

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01954

研究課題名(和文) タンパク質金属錯体を基盤とした人為酵素の合理的設計

研究課題名(英文) Rational design of artificial metalloenzymes using protein metal complexes

研究代表者

藤枝 伸宇 (Fujieda, Nobutaka)

大阪公立大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：00452318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではクピタンパク質の活性中心を改質することで簡便に人為酵素を作成する方法を見出した。その手法を用いて選択性の高いタンパク質をスクリーニングしたところ、金属中心がわずかに動く様子が観測された。タンパク質の金属中心はほとんど動かないというのが定説ではあるが、分析技術の向上によってこれらは実はわずかに位置が動くということが明らかになってきている。本研究で得られた観測事実はこういった天然の酵素の機能に関わる重要な因子をタンパク質に人為的に組み入れることに成功したということを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では人為酵素を簡便に作成する方法の一端を見いだした。また、実際に様々なファインケミカルの材料に含まれる不斉炭素合成することにも成功した。今後は、さらなる展開を目指して、望みの化学機能を付与できる分子設計法として、新しい酵素工学の分野を開拓していくことで、物質変換技術に対しての重要な鍵手法になると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found a simple method to create artificial enzymes by modifying the active center of the cupin protein. In highly selective proteins which was screened using this method, slight movement of the metal center was observed. Although it is a common theory that the metal centers of proteins are spacially fixed, it is becoming clear that they indeed move slightly in position thanks to the improvement of analytical techniques. The observations obtained in this study illustrate that we have succeeded in artificially installing such an important factor in the function of a natural enzyme into a protein.

研究分野：生物無機化学

キーワード：人工金属酵素 タンパク質配位子 立体分岐型合成 不斉反応 生体触媒

1. 研究開始当初の背景

天然酵素は、細胞内で驚異的な触媒活性を発揮する触媒である。そのため、非常に温和な条件下で機能し、SDGsなどの持続可能な社会構築要請からみた観点では、非常に魅力的な物質変換のツールとなる。しかしながら、基質特異性があり、基質範囲が狭く汎用性が低いことや、タンパク質そのものが不安定であるため、実用化に向けてはまだまだ課題が残されている状況である。こういった背景の中、2000年代になり、遷移金属錯体をタンパク質に連結したハイブリッド触媒が、「人工金属酵素」として急激に注目を浴びてきている。それは酵素マトリックスの反応場としての特性により、錯体触媒の反応性や選択性を向上させることができるからである。また、通常の配位子では困難な非対称反応場として、タンパク質骨格が機能することにある。さらには、水分子に対して不安定な錯体を保護する作用も兼ねることで、環境に良い、水系での反応にも応用が可能となる。このように、人工金属酵素は新たな有機合成の方法論として期待され、世界中で研究が進められている。ただ、錯体とタンパク質の連結方法などにはまだまだ制限があり、改善の余地は残されている。

2. 研究の目的

我々のグループにおいても、タンパク質のアミノ酸残基そのものを配位子として見立てることでタンパク質金属錯体を簡便に作製し、天然の非ヘム金属酵素のような人工非ヘム金属酵素のスターティングポイントとして新規触媒構築を目指してきた。しかしながら、アミノ酸に配位した金属イオンを活性点として用いるには、その結合サイトの設計が困難であることや、結合するものを作出できても配位子となるアミノ酸自体に基質結合が阻まれることによって反応性があまり高くないなどの問題が生じる。一方で、天然酵素に目を向けてみると金属イオン中心はあまり動かさず状態転移の活性化エネルギーを下げる (entatic state) という考え方が一般的に受け入れられてきた。しかし、X線結晶構造解析などの分析技術の発達に伴って、タンパク質に基質が結合するとともに金属イオンも resting state から脱離し、基質側に吸い寄せられるような現象がいくつか報告されている。そのため、タンパク質構造変化の一つの種類としてマイクロな空間における金属の位置転移が酵素機能の発揮には必要であることが考えられる。そこで、本研究計画ではこのような根幹的であるかもしれない酵素機能を組み込んだ人工非ヘム金属酵素構築に取り組んだ。

