

### 金属酵素の創成と機能制御

Molecular Design and Regulation of Metalloenzyme Activities



渡辺芳人氏は鉄貯蔵蛋白質フェリチンに着目し、蛋白質内部に形成される空間に有機金属化合物を触媒として導入した酵素、すなわち**有機金属酵素**という新たな概念を創出した。また、基質特異性の高いシトクロム P450 の特異性を自在に変化させるために **decoy 分子** (擬似基質) の活用という新たな概念を提案し、「本来、酸化されることのない外来基質 (有機分子) を水酸化する P450 の反応系」の創出に成功した。この反応系を用いてベンゼンの選択的なフェノールへの高効率変換や、不活性有機分子であるプロパンやエタンの水酸化に成功した。以下に同氏のこれらの業績を紹介する。

#### 1. フェリチンを用いた有機金属酵素創成

鉄貯蔵蛋白質フェリチン (Fr) は内径が約 8 nm、分子量約 50 万の球状構造蛋白質で、鉄イオン以外にも様々な金属イオンを取り込む。そこで、渡辺氏は  $Pd^{2+}$  を Fr に取り込ませ、それを還元することによって、Fr 内部に平均 2 nm の Pd(0) の金属クラスターを作成した。Pd•Fr はオレフィン類の接触水素化を水中で触媒し、置換基の大きさに依存する触媒活性を示す (最大で毎分 350 回/蛋白質) ことを見いだした。さらに、Fr 内部への  $Pd^{2+}$  集積過程の解明を目指して、50, 100, 200 当量の  $Pd^{2+}$  で処理した  $Pd^{2+}$ •Fr 複合体の X 線結晶構造解析が行われ、Fr が立体構造を変えながら特定のシステインやヒスチジン、グルタミン酸が  $Pd^{2+}$  に順次配位していく様子を明らかにした。

さらに、渡辺氏は有機金属化合物である二量体の  $[Pd(allyl)Cl]_2$  を加えることにより、 $Pd(allyl)$ •Fr 複合体を作成した。これは、pH 9~10、50 °C の条件で鈴木カップリングに対して高い触媒活性を示した。例えば、この触媒を使って *p*-トアニリンとフェニルホウ酸を反応させると、Fr 当たりの TOF が約 3500 回で *p*-アミノビフェニルが選択的に得られた。ほかにも、 $[Rh(nbd)Cl]_2$  錯体もフェリチン内部に取り込まれて複合体を形成し、その複合体がフェニルアセチレンの重合反応を触媒することを見いだした。同氏の研究は蛋白質内部空間を構成するアミノ酸側鎖を配位子として触媒となる有機金属化合物を固定し、天然には存在しない有機金属酵素を創り上げることが可能であることを示すものであり、生物無機化学に新たな分野を創出した。

#### 2. 第一世代 Decoy を用いる P450 の反応系

シトクロム P450 (P450) は、一酸素添加反応を触媒するヘム酵素群である。P450 の中でも細菌由来の P450BM3 は触媒活性が非常に高くバイオ触媒としての利用が期待されるが、長鎖脂肪酸に対する基質特異性が高いため、合成反応に利用するには基質特異性を変える必

要性がある。部位特異的変異導入や進化分子工学的手法で特異性を変えことも可能であるが、必ずしも目的とする変異体を得られるわけではない。これに対して渡辺氏は、自ら decoy と命名した擬似基質を使って特異性を制御する新たな反応系を構築した。

渡辺氏は、decoy 分子として長鎖脂肪酸のすべての水素原子をフッ素に置き換えた長鎖パーフルオロアルキルカルボン酸を考案した。この化合物は P450BM3 によって水酸化されることはないが、活性部位に取り込まれる。この decoy 分子を取り込ませた P450BM3 を触媒とすると、炭素数 10 の decoy 分子用いた場合に毎分 67 回転/酵素でプロパンから 2-プロパノールが得られた。さらに、反応活性は低いものの、decoy 分子を変化させることによってメタンをメタノールに変換することにも成功した。これにより、decoy 分子の鎖長によって基質結合部位の空間をある程度制御でき、P450BM3 の基質特異性を調整できることを示した。

ベンゼンの直接酸化によるフェノール製造法の開発が進められているが、フェノールがさらに水酸化されてしまうことが多い。渡辺氏は、炭素数 12~8 のパーフルオロアルキルカルボン酸を decoy 分子とすることにより、P450BM3 を用いてベンゼンを選択的にフェノールに変換することに成功した。炭素数 9 の decoy 分子を用いた場合、1 分間当たりの触媒回転数は 120 回に達する。

#### 3. 第二、第三世代 decoy 分子の開発

渡辺氏はパーフルオロアルカノイル基でアミノ基を保護した  $\alpha$ -アミノ酸 (第二世代 decoy 分子) を取り込んだ P450BM3 の結晶構造解析から「カルボキシル基を  $\alpha$ -アミノ酸で修飾すると、カルボン酸のアルキル鎖の末端が活性中心に接近できなくなるので、直鎖アルキルカルボン酸は酸化されない」と考え、*N*-アルカノイル- $\alpha$ -アミノ酸も decoy 分子として利用できることを着想した。実際、鎖長の異なるアルキルカルボン酸をアミノ酸で修飾した一連の化合物は第三世代の decoy 分子として機能することを示し、これを取り込んだ P450BM3 を用いることにより、エタンやベンゼンの高効率な水酸化を実現した。

このように、渡辺芳人氏の金属酵素の分子設計や機能制御についての研究は、これまでの研究に囚われない化学の視点に立った日本オリジナルの新たな方法論を提示しているという点で極めて優れており、日本化学会賞に値するものと認められた。