

平成 22 年 5 月 1 日現在

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 (NAKAJIMA HIROSHI)  
 名古屋大学・大学院理学研究科・准教授  
 研究者番号：00283151

研究成果の概要（和文）：本研究では、従来のアミノ酸置換によるタンパク質活性中心の改変手法に加え、合成化学的手法による活性部位の修飾と創造、並びに人工機能化タンパク質の耐熱化、耐久性向上を目指した。研究助成期間では、(1) 非天然金属錯体とタンパク質との複合化による人工有機金属錯体の創出と非天然触媒反応の開発 (2) 環境応答性高分子と電子伝達タンパク質との複合化による、人工センサータンパク質の開発 を実現し、さらに(3) 好熱菌由来タンパク質を基盤分子として利用することで、機能性タンパク質の耐熱・耐久化が可能であることを示した。

研究成果の概要（英文）：A goal of the present study is to establish novel technologies of protein engineering that are distinguishable from conventional modification methods such as site directed mutagenesis. Achievements are summarized as followings: (1) Creation of organometallic proteins bearing artificial metal complexes, and development of their catalytic reactions, (2) Creation of signal transduction system consisting of electron transfer proteins and an environment responsive polymer, (3) Application of proteins from thermophiles to construct robust artificial proteins amenable to future practical uses. The achievements of the present work will contribute to further development of the protein engineering in both basic and practical aspects.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	8,000,000	0	8,000,000
2007 年度	8,000,000	0	8,000,000
2008 年度	8,000,000	0	8,000,000
2009 年度	8,000,000	0	8,000,000
年度			
総計	32,000,000	0	32,000,000

研究分野：機能協奏触媒

科研費の分科・細目：特定領域研究 460 A04

キーワード：バイオコンジュゲーション、好熱菌由来タンパク質、耐熱性人工酵素、センサータンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

酵素をはじめとするタンパク質を機能改変し、有用な機能性タンパク質に造り変える試みは、基礎的な研究段階から、実際の物質

生産への応用にも広がりつつある。機能改変の主な手法は、遺伝子改変に基づく変異導入であり、なかでも部位特異的変異導入は、近年極めて身近な研究手法となっている。ただ、

元の機能の劇的な改変を目指すような大規模な変異導入は、タンパク質の安定性を著しく損なうため、生合成段階で分解されることが多く、変異導入だけで、タンパク質を自在に造り変えることは難しい。このため、目的とする機能性タンパク質を自在に造り出すには、変異導入法に加え、様々なタンパク質機能改変手法を確立する必要があった。また、機能化タンパク質の応用を考慮すれば、その熱的安定性が重要であり、機能化タンパク質の耐熱・耐久性向上を実現する方法論の提案も重要な課題であった。

## 2. 研究の目的

以上の背景に基づき、本研究では、従来の変異導入・アミノ酸置換による酵素活性中心の改変手法に加え、合成化学的手法による、活性中心の修飾と創造のための新たな方法論の展開を目指した。また、造り出した機能を実際に「使う」ために必須の、タンパク質の耐熱性や耐久性の向上を目指した。申請期間内の具体的な課題として、(1) 対象となるタンパク質に基質以外の分子（補助分子）を結合し、この分子の特性がタンパク質もとの機能と協同的に働くことによって機能全体の向上または、全く新しい機能の創出する。(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金属タンパク質の創成する。(3) 機能化タンパク質の耐熱、耐久性を目指し、好熱菌由来タンパク質の化学的機能変換を行う、を設定した。以下に現在のこれまでの研究状況を概説する。

## 3. 研究の方法

課題(1)、(2)では、ミオグロビン、アズリン、チトクロム *c*、シトクロム P450 タンパク質を対象に、有機分子、高分子、有機金属錯体との複合化を行い機能の変換、創出を進めた。また、課題(3)では、好熱菌由来のチトクロム *c*<sub>552</sub> を対象に、変異導入法との組み合わせることで、好熱菌由来タンパク質本来の耐熱、耐久性を維持したまま、機能化する手法の開拓を検討した。

