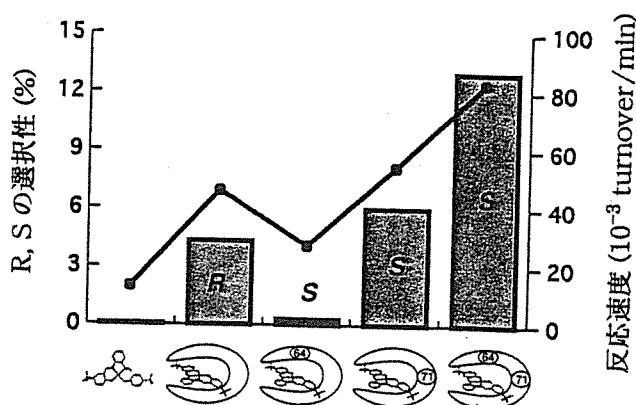


図 7. Cr³⁺·apo-Mb ミュータントによるチオアニソールの不斉酸化反応

論文の審査結果の要旨

蛋白質の機能改変及び人工蛋白質の創成は生物無機化学の重要なテーマの一つである。蛋白質は生体内で種々の特異的な機能を発現しており、これを自由かつ容易に制御できれば、新しい機能性材料や分子触媒として利用できる。本論文は、蛋白質内部の空間を制御可能な化学反応場として捉え、そこに触媒機能を持つ非天然金属錯体を特定の部位に挿入する事で人工金属蛋白質の構築を目指している。

はじめに、シッフ塩基-金属錯体を apo-Mb (アポ-ミオグロビン) の蛋白質内部空間に非共有結合的に挿入し、金属錯体-apo-Mb 複合体の構築を行った。具体的には、蛋白質-錯体配位子間に働く疎水的な相互作用や、金属に配位する性質を有するアミノ酸であるヒスチジンを金属錯体の配位子として利用することにより、蛋白質内部の特定の位置に金属錯体を固定することを計画した。さらに、複合体の機能制御を行うために Mb の内部空間の分子設計を行った。その際、分子動力学計算による複合体の安定構造の予測を行い、71 位のアミノ酸であるアラニンが金属錯体に近接する事が示唆された。そこで金属錯体-apo-Mb 複合体の安定性を高めるために、71 位のアラニンをグリシンで置換した A71G Mb を構築した。最終的に、シッフ塩基鉄錯体(III)-apo-A71G Mb の結晶化に成功し、X線結晶構造解析の結果、当初予想したとおり、金属錯体が蛋白質内部に存在しており、錯体の配位子に導入された 3,3'-位のメチル基が 107 位のイソロイシンを挟み込む様にして挿入されていることを明らかにしている。

非共有結合的な相互作用を利用する複合化の利点は、中心金属や配位子を変えることで機能制御が行える点である。そこで、シッフ塩基配位子上に置換基を導入した鉄錯体を用いて複合体を構築し、配位子の置換基が、鉄へのシアンイオンの結合過程に与える影響について検討した。その結果、各複合体へのシアンイオンの結合速度が配位子の構造によって制御可能であることを見出している。

続いて、有機溶媒中で酸化反応触媒として働くクロム(III)シッフ塩基錯体-apo-Mb 複合体を作成し、人工酸化酵素の構築を目指した。X線結晶構造解析により、複合体の構造を明らかにし、この複合体を用いてチオアニソールの酸化反応を行い、不斉酸化反応触媒として機能させる事に成功した。

面接による試験は、出願者に学位論文の内容を約 1 時間で発表してもらい、その後、蛋白質内部の空間に金属錯体を挿入するための戦略、蛋白質のミューテーションによる化学反応場の設計、得られた酵素触媒の活性などの詳細を中心に 1 時間にわたって質疑応答を行い、活発な論議が展開された。多面的な質問に対し的確に答えると共に、今後の研究の方向・解決すべき課題に対しても確固とした考えを持っていると判断された。

本論文は英語で書かれており、既に発表されている論文(英文)とともに英語力を審査し、語学力に何等問題はないと判定された。

公開発表会における発表も良く整理されており、合格と認定した。