

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19151

研究課題名(和文)補因子組込型人工ラジカル金属酵素の合理的創出

研究課題名(英文)Rational design of artificial radical enzymes bearing unusual protein-derived cofactor

研究代表者

藤枝 伸宇(Fujieda, Nobutaka)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：00452318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、種々の酵素やタンパク質分子内で、従来の翻訳後修飾(リン酸化等)の枠組みを超える化学的に高度な修飾を受けたアミノ酸側鎖(Protein-derived cofactor (PDC))が相次いで発見されてきた。本研究ではCPDCを補因子とする酵素の創出に挑戦した結果、小さな分子量を持つクビタンパク質を土台とし様々な位置に導入したチロシンとシステイン間の架橋形成が可能であり、新規PDCの形成を確認できた。特に、結晶構造解析を一層推し進め、形成された新規補因子はキノン骨格をもつことを示した。データ測定やクライオ条件をさらに検討し、構造の精密化を進め、占有率を高い精度で決定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

芳香族アミノ酸から生じる特殊な側鎖は配位子や補欠分子族(Protein-derived cofactor (PDC))として機能中枢を司るものが多く、その機能は多種多様で他の有機補因子にはない物理化学・触媒化学的に稀有な性質を示す。このように、今後、本研究結果を発展させ、様々なPDCを形成させることが可能になればタンパク質のさらなる機能化が期待される。

研究成果の概要(英文)：Galactose oxidase and amine oxidase bear the cofactors which is generated by post-translationally chemical modification of the corresponding amino acid side chains near the copper active center. For example, galactose oxidase has a cysteinyl-tyrosine (Cys-Tyr) cofactor formed from cysteine and tyrosine. The Cys-Tyr cofactor generates radical species as a reactive intermediate in the catalytic oxidation of alcohols. In this study, we have prepared rationally designed copper-binding proteins, which can induce the organic cofactors by posttranslationally chemical modifications. The structures and redox functions of the generated cofactors in the proteins were explored by several spectroscopic methods including X-ray crystallographic analysis.

研究分野：生体関連化学

キーワード：翻訳後化学修飾

1. 研究開始当初の背景

1990年代以降の構造生物学や質量分析技術の急激な発展を受けて、現在までに酵素分子内でアミノ酸側鎖が翻訳後化学修飾を受けて形成された架橋構造や補欠分子が相次いで発見されてきている。例を挙げるとガラクトース酸化酵素 (GAO) や銅アミン酸化酵素 (AO) は、活性中心に翻訳後化学修飾を受けて生成したアミノ酸残基由来の有機補欠分子族を有している (図1)。GAOでは翻訳後化学修飾によってチロシンとシステインの間で架橋が形成され Cys-Tyr 補因子を形成している (図1)。この Cys-Tyr 補因子が近傍の銅イオンと作用してラジカル活性種を生成し、アルコールの酸化反応を触媒することがわかっている。さらに AO ではチロシン残基が水酸化に引き続く、水分子によるマイケル付加反応を受けてトールキノン補因子を保有している。この TPQ は求電子剤としてアミンの求核攻撃の受容体として働くほか、ラジカル分子を経由するその後のスムーズな電子移動を司っている。このように翻訳後化学修飾によって形成された補因子は、タンパク質に触媒活性をはじめとする様々な機能を付与することが知られている。

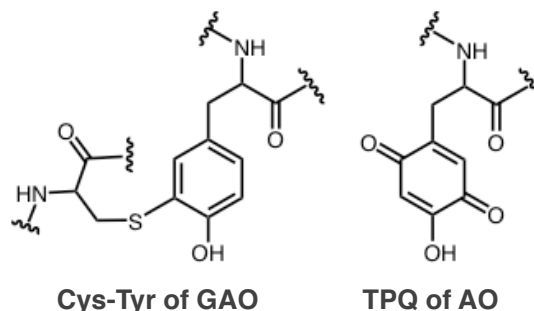


Figure 1. Protein-derived organic cofactors of GAO (left) and AO (right).