## 4. 研究成果

以下に「研究目的」で述べた課題の代表的な成果について順次述べる。

### (1) アズリン—チトクロム *c* と温度応答性高分子 PNIPAM の複合化 —天然センサータンパク質にヒントを得た新たな情報変換の仕組み—

機能性分子をタンパク質表面のアミノ残基側鎖（多くの場合、システインやリジン）を介して修飾し、タンパク質の機能化を図る試みは、すでに確立された手法である。しかし、この方法では、タンパク質の特定部位だけを合目的に修飾することが難しく、分子レベルでの精密な機能設計は、困

難である。本研究では、アミノ酸残基が金属イオンの配位子として機能する金属タンパク質において、配位子の一つを除去し、生じる空配位座を介した機能性分子との結合形成・複合化によって、新たな機能性タンパク質の創成を試みた。本研究で研究対象とするタンパク質は、電子伝達タンパク質、アズリンである。このタンパク質の表面付近には、銅イオンが存在し、酸化還元中心として機能する。また 2 つのヒスチジン、メチオンニン、システインからなる配位構造を有している。これまでの研究から、ヒスチジン配位子の一つである His117 のグリシン変異体は、元の野生型と同じ高次構造を保持しており、イミダゾール類縁体との反応で、野生型と同様の配位構造を与えることが知られている。ここではこの知見を利用し、図 1 に示

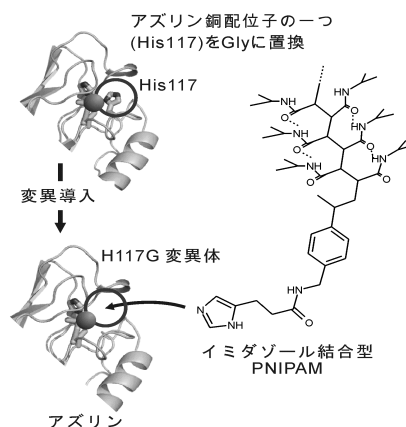


図 1. アズリンへの熱応答性ポリマーの固定。

ような熱応答性高分子、ポリ-イソプロピルアクリルアミド (PNIPAM)、をアズリンに固定した。PNIPAM は、ある温度 (本系では 32 °C) を境に、より低い温度では、分子内水素結合により直鎖ラセンを、また、より高い温度では、水素結合を失った凝集体構造をとる。PNIPAM が固定される部位は、アズリンがその酸化還元パートナーであるチトクロム *c* からの電子移動を受け入れるために、一時的な会合体を形成する部位であるため、温度変化に伴う PNIPAM のアズリン上での構造変化は、チトクロム *c* - アズリン間の電子移動過程に影響を及ぼす。PNIPAM 固定化アズリンを調製し、還元型チトクロム *c* (Fe(II)) から酸化型アズリン (Cu(II)) への電子移動速度を 25 および 35 °C で測定した結果を図 2 に示す。Fe(II) の減少量から求まるみかけの電子移動速度は、温度の上昇に伴い、75% 低下している (図 2a)。一方、同様の反応を元のアズリンで行った場合、温度依存性が見られなかった (図 2b)。したがって、今回得られた結果は、アズリンの銅配位子として導入した PNIPAM が、温度変化に伴う構造変化によって、アズリン—チトクロム *c* 間の電子移動過程を変化させることを示している。ここで指摘すべきことは、もし PNIPAM を従来通り、アズリン表面のアミノ酸側鎖を介して導入した場合、PNIPAM の導入数と位置を正確に制御できないため、導入数

