

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：82626

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H05987・19K21133

研究課題名(和文) 超好熱性古細菌由来ペルオキシレドキシンを基盤とする新規人工金属酵素の開発

研究課題名(英文) Development of an artificial metalloenzyme based on a peroxiredoxin from hyperthermophilic archaea

研究代表者

氷見山 幹基 (Himiyama, Tomoki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：90828310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：人工の金属錯体触媒をタンパク質に固定した人工金属酵素は、高い活性と選択性を有する触媒として注目されている。本研究では、様々な集合構造を有し、極めて熱に強いタンパク質である超好熱性古細菌由来ペルオキシレドキシPrxを利用した人工金属酵素の開発を行った。この過程で、新しい分子集合挙動を示すPrxの構造決定、さらにPrxの集合様式を改変する手法を発見した。これらの成果により、人工金属酵素の新しい触媒設計が可能になると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工の金属錯体触媒が持つ広い反応適用範囲と、タンパク質で作られる酵素が持つ高い選択性・活性を両立した触媒の開発は、医薬・機能化学品合成やエネルギー化学の観点から重要である。そこで、人工の金属錯体をタンパク質内部に結合して得られる「人工金属酵素」が注目を浴びている。本研究では、特徴的な構造を有し、極めて熱に強いタンパク質である、好熱菌由来ペルオキシレドキシをタンパク質足場として利用した新規人工金属酵素を開発した。この新しい触媒設計によって、従来困難であった分子変換の実現が期待される。

研究成果の概要(英文)：Artificial metalloenzymes (ArMs), in which metal complex catalysts are immobilized on proteins, are paid much attention as the catalysts with high activity and selectivity. In this study, a peroxiredoxin (Prx) from hyperthermophilic archaea, which has high thermal stability and a variety of structures, was utilized as the protein scaffold for an ArM. Besides, the crystal structure of a new Prx exhibiting an interesting assembling behavior was determined, and a genetic method to modify the assembling behavior of a Prx was developed. These results will pave the way for new catalyst design in ArM study.

研究分野：生体分子化学

キーワード：人工金属酵素 金属錯体 タンパク質 ペルオキシレドキシ

1. 研究開始当初の背景

人工の金属錯体触媒が持つ反応適用範囲と、酵素等の生体触媒が持つ高い選択性・活性を両立した触媒の開発は、医薬・機能化学品合成やエネルギー化学の観点から重要である。そこで、人工の金属錯体をタンパク質内部に結合して得られる「人工金属酵素」が注目を浴びている (F. Schwizer *et al.*, *Chem. Rev.*, **2018**, *118*, 142)。タンパク質の変な内部環境を利用して、金属錯体の触媒能・選択性を向上可能である。これまでに、ストレプトアビジン、アルブミン、ミオグロビンといった種々のタンパク質が金属錯体触媒の足場として利用され、エナンチオ選択的水素添加反応や位置選択的水酸化反応など、多くの触媒反応が人工金属酵素により実現されてきた。

既存の人工金属酵素が有する問題点として、本研究では以下の2点に着目した。第一に、一般的な有機合成反応は高温を要することが多く、高温下で機能可能な人工金属酵素を開発する必要がある。人工金属酵素で活用されるタンパク質の多くが耐熱性を有しておらず、高温下で不安定であり、反応適用範囲に限られる。第二に、既存の人工金属酵素ではタンパク質の高次集積構造を活用しきっていない。これまでの人工金属酵素では、金属錯体周辺の局所的なタンパク質構造の改変による反応の最適化を行ってきた。しかしタンパク質の高次集積構造を変換して触媒能に変化をもたらすアプローチは実現されていない。これらの課題解決により、新規な触媒設計が可能となると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、超好熱性古細菌由来ペルオキシレドキシシン (Prx) を足場タンパク質とする人工金属酵素の開発を目的とした。Prx はあらゆる生物種が有する抗酸化酵素であり、生体内では酸化ストレスの強い過酸化物を除去している (A. Perkins *et al.*, *Trends Biochem. Sci.*, **2015**, *40*, 435)。Prx はその酸化還元状態に依存して特徴的な集合構造をもち、球状のものや、四角形、五角形の環状構造のもの、円筒構造のものなど多くの種類が発見されている。好熱菌由来の Prx は耐熱性を有する上に、リング状に分子集積を行う、その分子集積の数を変換できる、さらに高次に分子を集積できるという特徴がある。したがって、Prx を足場に用いることで、人工金属酵素に耐熱性を付与し、さらに高次構造の制御という新しいアプローチをもたらすと期待した。