一方で、アミン脱水素酵素のトリプトフィルキノン (TTQ) や青色タンパク質 (Ranasmurfin) のクロモフォア (bis-リジルチロシルキノン, LTQ) など複数のアミノ酸残基が架橋する補因子も発見されている。二核金属タンパク質の活性中心近傍に Tyr-Val 架橋や Phe-Val 架橋などの存在が確認されている。これらは C-C 及び C-O 結合形成が達成されていることから、いまだ見ぬ新規なカップリングケミストリーの存在が示唆されており、形成機構に注目が集まっていた。

2. 研究の目的

前述の通り、天然酵素の AO や GAO などの銅含有酸化還元酵素では金属中心の寄与する反応によって、巧みに特殊なアミノ酸残基を形成させている。このようなアミノ酸残基の形成において活性中心金属-活性酸素種がそれらの形成を誘起している可能性が示唆され始めている。一方で、単核や二核鉄タンパク質において近傍の芳香族アミノ酸残基が酸化され、カテコールなどが発生する酸化的自己修飾が報告されている。これらより、金属中心の調整により、特殊な翻訳後化学修飾を人為的に引き起こせる可能性が示唆される。そこで、本研究では、このようなアミノ酸残基の翻訳後化学修飾に基づく新たな有機補因子の創成と、その特性評価、および触媒反応への応用をめざして検討を行った。さらに、モデルタンパク質としたクピタンパク質の活性中心での金属-活性酸素種による酸化的自己修飾の詳細な反応機構解明を目的とした。

3. 研究の方法

図1に示した Cys-Tyr 補因子は近傍の銅イオンの作用により自己触媒的に形成されることを鑑み、土台タンパク質としては様々な金属と結合する安定な超好熱菌由来クピタンパク質を用いた。第一段階として、酸化されやすいシステインとチロシンの翻訳後化学修飾に焦点を絞り、クピタンパク質が持たない Cys-Tyr をこのタンパク質の金属結合部位近傍に形成させ、それらの化学的性質や反応性について検討した。以前の研究で作成した金属結合サイト近傍に距離を変化させて芳香族アミノ酸を導入した変異体を数十種類から、酸化的自己修飾を生じた変異体を簡便な方法でスクリーニング後、スクリーニングポジティブな変異体について翻訳後化学修飾過程を詳細に検討した。また、これらの変異体をアポ体で調製後、銅イオンと反応させ、反応機構を解明した。変異体の調製とスクリーニングと特性評価を行い、酸化的自己修飾の詳細な反応機構を総括した。さらに、得られた Cys-Tyr 補因子を酸化することにより、天然には未だ見られなかったことのない新しい有機補因子が生成された。

4. 研究成果

58 番目のヒスチジンをアラニンに変異させたクピン変異体タンパク質をコードする DNA 配列を pET30 ベクターに組み込んだプラスミドを、大腸菌 BL21(DE3)株に形質転換し、硫酸銅を含む培地中で発現誘導を行った。アフィニティクロマトグラフィーと陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製し、結晶構造解析を行った。その結果、銅イオンに 52、54、92 番目の三つのヒスチジンが配位していることが確認された。この結晶構造に基づき、銅イオンの近傍 10 Å 以内に存在する 5 つのアミノ酸 (56, 58, 60, 106, 108 番) のうち二箇所に、システインとチロシンを

配置した変異体设计了。発現誘導を行い、SDS-PAGE を行った結果、以前も確認されていた 58 番目のヒスチジンをアラニンに 60 番目のイソロイシンをチロシンに変異させた二重変異体 A に加え、58 番目のヒスチジンをシステイン 106 番目のシステインをチロシンに変異させた二重変異体 B でバンドシフトが確認された。これらの変異体について、精製後、X 線結晶構造解析を行った結果、新たな二重変異体 B についても、システインとチロシンの間で架橋形成していることが確認できた。また、こちらの変異体では、架橋のあるアミノ酸残基と架橋のない残基に由来する二種類の電子密度が観測され、架橋形成が不完全であることが示唆された。チロシン 106 の近傍には嵩高いアルギニン 39 が存在していたため、この残基が立体障害となり架橋形成を妨げていると考え、アラニン残基に変異させた三重変異体を調整した。本変異体についても同様に結晶構造解析を行ったところ、完全な架橋の形成が確認された。このように様々な位置で翻訳後化学修飾を起こすことに成功した。続いて、以前から形成効率の良かった二重変異体 A において架橋構造がタンパク質の安定性や反応性に及ぼす効果を確認した。その結果、二重変異体 A は 100°C 付近でもほぼ変化は見られなかったが、架橋構造をもたない (106 番目のシステイン残基をアラニン残基に変異させた) 変異体では 80°C 付近で変性・沈殿が始まった。このことから、架橋構造がタンパク質の熱安定性を向上させていることが明らかになった。また、酸化剤として *t*-ブチルヒドロペルオキシドをタンパク質に対し 100 当量加え、Guaiacol の酸化反応を行った。生成物に由来する 470 nm の吸収帯を用いて反応速度を比較したところ、二重変異体 A は三重変異体に比べ約 4 倍の触媒活性を示した。このように Cys-Tyr 構造は熱安定性だけでなく、反応性にも寄与していることが分かった。さらに、天然には存在しない有機補因子の創製を目指し、Cys-Tyr の酸化を試みた。得られた二重変異体 A の結晶を 5 mM のヒドロキシルアミンを添加した沈殿剤に好気性条件下で三日間浸漬し、X 線結晶構造解析を行ったところ、Tyr 残基に新たな電子密度が現れた (図 2B)。このように、チロシンが酸化された新規なキノン構造 (もしくはカテコール構造) を人工的に形成させることに成功した。