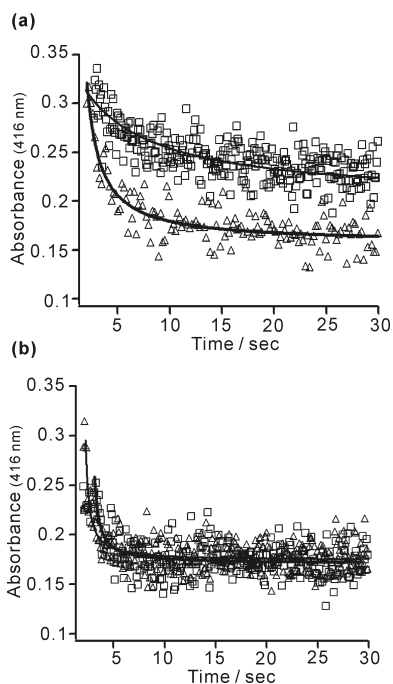


図 2. 電子移動速度の温度依存性。(a), PNIPAM 結合型アズリン、(b), 野生型アズリン。(△), 25 °C; (□), 35 °C。416 nm の吸収は、還元型チトクロム *c* を表す。

が多すぎる場合は、PNIPAM の凝集に伴うアズリンの析出が生じ、少ない場合には、電子移動過程に摂動を与えることができないことである。金属の配位子として、機能性分子を導入する本手法は、調製が容易で、かつ均質なタンパク質修飾が可能である点で、すぐれている。今後、本手法を利用した、様々な機能分子との複合体を提案してゆく予定である。

### (2) 光電流を生成するチトクロム *c*

課題(2)では、金属タンパク質の補欠分子族全体を金属錯体に置換した有機金属タンパク質、並びに補欠分子族の金属部分だけを置換した人工金属タンパク質を創出し、新たな機能の発現に取り組んだ。その中から以下では、亜鉛置換チトクロム *c* を用いたバイオ光スイッチについて述べる。

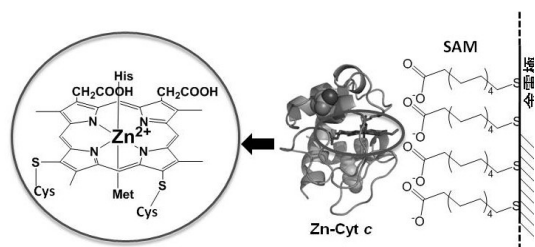


図 3. Zn-Cyt *c* は、HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-SH による SAM 修飾電極上に静電相互作用により固定されている。円内は、亜鉛ポルフィリンの配位構造。軸配位子に元のヘムのヒスチジンとメチオニンを有する。

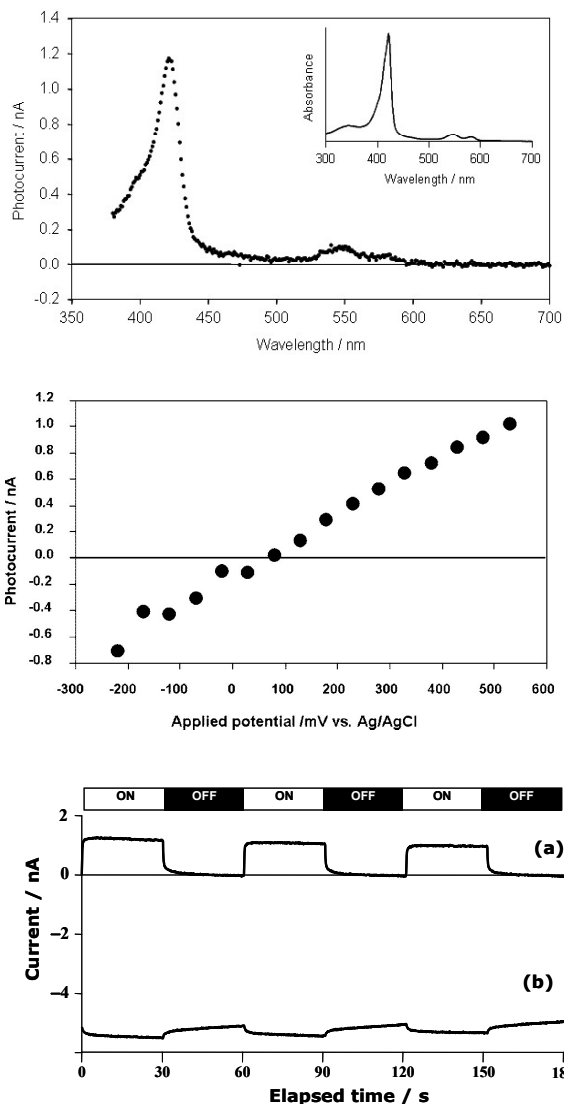


図 4. Zn-Cyt *c* 電極の光応答電流。上から (i) 波長依存性。囲みは、Zn-Cyt *c* の吸収スペクトル。(ii) 電極電圧依存性、(iii) 時間応答性。

