

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26820358

研究課題名(和文) 分子認識ポリマー複合型人工アロステリック酵素の開発とナノ構造制御

研究課題名(英文) Allosterically Control of Enzyme Activity by Introduction of Molecular Recognition Moiety

研究代表者

大柴 雄平(Oshiba, Yuhei)

東京工業大学・資源化学研究所・助教

研究者番号：10708530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、酵素P450camを用いたアロステリック酵素の人工的な開発に向けて、性質の異なる化合物を系統的にP450camへコンジュゲートし、コンジュゲート前後の酵素活性と構造変化の関係を整理することにより、人工アロステリック酵素を作製する際の設計指針の獲得を試みた。多くの化合物でコンジュゲート後、不活性体の割合が増加することで酵素活性が低下した一方、コンジュゲートする化合物によっては、基質の結合低下により酵素活性の低下が起こっていることが示唆された。後者のような化合物を分子認識部位として利用すれば、分子認識により可逆的に活性が変化する人工アロステリック酵素の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, the relationship between enzyme activity and structural changes of P450cam after its modification was evaluated with compounds of different properties. We revealed the existence of a new mode for P450 activity decrease after conjugation, which was distinct from a well-known inactivation mode for the conversion of P450 to the inactive P420 form. In this new mode, the activity decreased due to a reduction in binding or accessibility of a substrate to the heme pocket of P450cam. This obtained knowledge will help to guide designs for the allosteric regulation of P450cam activity for industrial and biotechnological applications.

研究分野：工学

キーワード：コンジュゲート P450cam P420 酵素活性 構造変化

1. 研究開始当初の背景

生体内では多くの化学反応により緻密で繊細な化学物質システムが構築されており、その多くは、リガンドや小分子、pH といった外部刺激に応答して酵素・タンパク質自身の機能に変化するアロステリック調節により制御されている。このようなアロステリック酵素を機能性材料として自由に設計できれば、既存の材料にはない優れた特性を持つ材料としての利用が期待される。

本研究グループは、分子認識部位を位置選択的かつ化学的に導入することで、標的分子の認識により酵素活性を抑制する酵素の開発を行っている。酵素として、*d*-camphor を基質とするシトクローム P450cam を選定し、論理的方法で酵素活性が抑制される部位を予測し、その 1 か所にのみ分子認識部位と反応するアミノ酸官能基が存在する P450cam 変異体(3mD)を作製した。分子認識部位としてビオチン化合物を 3mD に反応させた後、標的分子であるアビジンがビオチン部位に結合すると、酵素活性がアビジン結合前の 10 分の 1 に低下した。この活性低下の要因は、3mD の活性中心であるヘムの 3 次構造が変化し、ヘムの軸配位子が変化した不活性体になったことが要因であることも分かっている。しかし、これは分子認識後、酵素は不活性体へ変化する不可逆な系であるが、可逆的な系を構築できれば、バイオリアクタやバイオセンサといったバイオマテリアルの構成材料として応用用途が格段に広がることを期待される。そのためには、これまでの活性抑制のメカニズムを明らかにし、活性抑制型人工酵素の設計指針を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、特性の異なる様々な化合物を分子認識部位導入部位にコンジュゲートし、コンジュゲート後の活性体の割合と酵素活性残存率の相関関係を評価することで、これまでに見られた遺伝子組み換え P450cam への位置選択的コンジュゲートによる活性抑制のメカニズム解明に向けた一助とし、活性抑制型人工酵素の設計指針を明らかにすることを目的とする (図 1)。

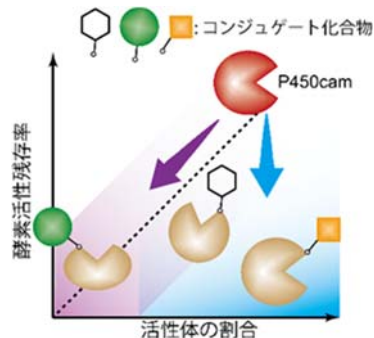


図 1 本研究の概要

3. 研究の方法

これまででは、ポリエチレングリコール(PEG)