3. 研究の方法

まず、人工金属酵素の足場タンパク質として新規 Prx の構造決定を行った。鹿児島県子宝島で発見され、高温下で生育可能な好熱菌である *Thermococcus kodakaraensis* 由来の Prx (TkPrx) に着目した。TkPrx は高い耐熱性を有し、環状の多量体構造を示すことが知られていたが (S. Lee *et al.*, *PLoS One*, **2015**, *10*, e0125325)、結晶構造は得られていなかった。次に、足場タンパク質の集合挙動制御の観点から、Prx の集合形態改変をめざし、アミノ酸変異を実施した。超好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* K1 由来 Prx (ApPrx) をターゲットとしたアミノ酸変異導入を行い、集合形態を評価した。最後に、Prx に金属錯体を結合し、人工金属酵素を作成した。人工金属酵素作成のため、ApPrx を足場としてタンパク質の設計を行った。以上のように、新たな足場タンパク質の開拓、タンパク質の集合制御、人工金属酵素の作成を順に取り組んだ。

4. 研究成果

(1) 新規 Prx の構造決定

TkPrx の結晶構造解析に成功し立体構造を明らかとした (図 1)。天然 TkPrx の結晶構造では C 末端側に存在する 2 つのシステインがジスルフィドを形成し、酸化型として得られた。二量体が 6 分子集合して六角形の環状十二量体を形成していた。Prx は酸化還元状態が集合形式に影響するため、TkPrx についても還元状態のモデル構造を得るために、すべてのシステインをセリンで置き換えた TkPrx0Cys 変異体を作成し、結晶構造解析を行った。TkPrx0Cys 変異体は天然 TkPrx と同様の十二量体を形成していた。したがって、TkPrx はその酸化還元状態に依らず環状十二量体構造を有すると示された。一方、TkPrx と非常に

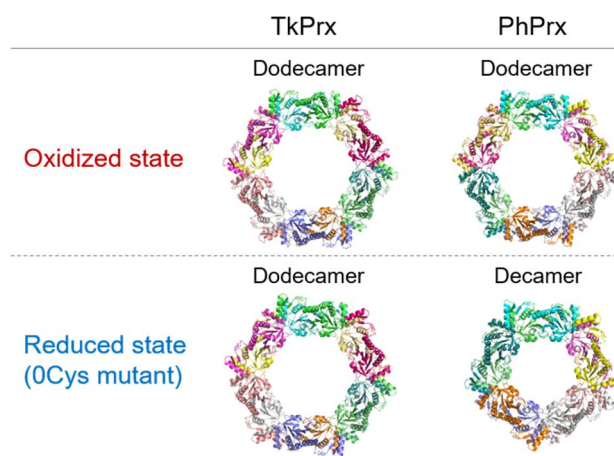


図 1. TkPrx と PhPrx の酸化還元状態と結晶構造

高いアミノ酸相同性（91%）を示す *Pyrococcus horikoshii* 由来 Prx (PhPrx) は、酸化状態では六角形環状十二量体、還元状態では五角形環状十量体であった。したがって TkPrx と PhPrx は、アミノ酸相同性が非常に高いにもかかわらず、酸化還元に対する挙動が異なることが判明した。これは今後の人工金属酵素開発における有用な知見である。

(2) アミノ酸変異による Prx 集合形態の改変

ApPrx は、二量体が5分子集合した環状十量体構造を形成する。本研究では ApPrx の環状十量体構造を構成する二量体間の境界面に注目し、十量体構造形成に重要なアミノ酸残基を同定した。ApPrx の二量体の境界面には芳香族アミノ酸のフェニルアラニン、トリプトファンが集中するクラスターが形成している。本研究ではこのクラスターを形成する5つのアミノ酸残基 (F46, F80, W88, W210, W211) に着目し、これらを1つずつアラニン置換した変異体を調製してその四次構造を調べた (図 2a,b)。ゲルろ過クロマトグラフィー、動的光散乱法による溶液中サイズ評価から、F46A, F80A, W210A の三種類の変異体において、二量体に解離することが判明した (図 2c)。興味深いことに、クラスター中のアミノ酸残基のうち1つのフェニルアラニンをアラニンに変換する、ベンゼン環1分子を取り除く程度の変化でも環状十量体構造は解離した。作成した5つの変異体すべてにおいて、結晶構造解析に成功した。溶液中では二量体に解離する F46A, F80A 変異体は、結晶構造中では環状十量体で観察された。F46A, F80A 変異体の二量体間には溶媒が入り込む空隙が形成しており、疎水性相互作用の破壊により溶液中で分子集合しないと予想された。溶液中でも環状十量体を保つ W88A, W211A 変異体ではそのような空隙は見られなかった。W210A 変異体では一部のループが解離しており、二量体間の相互作用が弱まったと予想された。ClustalW によるシーケンスアライメントにより、今回着目したアミノ酸残基が ApPrx と類似の環状構造を有する Prx 間で保存されていることが分かった。したがってこれらの変異に関する知見はその他の Prx に対しても適用可能と予想される。

