

研究種目：特定領域研究
研究期間：2006～2009
課題番号：18065012
研究課題名（和文） 人工補助因子による酵素活性中心の制御と新規触媒能の開発
研究課題名（英文） Creation of Natural-Artificial Molecules Conjugates for Development of Novel non-Natural Function

研究代表者

中島 洋 (Hiroshi Nakajima)
名古屋大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：00283151

研究分野：機能協奏触媒

科研費の分科・細目：460 A04

キーワード：チトクロム *c*、アズリン、人工補助因子、バイオコンジュゲーション、シグナル変換、

1. 研究計画の概要

本研究では、従来のアミノ酸置換による酵素活性中心の改変手法とは異なり、合成化学的手法による、活性中心の修飾と創造の方法論確立を目的としている。申請期間内での具体的な課題としては、(1) 対象の酵素に基質以外の分子（補助分子）を取り込ませ、この分子の特性が酵素の性質と協同的に機能することによる酵素機能向上と改変、(2) 天然の活性中心を非天然分子や金属錯体に置換した人工機能性タンパク質の創成、を目指している。

2. 研究の進捗状況

18-20年度の研究では、2-(1)の課題に対する成果として、一原子酸素添加酵素であるシトクロム P450_{BSP}に本来の基質（ミリスチン酸）とは異なる様々な脂肪酸を補助分子として取り込ませ、元の機能とは異なるペルオキシダーゼ活性やカタラーゼ活性を賦与することに成功した。2-(2)にあたる研究では、① 酸素分子貯蔵タンパク質であるミオグロビンの天然補助因子であるヘム（鉄プロトポルフィリン IX）とは、全く異なる構造・金属中心を有する有機金属錯体をタンパク質内の空孔に取り込み、安定に固定することに成功した。得られた複数のタンパク質-有機金属複合体の結晶構造のから非天然の補助因子をタンパク質に取り込むための条件を見出し、安定な複合体形成のための分子設計指針を見出した。② 電子伝達タンパク質の一種であるアズリンと温度応答性ポリマーとの複合体を用いて、温度変化に伴うポリマーの構

造変化をタンパク質間の電子移動速度の変化へと変換する仕組みを構築した。この仕組みは、天然のセンサータンパク質が、センシングにともなう高次構造変化を介して、分子内シグナル変換を行い、生体内シグナル分子を生成することにヒントを得ている。すなわち、アズリンとその酸化還元パートナーであるチトクロム *c* との会合体形成を一つの高次構造と捉え、温度変化に伴う温度応答性ポリマーの構造変化によって、この会合体形成に摂動を与え、タンパク質間の電子移動速度を変化させる。この場合、温度変化は、最終的にタンパク質間の電子移動速度へとシグナル変換されている。以上のように本研究では、これまでの研究助成期間で、様々なタイプの人工分子を酵素、分子貯蔵タンパク質、電子伝達タンパク質の活性中心へと導入し、非天然型機能の創出を実現してきた。残された助成期間では、実現したシグナル変換能を、センサーデバイスとして利用するための仕組み作りに注力する予定である。

3. 現在までの達成度

18-20年度の研究は、おおむね順調に進展している。2でも述べたとおり、本研究の目的である、変異導入法に依らないタンパク質の機能改変法については、酵素のみならず、他の機能を有するタンパク質にまで適応可能であり、用いる修飾分子についても、有機小分子、金属錯体、機能性高分子と様々な人工補助分子の導入が可能であることを確認し、非天然機能の導入を実現してきた。これらの成果は、助成金申請の段階で述べた研究

計画におよそ沿ったものである。残された助成期間では、得られた知見の応用を見据えた研究をおこない研究計画の段階以上の研究到達度を実現したいと思う。

4. 今後の研究の推進方策

3で述べたとおり、本研究の次の課題は、創出した機能を実際に利用可能な仕組みへと展開することであり、残り1年間では、シグナル変換能を、センサーデバイスとして利用するための仕組み作りに注力する。具体的には、(1) 創出したシグナル変換機構の電極への集積を図り、センサーデバイスとして利用可能な仕組みを構築する。(2) タンパク質の修飾に用いる環境応答性分子を温度応答性以外のものにも展開し、シグナル変換機構の汎用性を高める、を推進する。