やアビジン-ビオチンといった比較的大きな分子を 3mD にコンジュゲートしてきた。そこで、小分子の 1 つである蛍光物質 Fluorescein-5-maleimide (Fmal) と 3mD のコンジュゲート体を作製した。また、コントロールとして野生型 P450cam (WT) を用いてコンジュゲート体の作製を行った。コンジュゲートの確認は、コンジュゲート体中の Fmal 由来の吸収スペクトルの定量により行った。酵素活性は、電子供与体である NADH の吸収の減少を測定することで評価した。また、酸化型と CO 付加体の吸収スペクトルを測定し、ヘム周辺の状態や不活性体である P420 の有無を評価した。

次に、これまでに作製したコンジュゲート体について、活性残存率と活性体である P450 の割合で整理することにより、P450cam のコンジュゲート体を作製する際の設計指針の獲得を試みた。今回、コントロールとして WT を用いた場合のコンジュゲート体を追加で作製した。なお、コンジュゲート体における P450 と P420 の割合の和に対する P450 の割合は、還元・CO 結合型と還元型の差スペクトルをとることで算出した。

4. 研究成果

Fmal との反応部位であるチオール基は、WT では 3 か所、3mD では 1 か所酵素表面に露出している。吸収スペクトル測定による定量結果より、WT 及び 3mD にコンジュゲートされた Fmal は酵素 1 mol 当たりそれぞれ 2.8 ± 0.2 mol, 1.5 ± 0.3 mol となり、理論通り P450cam に Fmal がコンジュゲートされていることを確認した。

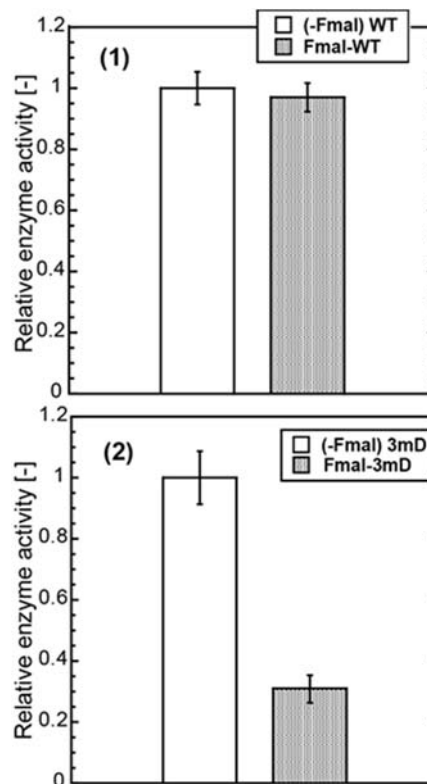


図 2 Fmal コンジュゲート前後の酵素活性 (1) WT, (2) 3mD

図 2(1)に Fmal-WT の、(2)に Fmal-3mD の相対活性を示す。コントロールとして、Fmal を加えない系で同一の反応、精製条件でサンプルを調製したものを(-Fmal) P450cam とする。何れの図も、白抜き棒グラフが(-Fmal) P450cam、黒抜き棒グラフが Fmal コンジュゲート後の P450cam の相対活性をそれぞれ示している。WT の場合、Fmal コンジュゲート前後で活性はほぼ変わらないものの、3mD の場合、Fmal コンジュゲート後の残存酵素活性が 30%程度に低下していることが分かった。これより、Fmal コンジュゲートは、WT の酵素活性には影響を与えないものの、3mD には大きな影響を与えることが分かった。

図 3(1)に Fmal-WT の、(2)に Fmal-3mD の CO 付加体の紫外可視吸収スペクトルを示す。コントロールとして、(-Fmal) WT 及び(-Fmal) 3mD の吸収スペクトルも併記した。破線が(-Fmal) P450cam、実線は Fmal コンジュゲート体を表す。なお、Fmal コンジュゲート体で見られる 492 nm 付近に見られる吸収ピークは、P450cam にコンジュゲートされた Fmal に由来している。Fmal-3mD の Soret 帯は(-Fmal)P450cam や Fmal-WT と同様に活性体由来の 450 nm に見られるものの、420 nm に新たなショルダーピークが見られた。この 420 nm の吸収ピークはヘムの軸配位子が変化した P450cam の不活性体である P420 に由来している。これらの結果から、WT では Fmal コンジュゲート後ヘム周辺の状態は変化せず P420 の割合も増加しないものの、3mD では Fmal コンジュゲート後、ヘム周辺の状態が変化し、僅かに P420 の割合が増加していることが明らかになった。