3. 研究の方法

前述のように天然にもアミノ酸残基を配位子として直接金属イオンを結合し、多様な触媒能を示す非ヘム金属酵素が存在している。一方で、人工非ヘム金属酵素を作り出すことは天然酵素のモデルになる。そのため、非ヘム金属酵素の反応機構解明にも新たな知見を与える。そこで、非ヘム鉄酵素に見られる活性中心を鉄から銅中心に変換し、非天然反応におけるその銅中心の位置転移について検討を行った。金属酵素は鉄中心に限定すると、ヘム鉄酵素と非ヘム鉄酵素に分類

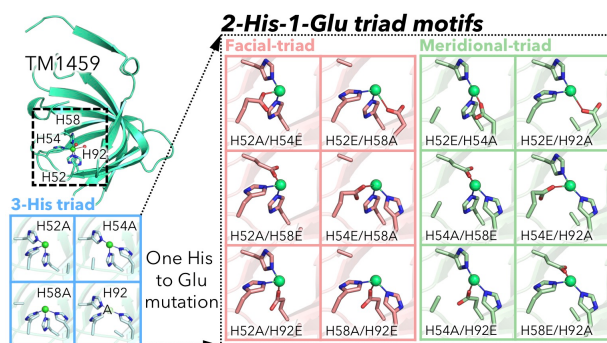
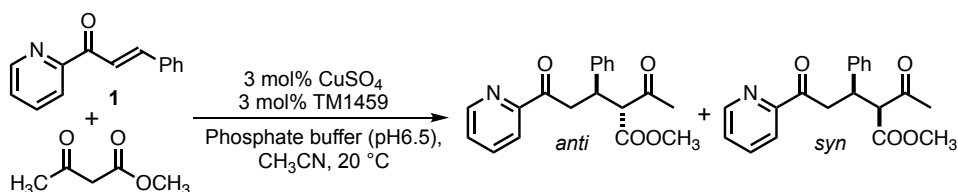


図 1. 2-His-1-carboxylate triad モチーフ
Chem. Sci. 2023 より改変

できる。活性中心に二価鉄を配位する非ヘム鉄酵素は様々な生物種に存在し、各々の触媒機能は異なるにも関わらず、その活性中心の構造は保存されている事が知られている。その構造とは、2つのヒスチジンと1つのカルボン酸を側鎖にもつアミノ酸から構成される金属結合サイト、2-His-1-carboxylate facial triad であり、鉄イオンに facial 型配位することで、反対側に空いた3つの配位座が生まれ、基質や補酵素の結合が可能となる。この保存されたモチーフについて、これまでモデル錯体の構築やタンパク質工学に基づいた改質が行われているが、触媒機能の検討はほとんどされてこなかった。そこで、本研究ではその構造的な視点からも検討を行った。

当研究室では、超好熱菌である *Thermotoga maritima* 由来で熱安定性の高いクピンタンパク質が持つ金属結合部位に着目し、遷移金属イオンを直接配位させた人工金属酵素の創製について研究を行ってきた。この部位は4つのヒスチジンが存在し、金属イオンとの結合が容易である。そこで1章では、この部位の多様化を目指して、2-His-1-carboxylate facial triad をアミノ酸変異導入により再構築し、非天然な触媒活性を持つ酵素の創出を目指した。目的の遺伝子を構築するためプライマー設計を行い、そのプライマーを用いたインバース PCR によって発現ベクターを作

成した。ベクターを大腸菌に導入後、TM1459 タンパク質の変異体が大腸菌にて発現させた。大腸菌を超音波破碎後、アフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製を行った。TM1459 タンパク質の 4-His 部位のヒスチジンのうち 1 つをグルタミン酸に、さらにもう 1 つをアラニンにすることで位置の異なる 2-His-1-carboxylate facial triad を持つ変異体ライブラリーを構築した。これら変異体に銅イオンを導入し、銅結合変異体タンパク質を調製した。触媒活性のベンチマークとして、2-azachalcon (1) とアセト酢酸メチルを用いるマイケル付加反応における立体選択性や収率の検討を行った (Scheme 1)。



