

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21750169

研究課題名 (和文) 潜在的酵素活性の制御による新規酵素の創製

研究課題名 (英文) Creation of New Artificial Metalloenzyme by using the intrinsic chemical reactivity

研究代表者

藤枝 伸宇 (FUJIEDA NOBUTAKA)

大阪大学・工学研究科・助教

研究者番号：00452318

研究成果の概要 (和文)：

タイプ3銅タンパク質におけるペルオキシ銅中心の本質的な反応性を化学的処理によって発現させ、酸化活性のないヘモシアニンに水酸化活性を付与することに成功した。一方で、加水分解酵素の亜鉛中心を銅中心に置換することに加え、金属に配位しているアミノ酸残基を対象に絞った部位特異的変異導入により加水分解酵素の持つ酸化活性を増幅させることに成功した。

研究成果の概要 (英文)：

We have isolated one of the monomeric subunits as well as the hexameric assembly of swimming crab *Portunus trituberculatus* and attempted to convert them to monooxygenase by applying the above-mentioned system. We also tried to develop a metallo- $\beta$ -lactamase to construct a new artificial dinuclear metalloenzymes as a metal-binding platform.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 2,400,000 | 720,000   | 3,120,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：化学

科研費の分科・細目：生体関連化学

キーワード：酸素活性化・銅タンパク質・過酸化水素・水酸化反応・交差反応性

## 1. 研究開始当初の背景

近年、化学工業の環境適合性が重要視されていることに加え、極限環境微生物などから発見された非常に汎用性の高い酵素群に後押しされ、酵素触媒を用いた温和な条件化でのファインケミカル・医療薬品の合成が非常に注目されている。しかし、新規酵素のスクリーニングには限界があり、いまだに応用可能な酵素触媒の種類は限られている。そのため、酵素触媒は無機触媒に取って代わる技術とはなっていない。こういった背景の下、ス

クリーニングに依存せず、性質の良く知られた酵素を改変し新規酵素触媒として分子設計するための汎用性の高い方法論構築が望まれている。しかしながら、現時点では新規な基質選択性・触媒活性を生み出すためのタンパク質分子設計においては明確な指標がなく、現実問題として構造情報やランダムな変異導入に頼るほかはない。従来、酵素は特異的な基質・反応選択性とその本質であるとされてきたが、実際には寛容な基質特異性や副活性をもつものが古くから報告されている。これらの所謂“酵素”的でない特性は現

在まで黙殺されてきたが、寛容な基質特異性はバイオカタリストとしての応用を考える際、有力な特性であり、工業的に重要な副反応は新規活性のひな形として分子設計の指標となりうる。そのため、これら酵素の“隠蔽された”機能に注目が集まり、本来の活性とは異なる反応を触媒したり、生理的基質以外の物質を基質としたりすることを酵素交差反応性と呼び、注目を集めている。

## 2. 研究の目的

芳香族化合物の触媒的水酸化反応の開発は、有機合成化学や有機工業化学の分野において非常に重要な研究課題の一つであり、古くから活発に研究が展開されてきた。しかし、常温・常圧下での効率的かつ選択的な触媒的水酸化反応を達成した例は非常に少ない。一方、生物無機化学の分野においては、特に最近、各種遷移金属錯体による分子状酸素の活性化についての研究が精力的に展開され、活性酸素錯体の構造や物性および反応性の詳細が明らかにされてきた。しかしながら、それらの遷移金属錯体を実際の触媒反応へ応用した例は殆どない。更に、最近の環境問題解決のための社会的ニーズから、水を溶媒とする反応系の開発が急務となっている。また、生化学分野においても金属酵素の構造や機能に関する研究が活発に行われているが、金属酵素自身を触媒として用いた炭化水素の水酸化反応に関する研究例は非常に少ない。

脂肪族や芳香族化合物に対する位置選択性や立体選択性の高い水酸化反応系はファインケミカルや医薬品のビルディングブロック合成への応用が期待され、工業的にも重要な反応プロセスである。タンパク質酵素の一群であるモノオキシゲナーゼ（一酸素原子添加酵素）は一般に分子状酸素の1つの酸素原子を基質に添加する反応を触媒し、それに伴ってもう1つの酸素原子を還元して水にする。このように副生成物が水だけという単純で究極的な環境調和型反応を触媒するため、古くから興味深い研究対象とされてきた。また、ごく最近、膜結合型メタンモノオキシゲナーゼの結晶構造が解かれ、二核銅中心の関与が示唆されたことで、銅タンパク質の酸化触媒としての応用が大いに期待されている。