5. 代表的な研究成果

〔雑誌論文〕(計 10 件) 以下の 6 件は、代表的なもの。

- (1) N. Rosenberger, A. Studer, N. Takatani, H. Nakajima, Y. Watanabe, "Azurin-Poly (N-isopropylacrylamide) Conjugates by Site-Directed Mutagenesis and their Temperature Dependent Behavior in Electron Transfer Processes" *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, **48**, 1946-1949. (査読あり)
- (2) Y. Tokita, J. Shimura, H. Nakajima, Y. Goto, Y. Watanabe, "Mechanism of intramolecular electron transfer in the photoexcited Zn-substituted cytochrome c: Theoretical and experimental perspective", *J. Am. Chem. Soc.* 2008, **130**, 5302-5310. (査読あり)
- (3) H. Nakajima, Y. Ichikawa, Y. Satake, N. Takatani, SK. Manna, J. Rajbongshi, S. Mazumdar, Y. Watanabe, "Engineering of *Thermus thermophilus* Cytochrome c(552): Thermally Tolerant Artificial Peroxidase", *ChemBioChem* 2008, **9**, 2954-2957. (査読あり)
- (4) Y. Satake, S. Abe, S. Okazaki, N. Ban, T. Hikage, A. Suzuki, T. Yamane, H. Nishiyama, H. Nakajima and Watanabe, Y.; Incorporation of a pbebox rhodium complex into apo-myoglobin affords a stable organometallic protein showing unprecedented arrangement of the complex in the cavity. *Organometallics* 2007, **26**, 4904-4908. (査

読あり)

- (5) O. Shoji, T. Fujishiro, H. Nakajima, M. Kim, S. Nagano, Y. Shiro, Y. Watanabe, "Hydrogen Peroxide-Dependent Monooxygenations by Tricking the Substrate Recognition of Cytochrome P450BS_β", *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, **46**, 3656-3659. (査読あり)
- (6) T. Ueno, N. Yokoi, M. Unno, T. Matsui, Y. Tokita, M. Yamada, M. Ikeda-Saito, H. Nakajima, Y. Watanabe, "Design of metal cofactors activated by a protein-protein electron transfer system", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2006, **103**, 9416-9421. (査読あり)

〔学会発表〕(計 23 件) うち 6 件を掲載。

- (1) H. Nakajima, "Single protein based photo-switching device constituted with zinc cytochrome c and HOOC-SAM electrode", IUMRS-ICA 2008, Dec. 11, 2008, Nagoya.
- (2) 中島 洋, 「タンパク質の挙動を化学の立場で知る、造る、使う」、バイオインスパイアードフロンティア会議、2007年12月15日、福岡
- (3) 中島 洋, 「好熱菌由来タンパク質を基盤骨格に用いた人工耐熱性ペルオキシダーゼ創成の試み」、第40回酸化反応討論会、2007年11月18日、奈良
- (4) H. Nakajima, "Creation of artificial metalloenzyme", Invited lecture in Munster University, Mar. 25, 2007, Germany.
- (5) 中島 洋, 「好熱菌由来タンパク質の利用」、日本化学会第87春季年会イブニングセッション、2007年3月27日、大阪
- (6) 中島 洋, 「耐熱菌由来タンパク質チトクロム c₅₅₂ を基盤タンパク質に用いた人工金属酵素の創製」生物無機化学サマースクール招待講演、2006年8月、神戸

〔図書〕(計 2 件)

- (1) 渡辺芳人、中島 洋 「酵素反応の速度と反応機構」“触媒便覧 第4章”、講談社サイエンティフィック、2008
- (2) 中島 洋、渡辺芳人 「好熱菌由来タンパク質を化学の視点で利用する」学術月報 61, 1, 2008.