

電子伝達体依存型酵素とポリオキソメタレートを融合した環境調和型触媒の開発

湊 拓生*

Development of Green Catalysts Based on Coenzyme-dependent Enzymes and Polyoxometalates

Takuo MINATO*

Gram-negative bacterial cells were grown and utilized as a biocatalyst for hydrogenation of carbon dioxide to produce formate. The catalytic reaction proceeded under very mild reaction conditions (0.1 MPa, pH 7.0, 30°C), and formate was produced efficiently and selectively ($110 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{protein}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Isolation of various enzymes is planned as a next step.

In a synthesis of green catalysts, new synthesis method for constructing large hetero-multinuclear metal oxo clusters within lacunary polyoxometalates was developed. By reacting $[(\text{SiW}_9\text{O}_{34})_2\text{Fe}]^{17-}$ with Mn^{3+} and Ln^{3+} (Ln = Gd, Tb, Dy, Lu), tetradecanuclear trimetallic clusters $\{\text{Fe}_2\text{Mn}_{10}\text{Ln}_2\}$ within four $[\text{SiW}_9\text{O}_{34}]^{10-}$ units were successfully synthesized. Since these structures possess 12 transition metal cations, it is expected that $\{\text{Fe}_2\text{Mn}_{10}\text{Ln}_2\}$ cores can act as multi-electron redox catalysts by combining coenzyme-dependent enzymes.

1. 研究背景と目的

電子伝達体は細胞呼吸や光合成など生体内のあらゆる酸化還元反応において電子の授受を担う重要な化合物群である。一種類の電子伝達体が複数の酵素に関わっていることから、電子伝達体の酸化還元を制御することは生体内で様々な高難度反応を可能とする種々の電子伝達体依存型酵素の触媒特性を制御することに繋がるため、特にファインケミカル合成において工業的に着目されている。しかし、反応進行のためには量論量の高価な電子伝達体が必要となるため、酸化還元反応により電子伝達体を再利用するシステムを共存させなければならず、現行法ではグルコースデヒドロゲナーゼによるグルコースを用いた NADP⁺の還元など、量論量の廃棄物生成や、複数種の酵素利用に伴う収率低下といった問題を抱えている。ポリオキソメタレート (POM)は前周期遷移金属 (W^{6+} , Mo^{6+} 等)で構成されるアニオン性の分子状金属酸化物クラスターで、原子レベルでの構造制御が可能であることからこれまでに様々な触媒が開発されてきた。また、POMは多電子的な酸化還元反応による電子とプロトンの安定貯蔵や、構成元素と構造の選択による酸化還元電位の調節ができることから、目的の酸化還元反応に応じた精密な構造設計が可能である。さらに重要なこととして、POMはアニオン性であるためタンパク質を構成するアミノ酸側鎖と相互作用することが知られており、安定なタンパク質-POM複合体の形成が可能である。しかし、種々のタンパク質-POM複合体が報告されてきた一方で、構造制御したPOM触媒をタンパク質と複合化した報告はこれまでにない。本研究では、タンパク質単離技術^[1]と精密無機合成技術^[2]を融合させることによって、水素や酸素を還元剤/酸化剤とした廃棄物が水のみの高難度触媒反応の達成が可能になると考え「電子伝達体依存型酵素とポリオキソメタレートを融合した環境調和型触媒の開発」を目的として研究を行った。

2. 細菌培養と生体触媒特性

まずグラム陰性細菌の培養を行い、回収細胞を用いた水素酸化特性評価を行ったところ、二酸化炭素存在下ギ酸が効率よく生成することが明らかとなった。ゲノム解析を行ったところ、水素とギ酸の代謝に関する8つの遺伝子(3つのHyd-1,2,3, 2つのFDH-H, 2つのFDH-N, 1つのFDH-O)を特定し、*Escherichia coli*の遺伝子と高い相同性があることを明らかにした。細胞を超音波破砕することで可溶性画分と膜画分に分離し、メチルビオロゲンを用いた酵素分析を行ったところ、可溶性画分の水素酸化活性 ($4.98 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)は膜画分の活性 ($0.36 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)よりも大きく、また可溶性画分のギ酸酸化活性 ($0.51 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)も膜画分の活性 ($0.03 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)よりも大きかった。したがって、可溶性画分中に含まれるHyd-3とFDH-Hの複合体FHLが細胞のギ酸生成に主に寄与していることが示唆された。

2023年3月6日 受理

* 豊田理研スカラー

広島大学大学院先進理工系科学研究科応用化学プログラム

細胞を用いたギ酸生成の最適条件探索を検討した結果、水素と二酸化炭素の比率が 7:3 (0.1 MPa), pH 8.0 の時ギ酸生成量が最大となった。反応溶液を HPLC で分析したところ、生成物はギ酸のみで副生物は観測されなかった。重水で希釈した反応溶液の ^1H スペクトルでは 8.35 ppm に、 ^{13}C NMR スペクトルでは 170.9, 160.2, 124.6 ppm にそれぞれ HCOO^- の α 水素、 HCOO^- , HCO_3^- , CO_2 に帰属されるシグナルが観測され、ギ酸の選択的生成が支持された (図 1)。さらに、反応途中に細胞をろ過したところギ酸が生成しなくなったことから、細胞触媒は不均一系触媒として機能していることが明らかとなった。ギ酸濃度は反応 24 時間で $2.62 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{protein}}^{-1}$ に達し、穏和な条件で選択的ギ酸生成が可能な細胞触媒としては最も高い値を示した。今後は細胞から種々の酵素を単離し、生化学的・構造学的な分析を行う予定である。