Scheme 1 2-azachalcon (1) とアセト酢酸メチルのマイケル付加反応

4. 研究成果

土台タンパク質としては、前述の機能未知クピンタンパク質を用いた。このタンパク質は分子量が 12000 程度であり、金属結合部位は *cis* 位に空いた配位座を与える、4 つのヒスチジンからなる金属結合部位を持っている。加えて、この結合部位以外に余分なヒスチジンを持たないことから、他の部位での非特異的な金属の吸着もほとんど見られない (図 1)。これまでは有機合成では二座あるいは三座の窒素系配位子が使われることを鑑みて、Chemomimetic なアプローチとして、金属結合部位のヒスチジンの 1 つ、あるいは 2 つをアラニンに変異させ、それらの合成配位子を模倣した変異体をタンパク質配位子として用いることで、さまざまな触媒反応系を構築してきた。本研究ではこの部位のヒスチジンのうち一つをグルタミン酸に、もう一つをアラニンにすることで、網羅的に 2-His-1-carboxylate facial triad を導入した 12 種類の変異体ライブラリーを構築した (図 1)。

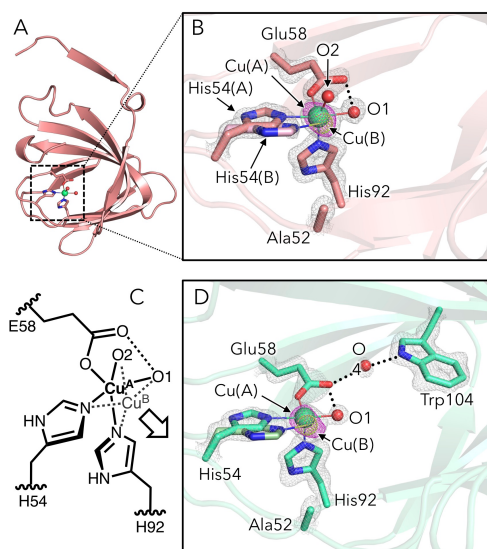


図 1. 金属リアーゼの結晶構造

Chem. Sci. 2023 より改変

Scheme 1 のマイケル付加反応をベンチマーク反応として、それぞれの変異体を添加物として触媒反応を行った。その結果、銅イオンを結合させた H52A/H58E 変異体を用いた場合には *anti* 体におけるエナンチオ選択性が 96 % (*ee*) と最も高くなることがわかった。そこで、この変異体を結晶構造解析した結果 1.15 Å の分解能で構造を決定できた。得られた電子密度から、活性中心において 54、92 番目のヒスチジンと 58 番目のグルタミン酸が銅イオンに配位した予想通りの 2-His-1-carboxylate facial triad 構造が形成されていることがわかった。(図 2AB)。しかし予想外に、銅イオンは金属結合サイトに対して、完全に結合している状態とそこからわずかにはみ出ている状態の 2 種類の状態が見られた (図 2C)。この結果は、銅イオンが触媒サイクルにあわせて微小距離を遷移する可能性を示唆しており、亜鉛脱水素酵素や銅酸化酵素天然酵素でも見られているものである。しかし、これまでの人工的な酵素モデルにおいて再現された例はまったくない。基質のアザカルコンとのドッキングシミュレーションを行うことでこの動的挙動と反応性の関連を検