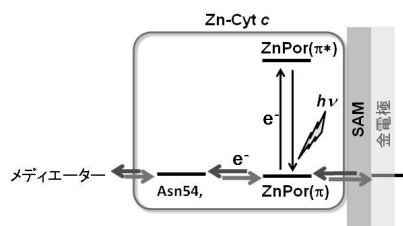


図 5. Zn-Cyt *c* 電極の光電流の発生機構。亜鉛ポルフィリンの励起によって生成する ZnPor(p) の軌道が、アノード、カソード両光電流の移動経路として機能する。

チトクロム *c* は、分子量およそ 13,000 のヘムタンパク質である。タンパク質のフォールディング研究に用いられる他では、機能改変による多機能化や生体材料としての利用はあまり見られない。本研究では、このチトクロ

ム *c* の活性中心であるヘム鉄を亜鉛に置換、タンパク質の配向を制御して電極へ固定することによって、光照射時に電気抵抗が減少するタンパク質光スイッチの作成に成功した。図 3 は、今回調製した亜鉛置換チトクロム *c* (Zn-Cyt *c*) 電極の概略である。亜鉛置換したポルフィリンは、元のヘム鉄と同じ配位構造を有していることが結晶構造より明らかとなっている。この Zn-Cyt *c* をカルボキシチオール自己集積膜(SAM)で修飾した金電極上に固定する。チトクロム *c* のヘム周辺の表面には、リジン残基による正に帯電した領域が存在するため、SAM のカルボキシル基との静電相互作用により、亜鉛ポルフィリンが電極に向けた配向をとると考えられる。

図 4 は、Zn-Cyt *c* 電極から得られた光電流特性である。照射波長を変えて得られた光電流 (図 4-i) は、元の亜鉛置換チトクロム *c* の電子吸収スペクトルに一致し、光電流が、亜鉛ポルフィリン部分の光励起に対応していることがわかる。この光電流は、電極電位に応じて、アノード、カソード、両方向に変化させることが可能である (図 4-ii)。また、照射光の ON / OFF に対応して、光電流の ON / OFF も得られ (図 4-iii)、光スイッチとしての性質を備えていることが明らかとなった。

今回、Zn-Cyt *c* における光電流の発生の機構を理解するため、汎密度関数法に基づく、Zn-Cyt *c* の全電子計算を行い、Zn-Cyt *c* の HOMO、LUMO およびその前後の分子軌道の分子内での広がりを求めた。詳細については割愛するが、得られた結果から提案する Zn-Cyt *c* の光電流の発生のメカニズムは図 5 のとおりである。

### (3) 高度好熱菌 *T. thermophilus* 由来電子伝達タンパク質、シトクロム *c*<sub>552</sub> を利用した耐熱性ペルオキシダーゼの創製

好熱菌由来タンパク質を人工酵素・機能性タンパク質の基盤として用いる利点としては、1) 大腸菌を宿主とする組換え体として、タンパク質を大量に得られる場合が多い、2) タンパク質が高温でも安定であるため、精製および精製後の取り扱いが容易である、3) 複数の変異導入に対しても、もとの高次構造を保つことが多く、機能設計が行いやすい、が挙げられる。ここでは、好熱菌由来タンパク質の中から、立体構造が明らかであり、ヘム (鉄プロトポルフィリン IX) を補因子として有する電子伝達タンパク質、シトクロム *c*<sub>552</sub> (Cyt *c*<sub>552</sub>) を選び、これを基盤分子とする耐熱性ペルオキシダーゼの創製を試みた。ペルオキシダーゼ触媒反応の鍵となる一般酸-塩基触媒機構を基に、Cyt *c*<sub>552</sub> のヘム近傍で 2 箇所部位特異的変異導入を行った。まず、元の軸配位子の一つである Met<sup>69</sup> をアラニンに置換し、ヘム鉄上に基質反応部位を設けた。また、一般酸-塩基触媒部位として

