The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Preparing Artificial Biocatalysts for Guaiacol Oxidation and Phenylacetylene Polymerization by Placing a Metal Complex within an Engineered Hemoprotein Cavity
Author(s)	福本, 和貴
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34492
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　福本　和貴　　）	
論文題名	Preparing Artificial Biocatalysts for Guaiacol Oxidation and Phenylacetylene Polymerization by Placing a Metal Complex within an Engineered Hemoprotein Cavity （ヘムタンパク質内部空間への金属錯体導入に基づくグアイアコール酸化およびフェニルアセチレン重合をつかさどる人工生体触媒の構築）

論文内容の要旨

金属酵素は、金属錯体あるいは金属イオンを補因子として含むタンパク質であり、水中、常温、常圧という温和な条件下で、高活性・特異的に物質変換する生体触媒である。しかしながら、天然の金属酵素では適用不可能な反応もある。天然の金属酵素とは異なる反応性と選択性をもつ生体触媒を自在に構築することができれば、その有用性は飛躍的に広がる。人工的に開発した生体触媒の有力な候補の一つに、ユニークな内部空間を有する天然タンパク質に対して合成金属錯体を導入した融合型人工生体触媒があげられる。

本著者は、合成金属錯体を導入するタンパク質としてヘムタンパク質に着目した。ヘムタンパク質は、補因子としてポルフィリン鉄錯体が結合し、合成金属錯体の固定に適した疎水性の内部空間を有する。本論文では、天然金属酵素の触媒活性を凌ぐ人工生体触媒の創製を目的として、酸素貯蔵タンパク質であるミオグロビンに対し、高効率な触媒的酸化活性の付与を実現し（第一章）、さらに天然にはない触媒活性を有する人工生体触媒の創製を目的として、βバレルタンパク質ニトロバインディンの内部空間へロジウム錯体を導入した人工生体触媒を構築し、立体選択的な重合反応を達成した（第二章、第三章）。

第一章では、天然金属酵素の触媒活性を凌ぐ人工生体触媒の創製を目的として、西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）の酸化活性を超える人工生体触媒の構築を実施した。HRPは高い酸化活性を有するヘムタンパク質として知られている。一方で、酸素貯蔵タンパク質であるミオグロビンは、同様の補因子ヘムを有していながら酸化活性はほとんどない。そこで本著者は、過酸化水素を活性化する仕組みをもつミオグロビン変異体に対し、大きな基質結合部位を片方のプロピオン酸に有する人工ヘムを挿入した人工生体触媒を構築した。得られた人工生体触媒は、天然の酸化酵素HRPを超える非常に高い触媒活性を示した。また反応速度論の解析から、その非常に高い触媒活性は、基質の親和性と活性種の反応性の向上に起因していることを明らかにした。

第二章では、天然とは異なる触媒活性を有する人工生体触媒の創製を実施した。ニトロバインディンと呼ばれる強固なβバレル構造を持つタンパク質内部空間へロジウム錯体を共有結合を介して導入することにより、フェニルアセチレンの重合反応が可能な工生体触媒を構築した。さらに人工生体触媒による重合反応では、通常のロジウム錯体のみでは生成しないトランス体を約50%含むポリマーが得られたことから、ロジウム錯体近傍のアミノ酸残基が重合反応の立体選択性に影響を及ぼすことを見出した。

第三章では、第二章で得られた知見に基づいて、タンパク質内部空間をアミノ酸残基の置換によって再設計することで、立体選択的なフェニルアセチレンの重合反応をつかさどる人工生体触媒の構築を達成した（トランス体80%）。さらに再設計した人工生体触媒のX線結晶構造解析にも成功し、ロジウム錯体が96番目のシステイン残基との共有結合を介してタンパク質内部空間に固定されていることが支持された。またMD計算の結果から、トランス選択性の向上にはロジウム錯体がタンパク質の内部空間に安定に位置し、かつ基質のアプローチを制御可能な内部空間が必要であることを示した。