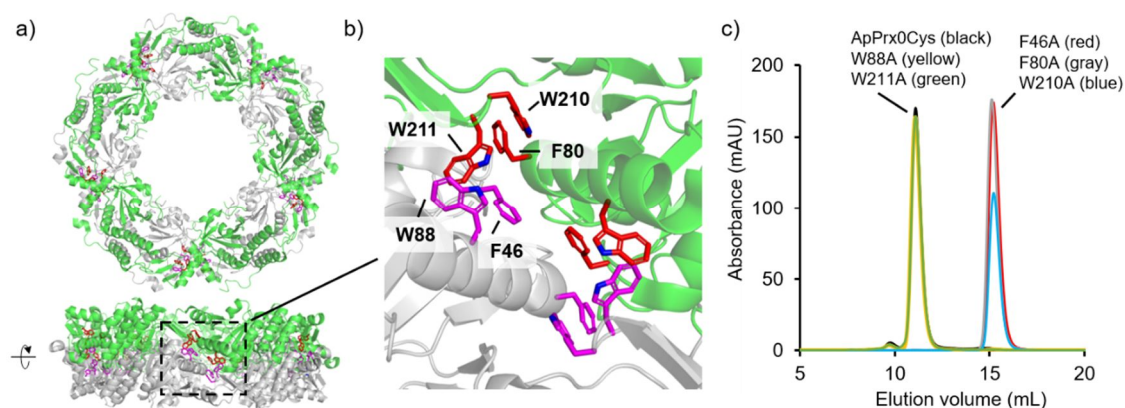


図 2. ApPrx のホモ二量体界面に注目した集合形態制御 : a) ApPrx の環状十量体構造, b) 二量体間の界面, c) ゲルろ過クロマトグラフィーによる溶液サイズ評価

(3) 人工金属酵素の作成

金属錯体への非特異な配位を防ぐために、天然 ApPrx に存在するシステイン、メチオニン残基をそれぞれセリン、アラニンに置き換えた変異体 ApPrx*を作成した。ApPrx*に錯体の結合サイトを導入するために、システイン残基の位置が異なる3種の変異体 (ApPrx*_T47C, ApPrx*_S50C, ApPrx*_H123C) を作成し、リガンドとの結合を検討した。N-(1-Pyrenyl)maleimide との反応の結果、ApPrx*_H123C で吸収スペクトルピークの増大が最も大きく、123番目システインの高い反応性が示唆された。つぎに、水素発生金属錯体触媒である鉄二核カルボニル錯体を ApPrx*_H123C に導入した。マレイミド基を導入した鉄二核カルボニル錯体 (FeFe1) をアセトニトリルに溶解し、ApPrx*_H123C の水溶液に添加して、人工金属酵素 FeFe1@ApPrx*を作成した (図 3a)。精製後も FeFe1 に特徴的な吸収スペクトルが残存していたことから、共有結合の形成が示唆された (図 3b)。ESI-MS では FeFe1@ApPrx*の m/z が観測され、理論値とも合致した。ICP-AES 測定では FeFe1@ApPrx*水溶液における鉄原子の含有が確認された。タンパク質の Bradford assay の結果と照らし合わせて、86%以上の結合収率が確認された。ApPrx*_H123C および FeFe1@ApPrx*の単結晶の作成に成功し、SPring-8 における放射光実験により結晶構造解析を試みた (図 3c)。しかし FeFe1@ApPrx*において、鉄二核錯体の電子密度は不明瞭であり、タンパク質上でフレキシブルな配向をとっていると示唆された。ルテニウムトリスビピリジン錯体 ($[Ru(bpy)_3]^{2+}$) を光増感剤、アスコルビン酸を犠牲還元剤として光照射実験を行うと、FeFe1@ApPrx*水溶液では水素の発生が見られ、水素発生触媒能を有することが確かめられた。今後、集合状態を変えた人工金属酵素との活性を比較し、触媒活性に対する分子集合の効果を評価する。