討した。その結果、アザカルコンはゆるく結合した銅イオンに対して結合することが示唆された。これは、触媒サイクルに合わせて銅イオンが動き、基質が結合しやすくなるまで配位部位よりすこしはみでることによって立体障害が緩和されたと解釈できる。立体選択性を向上させるための変異導入をおこなった。ドッキングシミュレーションの結果から基質のアプローチする面を予想して、いくつかのアミノ酸残基に対して変異導入を行った。その結果、104 番目のフェニルアラニンをトリプトファンに変えた H52A/H58E/F104W 3 重変異体において、ジアステレオ選択性を 71 % まで向上することがわかった。また、この変異体の X 線結晶構造においても銅イオンの位置転移が観測され、新たに導入したトリプトファンと 58 番目のグルタミン酸の間に水分子が観測され、これらをつなぐ水素結合ネットワークが形成されていることが判明した (図 2D)。最終的にこの水分子との水素結合、およびトリプトファンによる立体障害によってアセト酢酸メチルのアザカルコンへのアプローチ面が決定され、立体選択性が高まったと考えられる。

さらに、銅の転移を考察するために H52A/H58Q 変異体を作製し、より弱いドナーであるグルタミンにすることでその変化を観察した。この変異体はほぼ活性を示さず、結晶構造においては導入したグルタミン残基がロータマーを示し、銅がより大きく遷移する可能性が示された。また、H52A, H52A/H58E, H52A/H58Q 変異体に対して銅の解離定数をトリプトファン蛍光消光法により求めたところ、この順で銅に対する親和性が現象した。これはヒスチジン、グルタミン酸、グルタミンの順にドナー性が現象していることと一致する。また、反応の収率は銅に対する親和性が下がるに連れて現象した。これは銅イオンが触媒サイクル中に欠落する可能性が上がることと一致している。しかし、選択性は H52A/H58E がもっとも高く、前述のように銅イオンが少し位置転移することで基質であるアザカルコンが結合しやすくなることを支持している。このように、本研究では、人工的な金属酵素に対して、天然酵素に見られる動的挙動をインストールし、位置選択性を向上させることに成功した。このような人為酵素を用いることで天然酵素のまだ明らかにされていない反応機構解明への足がかりとなることが期待される。

[1] Matsumoto, R.; Fujieda, N. *et al.*, *Chem. Sci.*, **2023**, 14, 3932-3937.

