



Title	Hemoproteins Containing Non-Natural Metalloporphyrinoids: Artificial Metalloenzymes for C-H Bond Hydroxylation/Amination and Olefin Cyclopropanation
Author(s)	香川, 佳之
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/96037
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (香川 佳之)	
論文題名	Hemoproteins Containing Non-Natural Metalloporphyrinoids: Artificial Metalloenzymes for C–H Bond Hydroxylation/Amination and Olefin Cyclopropanation (非天然金属ポルフィリノイド含有ヘムタンパク質によるC–H結合の水酸化とアミノ化およびオレフィン類のシクロプロパン化触媒反応)
論文内容の要旨	
ヘムタンパク質は鉄ポルフィリン錯体であるヘムを補因子として保有し、生体内において酸素貯蔵・運搬、電子伝達、代謝・生合成など多岐にわたる機能を担っている。近年では、ヘムタンパク質を改変し、非天然反応を促進する人工金属酵素の開発が活発に研究されている。本博士論文では、ミオグロビンの補因子であるヘムを非天然のポルフィリンやその類縁体の金属錯体である金属ポルフィリノイド錯体へと置換した再構成ミオグロビンを調製し、人工金属酵素およびその反応系の開発に関する研究成果を以下のように記載した。 第一章では、酸化還元電位に着目してミオグロビンの補因子を改変し、オレフィンのシクロプロパン化反応を評価した。ポルフィリンのピロールのβ位に電子求引基であるCF₃基を二つ有する鉄ポルフィリン錯体(FePor(CF₃)₂)をミオグロビンのアポ体に導入し、再構成体(rMb(FePor(CF₃)₂))を得た。天然ミオグロビン(nMb)と比較して、rMb(FePor(CF₃)₂)の酸化還元電位は100 mV程、正にシフトしていることが確認された。オレフィンのシクロプロパン化反応を評価した結果、rMb(FePor(CF₃)₂)はnMbおよび、より低い酸化還元電位を示す鉄ポルフィセン錯体含有再構成ミオグロビン(rMb(FePc))より、高い収率で生成物を与えた。特に1-オクテンを基質とした場合、rMb(FePor(CF₃)₂)はnMbの165倍の触媒回転数を示した。また、反応機構解析の結果、rMb(FePc)はイオニックな反応機構が示唆されたことに対し、rMb(FePor(CF₃)₂)はラジカル的な反応機構が示唆された。以上、第一章では、鉄中心の酸化還元電位に着目したヘムタンパク質の補因子改変が、シクロプロパン化触媒能の向上に効果的であることを示した。 第二章では、金属ポルフィセン錯体を有するミオグロビンによるC–H結合アミノ化反応を評価した。鉄、マンガン、コバルトポルフィセンを有するミオグロビンによる反応を比較すると、鉄錯体を有する再構成ミオグロビン(rMb(FePc))が最も高い触媒回転数を示した。nMbと比較してもrMb(FePc)は高い触媒回転数を示しており、最大の触媒回転数は5.7 x 10⁴に達した。速度論的反應評価により、rMb(FePc)はnMbの約4倍のk_{cat}値を示すことを明らかにした。以上より、ミオグロビンの補因子改変により、C–H結合アミノ化反応に対する活性が向上することを示した。 第三章では、過酸化水素を酸化剤としてC–H結合水酸化反応を促進するマンガンポルフィセン含有再構成ミオグロビン(rMb(MnPc))を、分子上酸素と水素から過酸化水素を生成するパラジウム金ナノ粒子触媒と組み合わせ、分子状酸素を末端酸化剤とするC–H結合酸化反応系を構築した。本触媒系は酸素・水素混合ガス雰囲気下において、エチルベンゼンのC–H結合酸化反応を触媒回転数3.6で達成した。どちらか一方の触媒のみではほとんど反応が進行せず、設計通り二つの触媒が協働して反応が進行していることが示唆された。以上、第三章では人工金属酵素と固体触媒のハイブリッド触媒系が機能し、分子上酸素を末端酸化剤とするC–H結合の酸化反応を促進することを示した。 第四章では、rMb(MnPc)によるエチルベンゼンの水酸化反応のエナンチオ選択性を向上させるため、分子動力学計算を駆使した変異体の設計に取り組んだ。鍵となる中間体である金属オキソ種と基質、周辺のアミノ酸残基を考慮して計算し、pro-<i>R</i>とpro-<i>S</i>状態のエネルギー差を基準に変異体候補を選定した。選定した変異体のエナンチオ過剰率(ee)を実験的に測定した。二回の計算と実験のサイクルにより、野生型ではS体に対して14%eeの選択性であったことに対し、F43A/H64I/V68F変異体がS体に69%ee、F46L/H64A変異体がR体に57%eeの選択性を示した。実験値と計算値のエネルギー差は中程度の相関が確認され、本手法が変異体の選定の指標となることが示唆された。高いeeを示した変異体のX線結晶構造解析の結果、基質結合部位の形状が計算モデルの構造と類似していることが明らかとなった。以上第四章では、エナンチオ選択性の向上をめざした、変異体の合理的設計手法を示した。 以上、本博士論文では、非天然の金属ポルフィリノイド補因子とタンパク質構造を有する人工金属酵素が種々の反応に対して、反応性や選択性を向上できることを示した。本研究において得られた結果は、金属錯体およびタンパク質構造の設計手法に対する知見を与え、人工金属酵素の合理的設計法の確立に寄与することが期待される。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (香 川 佳 之)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 林 高史
	副 査	教授 南方 聖司
	副 査	教授 藤内 謙光
	副 査	教授 桑畑 進
	副 査	教授 櫻井 英博
	副 査	教授 今中 信人
	副 査	教授 宇山 浩
	副 査	教授 佐伯 昭紀
	副 査	教授 中山 健一
	副 査	教授 古川 森也
	副 査	教授 能木 雅也
	副 査	教授 古澤 孝弘