以上、本著者はタンパク質と合成金属錯体の融合型人工生体触媒における金属中心近傍の第二配位圏（金属錯体の配位子やタンパク質内部空間のアミノ酸残基）を精密に再設計することで、天然の酵素より高活性な酸化反応、ならびに天然の酵素にはみられない高立体選択的な重合反応を実現した。結言では、第一章から第三章を総括するとともに、本論文の成果をふまえ、今後、より高活性・高選択的で魅力的な物質変換を可能にする人工生体触媒の構築が期待されることを述べた。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　福本　和貴　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	林　高史
	副 査	教授	平尾　俊一
	副 査	教授	宇山　浩
	副 査	教授	南方　聖司
	副 査	教授	井上　豪
	副 査	教授	今中　信人
	副 査	教授	桑畑　進
	副 査	教授	町田　憲一
	副 査	教授	安藤　陽一
	副 査	教授	古澤　孝弘
	副 査	教授	Ulrich Schwaneberg　(RWTH Aachen University)

論文審査の結果の要旨

金属酵素は、金属錯体あるいは金属イオンを補因子として含むタンパク質であり、水中、常温、常圧という温和な条件下で、高活性・特異的に物質変換する生体触媒である。しかしながら、天然の金属酵素では適用不可能な反応もある。天然の金属酵素とは異なる反応性と選択性をもつ生体触媒を自在に構築することができれば、その有用性は飛躍的に広がる。人工的に開発した生体触媒の有力な候補の一つに、ユニークな内部空間を有する天然タンパク質に対して合成金属錯体を導入した融合型人工生体触媒があげられる。

本研究では、合成金属錯体を導入するタンパク質としてヘムタンパク質に着目している。ヘムタンパク質は、補因子としてポルフィリン鉄錯体が結合し、合成金属錯体の固定に適した疎水性の内部空間を有する。本論文では、天然金属酵素の触媒活性を凌ぐ人工生体触媒の創製を目的として、酸素貯蔵タンパク質であるミオグロビンに対し、高効率な触媒的酸化活性の付与を実現し（第一章）、さらに天然にはない触媒活性を有する人工生体触媒の創製を目的として、βバレルタンパク質ニトロバインディンの内部空間へロジウム錯体を導入した人工生体触媒を構築し、立体選択的な重合反応を達成している（第二章、第三章）。

第一章では、天然金属酵素の触媒活性を凌ぐ人工生体触媒の創製を目的として、西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）の酸化活性を超える人工生体触媒の構築を実施している。HRP は高い酸化活性を有するヘムタンパク質として知られている。一方で、酸素貯蔵タンパク質であるミオグロビンは、同様の補因子ヘムを有していながら酸化活性はほとんどない。そこで本著者は、過酸化水素を活性化する仕組みをもつミオグロビン変異体に対し、大きな基質結合部位を片方のプロピオン酸に有する人工ヘムを挿入した人工生体触媒を構築している。得られた人工生体触媒は、天然の酸化酵素 HRP を超える非常に高い触媒活性を示している。また反応速度論の解析から、その非常に高い触媒活性は、基質の親和性と活性種の反応性の向上に起因していることを明らかにしている。

第二章では、天然とは異なる触媒活性を有する人工生体触媒の創製を実施している。ニトロバインディンと呼ばれる強固なβバレル構造を持つタンパク質内部空間へロジウム錯体を共有結合を介して導入することにより、フェニルアセチレンの重合反応が可能な工生体触媒を構築している。さらに人工生体触媒による重合反応では、通常のロジウム錯体のみでは生成しないトランス体を約 50%含むポリマーが得られていることから、ロジウム錯体近傍のアミノ酸残基が重合反応の立体選択性に影響を及ぼすことを見出している。

第三章では、第二章で得られた知見に基づいて、タンパク質内部空間をアミノ酸残基の置換によって再設計することで、立体選択的なフェニルアセチレンの重合反応をつかさどる人工生体触媒の構築を達成している（トランス体 80%）。さらに再設計した人工生体触媒の X 線結晶構造解析にも成功し、ロジウム錯体が 96 番目のシステイン残基との共有結合を介してタンパク質内部空間に固定されていることが支持されている。また MD 計算の結果から、トランス選択性の向上にはロジウム錯体がタンパク質の内部空間に安定に位置し、かつ基質のアプローチを制御可能な内部

空間が必要であることを示している。

結言では、第一章から第三章を総括するとともに、本論文の成果をふまえ、今後、より高活性・高選択的で魅力的な物質変換を可能にする人工生体触媒の構築が期待されることを記述している。

以上、本論文では、タンパク質と合成金属錯体の融合型人工生体触媒における金属中心近傍の第二配位圏（金属錯体の配位子やタンパク質内部空間のアミノ酸残基）を精密に再設計することで、天然の酵素より高活性な酸化反応、ならびに天然の酵素にはみられない高立体選択的な重合反応を実施することが可能であることを示している。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。