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 1件）

1. 著者名 Matsumoto Ryusei, Yoshioka Saho, Yuasa Miho, Morita Yoshitsugu, Kurisu Genji, Fujieda Nobutaka	4. 巻 14
2. 論文標題 An artificial metallolyase with pliable 2-His-1-carboxylate facial triad for stereoselective Michael addition	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 3932 ~ 3937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2SC06809E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 SUGIMOTO Yu, FUJIEDA Nobutaka, KANO Kenji	4. 巻 89
2. 論文標題 Electrochemical Consideration of Electrostatic Interaction of Charged Molecules with Partially Overlapped Electric Field: Zwitterions and Proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Electrochemistry	6. 最初と最後の頁 290 ~ 295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5796/electrochemistry.21-00030	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23件（うち招待講演 5件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Nobutaka Fujieda
2. 発表標題 Stereoselective Synthesis with Protein as Metal Ligands
3. 学会等名 The 15th International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤枝伸宇
2. 発表標題 Stereoselective Synthesis with Small Protein as Metal Ligands
3. 学会等名 錯体化学討論会シンポジウムS1 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤枝伸宇
2. 発表標題 金属配位子としてのタンパク質
3. 学会等名 バイオメタルサイエンス (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryusei Matsumoto, Saho Yoshioka, Yoshitsugu Morita, Nobutaka Fujieda
2. 発表標題 Artificial Metalloenzymes with 2-His-1-carboxylate Facial Triads toward Stereoselective Michael Addition Reaction
3. 学会等名 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nobutaka Fujieda
2. 発表標題 Stereoselective Synthesis with Cupin Protein as Metal Ligands
3. 学会等名 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本隆聖・吉岡紗穂・丸毛智史・湯浅美穂・森田能次・藤枝伸宇
2. 発表標題 立体分岐型マイケル付加反応を志向した人工金属酵素の創製
3. 学会等名 第31回金属の関与する生体関連反応シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉岡紗穂・松本隆聖・丸毛智史・森田能次・藤枝伸宇
2. 発表標題 立体選択的逆電子要請型ヘテロDiels-Alder反応を触媒する人工金属酵素の開発
3. 学会等名 第31回金属の関与する生体関連反応シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本隆聖・吉岡紗穂・丸毛智史・湯浅美穂・森田能次・藤枝伸宇
2. 発表標題 立体分岐型マイケル付加反応を触媒する人工金属酵素の創製
3. 学会等名 第33回生体機能関連化学若手の会サマースクール
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉岡紗穂・松本隆聖・丸毛智史・森田能次・藤枝伸宇
2. 発表標題 立体選択的ヘテロDiels-Alder反応を触媒するタンパク質金属錯体の創製
3. 学会等名 第34回生物無機夏期セミナー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本隆聖・吉岡紗穂・丸毛智史・湯浅美穂・森田能次・藤枝伸宇
2. 発表標題 立体選択的マイケル付加反応を志向した人工金属酵素の創製
3. 学会等名 第34回生物無機夏期セミナー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉岡紗穂・森田能次・藤枝伸宇
2. 発表標題 立体選択的ヘテロDiels-Alder反応を触媒するタンパク質金属錯体の開発
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本隆聖・吉岡紗穂・丸毛智史・森田能次・藤枝伸宇
2. 発表標題 立体選択的マイケル付加反応を志向した人工金属酵素の開発
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本隆聖・吉岡紗穂・森田能次・藤枝伸宇
2. 発表標題 2-His-1-Carboxylate Facial Triads構造を有する人工金属酵素の開発
3. 学会等名 日本化学会第103回春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸毛智史・松本隆聖・吉岡紗穂・森田能次・藤枝伸宇
2. 発表標題 立体選択的マイケル付加反応を触媒する人工金属酵素の構築
3. 学会等名 日本化学会第103回春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北澤想人・松本隆聖・森田能次・藤枝伸宇
2. 発表標題 芳香族ケトンの立体選択的不斉水素化反応を触媒する人工金属酵素の開発
3. 学会等名 日本化学会第103回春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久保 裕暉・松本隆聖・森田能次・藤枝伸宇
2. 発表標題 ビリジル基で活性中心近傍を化学修飾した人工金属酵素の調製と反応性評価
3. 学会等名 日本化学会第103回春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤枝伸宇
2. 発表標題 タンパク質金属配位子を使った反応制御
3. 学会等名 2021年度 有機合成化学講演会 合成有機化学のフロンティア (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤枝伸宇
2. 発表標題 タンパク質金属配位子を使った反応創製
3. 学会等名 高難度物質変換反応の開発を指向した精密制御反応の創出 事後シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nobutaka Fujieda, Haruna Ichihashi, Saho Yoshioka, Miho Yuasa, Shinobu Itoh
2. 発表標題 Cupin variants as metal ligand library for stereoselective reactions
3. 学会等名 PaCifichem 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉岡紗穂・石井俊宏・松本隆聖・丸毛智史・藤枝伸宇
2. 発表標題 立体分岐型マイケル付加反応を志向した人工金属酵素の開発
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井俊宏・吉岡紗穂・松本隆聖・丸毛智史・藤枝伸宇
2. 発表標題 ケトンの不斉水素化反応を触媒する人工金属酵素の開発
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本隆聖・吉岡紗穂・丸毛智史・湯浅美穂・藤枝伸宇
2. 発表標題 立体分岐型マイケル付加反応を目指した人工金属酵素の創製
3. 学会等名 日本化学会第102回春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井俊宏・吉岡紗穂・松本隆聖・丸毛智史・小田原 駿・藤枝伸宇
2. 発表標題 (205)ケトンの立体選択的水素化反応を触媒する人工金属酵素の創製
3. 学会等名 日本化学会第102回春季年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 触媒学会	4. 発行年 2023年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 544
3. 書名 触媒総合事典	

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関