3. 異種金属多核構造含有 POM の合成

目的とする触媒反応に応じて多電子的な酸化還元特性を調節するためには、金属の核数や種類を原子レベルで制御した多核構造を設計通りに構築する必要があるが、従来の合成手法では核数が大きな構造を精密に合成することはできなかつた。金属カチオンを「糊」のように機能させ金属多核構造同士を接続することができればより大きな金属多核構造を設計通りに構築できると考え、剛直な無機多座配位子である POM を配位子とした新規異種金属多核構造合成法の開発を行った。 $[(\text{SiW}_9\text{O}_{34})_2\text{Fe}]^{17-}$ に Mn^{3+} と Ln^{3+} ($\text{Ln} = \text{Gd}, \text{Tb}, \text{Dy}, \text{Lu}$) を逐次的に反応させたところ、POM アニオン骨格の異性化を伴わずに巨大な $\{\text{Fe}_2\text{Mn}_{10}\text{Ln}_2\}$ コアを有する 4 量体構造 (I) の合成に成功した。I は $[(\text{SiW}_9\text{O}_{34})_2\text{Fe}]^{17-}$ に Mn^{3+} を導入した $\{\text{FeMn}_4\}$ 構造 2 つが、 Mn^{3+} と Ln^{3+} によって架橋された構造となっており、添加した過剰量の金属カチオンが異種金属多核構造 $\{\text{FeMn}_4\}$ の「糊」として機能することによって合成されたと考えられる。単結晶 X 線構造解析, IR, ESI mass, 元素分析の結果、 $\{\text{Fe}_2\text{Mn}_{10}\text{Ln}_2\}$ コアには 4 つの酢酸配位子が配位していることが明らかとなった (図 2)。直流磁化率測定と bond valence sum (BVS) 値から、酢酸配位子が配位している Mn はどちらも 2 価であることが示唆された。さらに、酸を I に添加することにより 2 つの酢酸配位子を脱離させることが可能であった (図 2)。脱離後の Mn にはアクア配位子が配位しており、直流磁化率測定と BVS 値から Mn は 2 価から 3 価に酸化されていることが示唆されたため、特異な触媒活性点として利用できることが示唆された。今後は合成した金属多核構造の電気化学的な分析を行うことにより多電子的酸化還元特性を明らかにし、酵素との複合化による新規触媒の構築を模索する予定である。

4. まとめ

今回用いた細胞は極めて穏和な条件で水素と二酸化炭素から選択的かつ高効率なギ酸生成が可能な生体触媒として利用できることを見出した。また、剛直な無機多座配位子を用いた新規異種金属多核構造構築法の開発も行い、3 種 14 核もの巨大な異種金属多核コアを有する構造を、最終生成物の構造予測が可能な逐次的手法によって合成することができた。今後は、細胞からの酵素単離、生化学的・構造学的分析や、異種金属多核構造の酸化還元特性・触媒特性の分析を引き続き行い、酵素と POM 触媒を融合させた高活性な環境調和型触媒の開発を目指す。

REFERENCES

- 1) T. Minato, T. Teramoto, N. Adachi, N. K. Hung, K. Yamada, M. Kawasaki, M. Akutsu, T. Moriya, T. Senda, S. Ogo, Y. Kakuta and K.-S. Yoon, *Commun. Biol.*, **4** (2021) 1238.
- 2) T. Minato, S. Daniel, N. Mizuno, K. Yamaguchi, L. Cronin and K. Suzuki, *J. Am. Chem. Soc.*, **143** (2021) 12809.

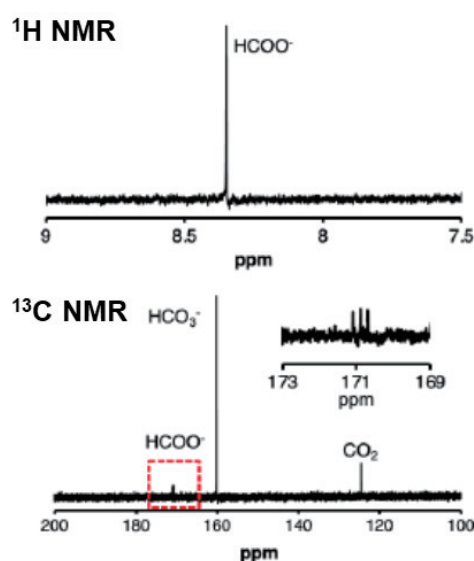


図 1 細胞によるギ酸生成反応溶液の分析。

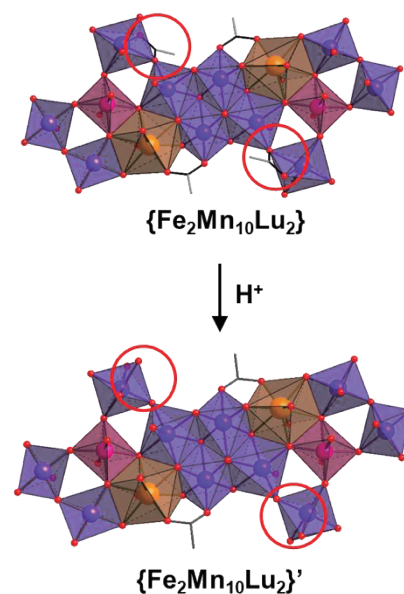


図 2 単結晶 X 線構造解析による I の $\{\text{Fe}_2\text{Mn}_{10}\text{Lu}_2\}$ コア。