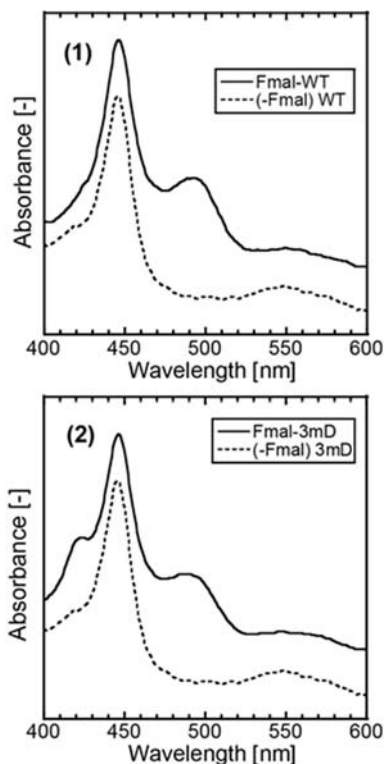


図 3 Fmal コンジュゲート前後の CO 付加体の吸収スペクトル (1) WT, (2) 3mD

これまでのアビジン-ビオチンの系では、アビジン認識後、P420 に変化することにより酵素活性が大幅に抑制されたが、Fmal の系では、別の要因で酵素活性が抑制されていることが示唆された。そこで、これまでに作製した、長さの異なるビオチン化 3mD、アビジン結合ビオチン化 3mD、長さの異なる PEG-3mD や、今回新たに調製したコントロールの WT とのコンジュゲート体に対して、活性体の割合と酵素活性残存率の相関関係を見た。その相関図を図 4 に示す。図中の*は既報のコンジュゲート体の結果である。

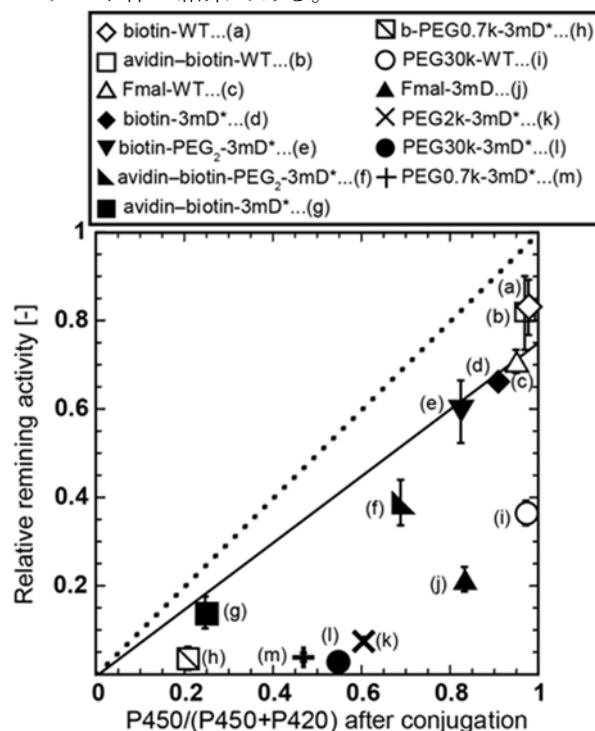


図 4 活性体の割合と酵素活性残存率の相関関係

図 4 より、以下の事柄が明らかになった。(1) WT と 3mD のコンジュゲート体で比較を行うと、どの化合物をコンジュゲートしても、3mD のコンジュゲート体の方が活性体の割合と酵素活性残存率が低くなる傾向にあった。(2) 多くのコンジュゲート体で、不活性体の割合が増加することにより、コンジュゲート後の酵素活性が低下した。(3) 高分子化合物であるポリエチレングリコールのコンジュゲート体や、蛍光物質と 3mD のコンジュゲート体 (h-m) は、活性体の割合に比して酵素活性残存率の割合が低かった。すべてのコンジュゲート体の基質存在下・酸化状態での紫外可視吸収スペクトルを図 5 に示す。基質である *d*-camphor 存在下では、ヘムの遠位側に *d*-camphor が結合し、高スピン型に変化しており、酸化状態では Soret 帯が 392 nm 付近に観察される。しかし、h-m のコンジュゲート体は、Soret 帯が 417 nm にシフトし、392 nm にショルダーピークが見られる。この 417 nm の吸収ピークは、一般に、*d*-camphor 非存在下でヘムが低スピン状態にあり、水がヘムの第六