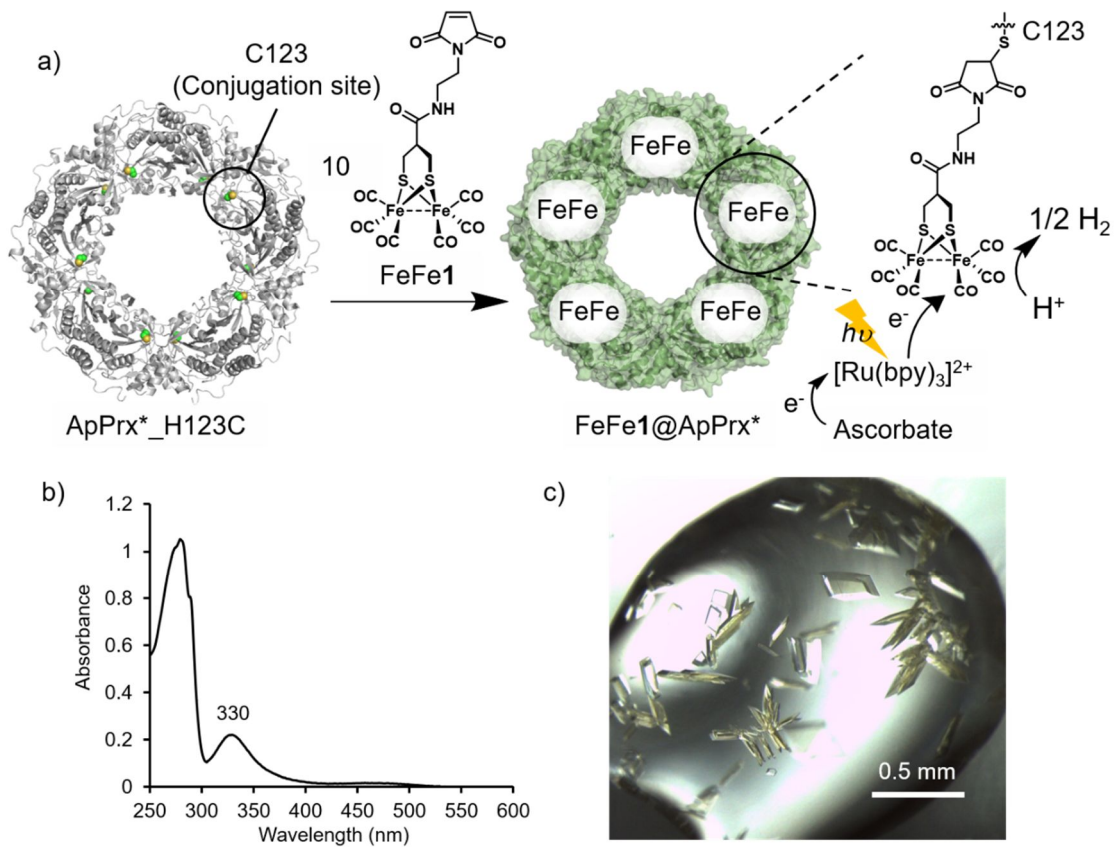


図 3. a) FeFe1@ApPrx*の調製と水素発生反応スキーム, b) FeFe1@ApPrx*の吸収スペクトル, c) FeFe1@ApPrx*の黄色結晶

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Himiyama Tomoki, Oshima Maki, Uegaki Koichi, Nakamura Tsutomu	4. 巻 166
2. 論文標題 Distinct molecular assembly of homologous peroxiredoxins from <i>Pyrococcus horikoshii</i> and <i>Thermococcus kodakaraensis</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 89 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvz013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Himiyama Tomoki, Nakamura Tsutomu	4. 巻 29
2. 論文標題 Disassembly of the ring type decameric structure of peroxiredoxin from <i>Aeropyrum pernix</i> K1 by amino acid mutation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 1138 ~ 1147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.3837	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 水見山幹基、中村努
2. 発表標題 <i>Aeropyrum pernix</i> K1由来ペルオキシレドキシンの環状四次構造を解離する変異導入
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水見山幹基、中村努
2. 発表標題 変異導入によるペルオキシレドキシンの環状四次構造解離
3. 学会等名 第18回 産総研・産技連LS-BT合同研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水見山幹基、中村努
2. 発表標題 環状十量体タンパク質Aeropyrum pernix K1由来ペルオキシレドキシンの集合挙動制御
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoki Himiyama, Tsutomu Nakamura
2. 発表標題 Controlling ring-type decameric assembly of peroxiredoxin from Aeropyrum pernix K1 by combining amino acid mutation and chemical modification
3. 学会等名 16th Conference on the Asian Crystallographic Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水見山幹基、中村努
2. 発表標題 Controlling ring-type assembly of peroxiredoxin by chemical modification
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----