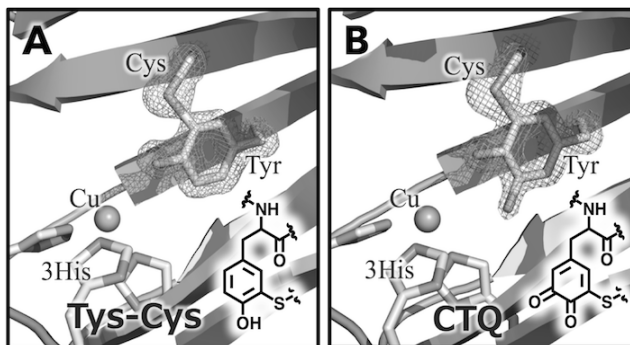


Figure 2. Electron density map around the Tyr-Cys residues mutants after soaking in a NH_2OH containing buffer for 3 days under aerobic conditions.

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 Fujieda Nobutaka, Ichihashi Haruna, Yuasa Miho, Nishikawa Yosuke, Kurisu Genji, Itoh Shinobu	4. 巻 in
2. 論文標題 Cupin Variants as a Macromolecular Ligand Library for Stereoselective Michael Addition of Nitroalkanes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/anie.202000129	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 Fujieda Nobutaka	4. 巻 84
2. 論文標題 His-Cys and Trp-Cys cross-links generated by post-translational chemical modification	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 445 ~ 454
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2019.1696178	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16件（うち招待講演 9件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Nobutaka Fujieda
2. 発表標題 Artificial Metalloenzymes Bearing a Cupin Fold
3. 学会等名 ArtZymes 2.0（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019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利用した反応開発
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第7回公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤枝伸宇
2. 発表標題 特異な翻訳後修飾アミノ酸を有する金属酵素の機能解析および新規創製
3. 学会等名 2019年度日本農芸化学会関西支部大会（招待講演）
4. 発表年 2019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利用した反応創製
3. 学会等名 AICOC-3（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nobutaka Fujieda
2. 発表標題 Cupin Proteins as Multipotent Macromolecular Ligands
3. 学会等名 生物無機化学国際シンポジウム2018（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinobu Itoh, Kyohei Umakoshi, Nobutaka Fujieda
2. 発表標題 New Insights into Tyrosinase Mechanism
3. 学会等名 9th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤枝伸宇
2. 発表標題 高機能性配位子としてのタンパク質
3. 学会等名 生体機能関連化学若手の会 第30回サマースクール (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤枝伸宇
2. 発表標題 チロシナーゼの成熟過程と反応機構
3. 学会等名 第91回生化学会大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤枝伸宇
2. 発表標題 Development of asymmetric catalysts with proteins as versatile ligands
3. 学会等名 日本化学会第99回春季年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nobutaka Fujieda, Atsuki Matsuo, Haruna Ichihashi, Takumi Nakano and Shinobu Itoh
2. 発表標題 Cupin Proteins as Versatile Macromolecular Ligands
3. 学会等名 9th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松尾徳紀・市橋春菜・藤枝伸宇・伊東 忍
2. 発表標題 選択的なC-C結合形成反応を触媒する人工金属酵素の創製
3. 学会等名 第45回生体分子科学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小田原駿・松尾徳紀・藤枝伸宇・伊東 忍
2. 発表標題 貴金属活性中心を有する人工金属酵素の開発
3. 学会等名 第45回生体分子科学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤枝伸宇・松尾徳紀・小田原駿・市橋春菜・伊東 忍
2. 発表標題 タンパク質を利用した機能性配位子の開発
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松尾徳紀・市橋春菜・藤枝伸宇・伊東 忍
2. 発表標題 貴金属イオンを組み込んだ人工金属酵素触媒の創製と選択的C-C結合形成反応への応用
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松尾徳紀・湯浅美穂・藤枝伸宇・伊東 忍
2. 発表標題 シス選択的シクロプロパン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99回春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小田原駿・湯浅美穂・藤枝伸宇
2. 発表標題 ケトンの不斉還元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99回春季年会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------