論文審査の結果の要旨

ヘムタンパク質は鉄ポルフィリン錯体であるヘムを補因子として保有し、生体内において多岐にわたる機能を担っている。近年、ヘムタンパク質を改変した人工金属酵素が様々な反応を促進することが報告されている。本博士論文では、ミオグロビンのヘムを合成した金属ポルフィリノイド錯体(ポルフィリンやその類縁体の金属錯体)へと置換した再構成ミオグロビンをを用いた触媒反応について評価し、その成果を以下のように記載している。

第一章では、酸化還元電位に着目して補因子を改変し、オレフィンのシクロプロパン化反応を実施し、その結果について記述している。ポルフィリンのピロールのβ位に電子求引基である CF_3 基を二つ有する鉄ポルフィリン錯体($\text{FePor}(\text{CF}_3)_2$)をミオグロビンのアポ体に導入し、再構成体($\text{rMb}(\text{FePor}(\text{CF}_3)_2)$)を調製して、天然ミオグロビン(nMb)と比較して、 $\text{rMb}(\text{FePor}(\text{CF}_3)_2)$ の酸化還元電位は 100 mV ほど、正にシフトしていることをまず明らかとしている。次にオレフィンのシクロプロパン化反応において、 $\text{rMb}(\text{FePor}(\text{CF}_3)_2)$ は nMb および、より低い酸化還元電位を示す鉄ポルフィセン錯体含有再構成ミオグロビン($\text{rMb}(\text{FePc})$)よりも、高い反応性を示すことを確認しており、酸化還元電位が高いほど反応性が高いことを示している。特に 1-オクテンを基質とした場合、 $\text{rMb}(\text{FePor}(\text{CF}_3)_2)$ は nMb の 165 倍の触媒回転数を得たことを示している。また、反応機構解析により、 $\text{rMb}(\text{FePc})$ はイオンの反応機構、 $\text{rMb}(\text{FePor}(\text{CF}_3)_2)$ はラジカル的な反応機構でそれぞれ進行していることを考察している。以上、第一章では、鉄中心の酸化還元電位に着目したヘムタンパク質の補因子改変が、シクロプロパン化触媒能の向上に効果的であることを示している。本結果は、酸化還元電位とシクロプロパン化反応の反応性との相関関係を示す興味深い結果である。

第二章では、C-H 結合アミノ化反応への反応性向上をめざし、金属ポルフィセン錯体を有するミオグロビンを評価している。鉄ポルフィセン錯体を有する再構成ミオグロビン($\text{rMb}(\text{FePc})$)が nMb やマンガン、コバルトポルフィセン錯体を有するミオグロビンよりも高い触媒回転数を示すことを見出し、最大の触媒回転数は 5.7×10^4 であり、速度論的評価により、 $\text{rMb}(\text{FePc})$ は nMb の約 4 倍の k_{cat} 値を示すことを明らかとしている。本結果は、ミオグロビンの補因子改変により、C-H 結合アミノ化反応に対する活性が向上することを示している。

第三章では、過酸化水素を酸化剤として C-H 結合水酸化反応を促進するマンガンポルフィセン含有再構成ミオグロビン($\text{rMb}(\text{MnPc})$)を、分子上酸素と水素から過酸化水素を生成するパラジウム金ナノ粒子触媒と組み合わせ、分子状酸素を末端酸化剤とするエチルベンゼンの C-H 結合酸化反応系を構築している。本触媒系は二つの触媒が共存している場合のみ反応を促進し、設計通り二つの触媒が協働して反応を進行させることを明らかにしている。本結果は、人工金

属酵素が固体触媒と協働して機能することを示し、温和な酸化剤である分子上酸素を末端酸化剤とした C–H 結合の酸化反応を促進することを明らかにしている。

第四章では、rMb(MnPc)によるエチルベンゼンの水酸化反応のエナンチオ選択性の向上をめざし、分子動力学計算を駆使した変異体の設計に取り組んでいる。酸化活性種と基質、周辺のアミノ酸残基を考慮して計算し、pro-*R* と pro-*S* 状態のエネルギー差を基準に変異体候補を選定し、選定した変異体のエナンチオ過剰率(ee)を実験的に測定している。野生型の *S* 体へ 14%ee と比較し、F43A/H64I/V68F 変異体が *S* 体に対して 69%ee、F46L/H64A 変異体が *R* 体に対して 57%ee まで選択性を向上させている。実験値と計算値のエネルギー差は中程度の相関を確認し、本手法の有用性を示している。また、高い選択性を示した変異体の結晶構造を確認し、基質結合部位の形状が計算モデルの構造と類似していることが明らかとしている。本結果は、人工金属酵素の開発において困難であるタンパク質構造の設計へとつながる結果である。

以上、本博士論文では、非天然の金属ポルフィリノイド補因子とタンパク質構造を有する人工金属酵素が高い反応性や選択性を実現できる有望な触媒であることを実証している。本研究成果は、金属錯体およびタンパク質構造の設計手法に対する知見を与え、人工金属酵素の合理的設計法の確立に寄与することが期待される。よって本論文は博士論文として高い価値があるものと認める。