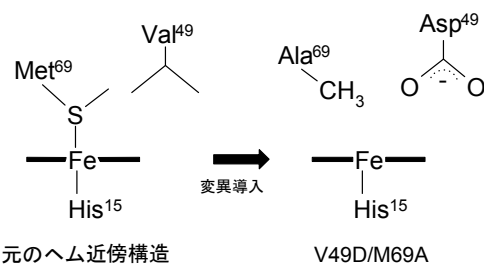


図 6. 変異導入によって Cyt *c*<sub>552</sub> に組込んだ反応活性部位。

機能することを期待して、ヘム鉄の上方およそ 5.2 Å に位置する Val<sup>49</sup> をアスパラギン酸に置換した。調製した変異体 (V49D/M69A) のヘム近傍を模式的に示すと図 6 のようになる。この変異体のペルオキシダーゼ活性を図 7 に示す。V49D/M69A 変異体の触媒活性 (図 7a, ○) は、温度の上昇に伴って増大しており、熱による反応速度の上昇が触媒活性に反映されている。以前報告されているミオグロビンの H64D 変異体 (基質の種類によっては、

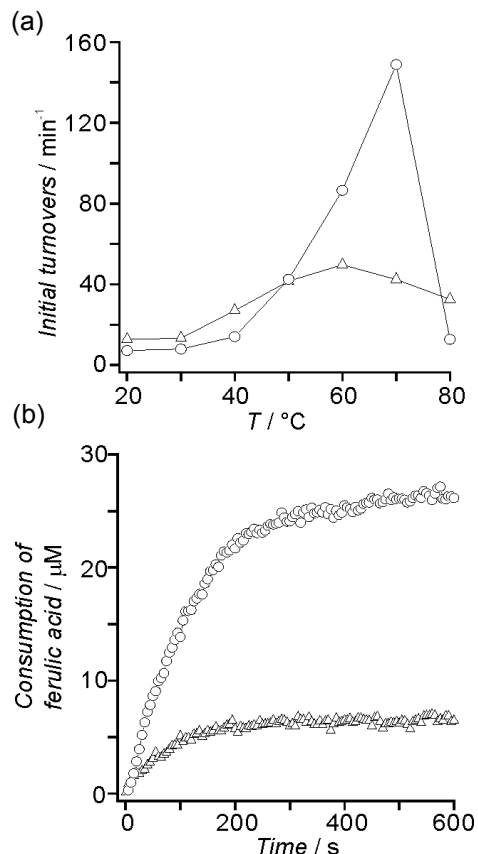


図 7. V49D/M69A 変異体、Mb H64D 変異体 によるペルオキシダーゼ反応。○: V49D/M69A、△: Mb H64D。(a) 触媒活性の温度依存性。反応開始時点の触媒回転数で比較。(b) 70 °C における基質消費量の時間変化。反応条件: タンパク質 0.2 μM; 酸化基質 (フェルラ酸) 200 μM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 μM., 20 mM MES-MaOH (pH 5.0) 緩衝溶液。

天然に匹敵する高いペルオキシダーゼ活性を示す)と比較すると(図 7a, △)、40°C までの触媒回転数では Mb H64D が上回るものの、60 および 70°C では、V49D/M69A 変異体がミオグロビン変異体を大幅に上回る触媒回転数を示す。なお 80°C における急激な活性低下は、未同定配位子によって 6 配位型ヘムが生成し、活性部位が塞がれるためであるがタンパク質は変性していない。高温条件下における V49D/M69A 変異体の優位性は、活性の持続性にもみられる。図 7b は、V49D/M69A 変異体および Mb H64D 変異体を用いて、70°C でペルオキシダーゼ反応を行った際にみられる基質消費量の経時変化である。V49D/M69A 変異体は、ミオグロビン変異体より常に基質消費量で上回っており、触媒活性の持続性においてもミオグロビン変異体よりも優位であることが分かる。以上の結果は、V49D/M69A 変異体が、高温条件下で、高い触媒活性とその持続性をもつことを示しており、タンパク質本来の耐熱・耐久性が高温域における触媒活性の発現にも有効に機能することを物語っている。