配位子となった状態でみられる、基質非結合状態と同一の吸収スペクトルである。つまり h-m のコンジュゲート体は、基質の結合低下により酵素活性の低下が起こったことが示唆された。つまり、相関図中の h-m のような領域に位置する化合物を分子認識部位として利用すれば、分子認識により可逆的に活性が変化する人工アロステリック酵素への展開が期待される。

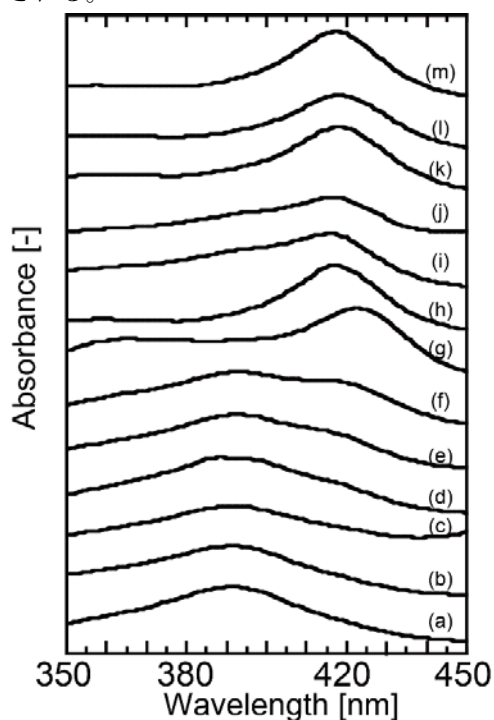


図5 コンジュゲート体の基質存在下・酸化状態での紫外可視吸収スペクトル

以上の知見は、分子認識により不可逆的に P450cam の活性が変化する人工アロステリック酵素開発の重要な設計指針であるといえる。

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 3 件)

1. Takanori Tamaki, Tomoharu Sugiyama, Masahiro Mizoe, Yuhei Oshiba, Takeo Yamaguchi, Reducing Physical Adsorption of Enzymes by Surface Modification, *J. Electrochem. Soc.*, **16**(13), H3095—H3099 (2014), 査読有

2. Yuhei Oshiba, Takanori Tamaki, Hidenori Ohashi, Hidehiko Hirakawa, Satoshi Yamaguchi, Teruyuki Nagamune, Takeo Yamaguchi, Correlation between the activity and molecular structure around the active center of cytochrome P450cam conjugates, *J. Chem. Eng. Jpn.*, **49**(5), 475—480(2016), 査読有

3. 大柴雄平,人工アロステリック酵素開発に向けた分子認識による活性抑制型人工酵素の研究, 学会誌「分離技術」, 第 46 巻 第 1 号

(通巻第 249 号), 48—54(2016), 査読無

〔学会発表〕 (計 5 件)

1. 森田直樹, 田巻孝敬, 大柴雄平, 山口猛央, 電極上の固定化酵素活性向上へ向けた研究, 化学工学会第 80 回年会, 2015 年 3 月 19 日, 芝浦工業大学, 東京

2. 市橋秋人, 大柴雄平, 大橋秀伯, 黒木秀記, 山口猛央, 急性心筋梗塞診断用分子認識ゲート膜の開発, 日本膜学会第 37 年会, 2015 年 5 月 14 日, 早稲田大学, 東京

3. 市橋秋人, 大柴雄平, 大橋秀伯, 黒木秀記, 山口猛央, 急性心筋梗塞診断用分子認識膜へ向けたペプチド固定化ポリマーの開発, 化学工学会第 47 回秋季大会, 2015 年 9 月 10 日, 北海道大学, 北海道

4. 大柴雄平, 材料機能システム設計に基づく活性抑制型人工酵素および燃料電池材料の開発, 「若手研究者による化学工学の最新技術」に関する講演会, 2016 年 3 月 7 日, 東京工業大学, 東京【招待講演】

5. 市橋秋人, 大柴雄平, 大橋秀伯, 山口猛央, 急性心筋梗塞診断用膜のためのペプチド固定化ポリマーの特性解析, 化学工学会第 81 回年会, 2016 年 3 月 13 日, 関西大学, 大阪

6. 研究組織

(1)研究代表者

大柴 雄平 (OSHIBA YUHEI)

東京工業大学・資源化学研究所・助教

研究者番号：10708530