図 7b から明らかのように、V49D/M69A 変異体の酵素活性は、200 秒付近を境に急速に低下している。人工酵素として更なる耐熱・耐久性を追究するにはこの問題を解決する必要があったが、現在では、この失活過程の同定を終え、活性低下を抑制するための分子デザインを行うことが可能となっている。その結果、最新変異体を用いたペルオキシダーゼ反応では、70°C でも 1 時間以上触媒活性を持続させることに成功している。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件) 代表的なもの 6 件を以下に掲載。

- ① H. Nakajima, K. Ramanathan, N. Kawabaa, Y. Watanabe, "Rational engineering of *Thermus thermophilus* cytochrome *c*<sub>552</sub> to a thermally tolerant artificial peroxidase" *Dalton Trans.* **39**, 3105-3114 (2010). (査読あり)
- ② 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.*, **48**, 1946-1949 (2009). (査読あり)
- ③ 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.*, **130**, 5302-5310 (2008). (査読あり)

- ④ 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*, **9**, 2954-2957 (2008). (査読あり)
- ⑤ Y. Satake, S. Abe, S. Okazaki, N. Ban, T. Hikage, A. Suzuki, T. Yamane, H. Nishiyama, H. Nakajima and Watanabe, Y.; Incorporation of a phebox rhodium complex into apo-myoglobin affords a stable organometallic protein showing unprecedented arrangement of the complex in the cavity. *Organometallics*, **26**, 4904-4908 (2007). (査読あり)
- ⑥ 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<sub>β</sub>", *Angew. Chem., Int. Ed.*, **46**, 3656-3659 (2007). (査読あり)

[学会発表] (計 40 件) 代表的なもの 9 件を以下に掲載。

- ① H. Nakajima, "A Signal Transduction Mechanism Inspired by Natural Sensor Protein", SABIC2009, Nov. 7, 2009, India. (Invited lecture)
- ② H. Nakajima, "Functional Analysis of Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub> Cluster Involved in Nitrogenase Regulatory Protein, VnfA from *A. vinelandii*.", International Symposium on Chemistry Reductase II, Jan. 15-16, 2009, Nagoya.
- ③ H. Nakajima, "Single protein based photo-switching device constituted with zinc cytochrome c and HOOC-SAM electrode", I UMRS-ICA 2008, Dec. 11, 2008, Nagoya. (Invited lecture)
- ④ 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(依頼公演)
- ⑤ 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
- ⑥ H. Nakajima, "Creation of artificial metalloenzyme", Invited lecture in Munster University, Mar. 25, 2007, Germany. (Invited lecture)
- ⑦ H. Nakajima, Purification and Structural Analysis of Vanadium Nitrogenase Regulating Protein in *Azotobacter vinelandii*, International Symposium on Chemistry Reductase I, Jan. 11-12, 2007, Nagoya. (Invited lecture)

- ⑧ 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（招待講演）
- ⑨ 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、2006 年 8 月、神戸（招待講演）

〔図書〕（計 3 件）

- ① 中島 洋、渡辺芳人、日本学術振興会、学術月報「好熱菌由来タンパク質を化学の視点で利用する」2008、61、43-49
- ② 渡辺芳人、中島 洋、講談社サイエンティフィック、触媒便覧「第 4 章 酵素反応の速度と反応機構」2008、総ページ数 6
- ③ 渡辺芳人、中島 洋、(株) エヌ・ティー・エス、酵素活性ハンドブック「第 5 章 1. ホロ酵素の機能改変」2010、総ページ数 4

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
- 取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ

<http://bioinorg.chem.nagoya-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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