また、高い触媒効率や反応特異性を有する酵素の開発は化学者・生物学者にとって興味深い対象となっている。また、自然界における酵素のうち約半数が金属イオンを含み、構造保持および触媒サイクルに重要な役割を担っており、金属酵素はしばしば分光学的、磁氣的性質を有することから酵素設計に有用な指標を獲得することが可能である。これまで単核金属酵素の活性中心金属を操作し、天然とは異なる新規活性を生み出した例が

いくつか報告されてきた。それゆえに、複核金属酵素の設計にも注目が集まっており、現在までにペリプラズムタンパク質をもとにした二核銅タンパク質やデノボ設計による二核鉄酸化酵素など数例報告されているが、その反応性についてはほとんど検討されていない。このような背景の下、本研究では、(1)天然の銅タンパク質を用いた芳香族化合物の水酸化反応および(2)二核銅酸化酵素の人工的構築という二種類のアプローチで穏和な条件下で進行する酸化反応系の構築を行った。

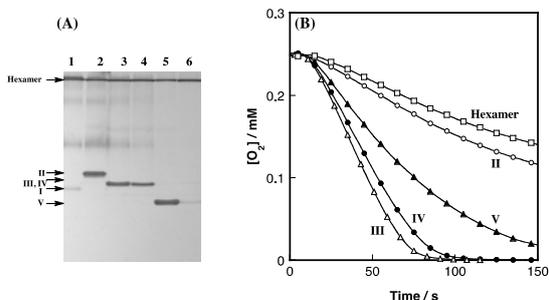
## 3. 研究の方法

(1) チロシナーゼに代表されるタイプ3銅タンパク質はチロシンの水酸化反応およびカテコールの酸化反応を触媒することが知られている。また、類似のタンパク質であるヘモシアニンは軟体動物や節足動物に多量に存在するため、水酸化触媒として容易に利用できること期待される。そこで、ワタリガニの体液から簡単なクロマトグラフィーで調製したヘモシアニンをを用いてフェノールの水酸化反応系の確立を目指した。尿素および過剰なフェノール誘導体存在下で酸素電極を用いて反応系中の酸素濃度をモニタリングしたところ時間の経過とともに酸素濃度が減少し、フェノールの水酸化反応が効率よく進行することが分かった。また、対応するカテコール誘導体は定量的に生成することがHPLCによって確認された。これらのことから、ヘモシアニンは同様に穏和な条件下で機能する環境調和型の水酸化触媒として利用できる可能性が示唆された。

(2) 二核の亜鉛中心を含有する細菌由来金属 $\beta$ -ラクタマーゼを用いて、活性中心金属の置換と部位特異的変異導入を組み合わせることで人工的に二核銅酸化酵素構築を試みた。硫酸銅(II)を含む培地中、大腸菌内で発現させたところ、金属 $\beta$ -ラクタマーゼにおいて二核銅中心の形成が見られた。また、本来の亜鉛中心に対する配位子に注目し、すべての配位子がヒスチジンとなる変異体を作製したところ、野生型と同様の調整方法で二核銅中心の形成が見られた。さらに、野生型と比べ、カテコールの酸化活性は100倍以上に増大した。また、その二核銅中心は分光学的にタイプ3銅に類似した配位構造を取っていることが示された。二核亜鉛中心を有し、結晶構造の明らかな金属 $\beta$ -ラクタマーゼを用いて、亜鉛を銅へと置換し、加水分解酵素から酸化還元酵素への変換を目指した。また種々の変異体を調製し、配位子と酸化活性の相関について検討を行った。

#### 4. 研究成果

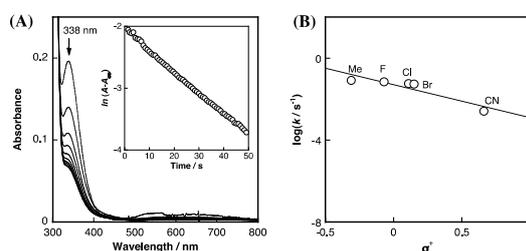
(1) 本研究では、二核銅活性中心を有する銅タンパク質（タイプ3銅タンパク質）に着目し、それを触媒として用いた効率的かつ選択的な芳香族化合物の水酸化反応系の開発をめざして研究を行った。さらに水酸化反応のメカニズムの詳細についても検討を加え、二核銅活性酸素錯体による芳香族化合物のC-H結合活性化機構を明らかにした。軟体動物や節足動物の血液中に存在するヘモシアニンは、二核のタイプ3銅活性中心を有する酸素運搬タンパク質である。ヘモシアニンは、フェノール誘導体の酸素化やカテコール誘導体の酸化を司るチロシナーゼと同様のペルオキシ二核銅(II)種を有しているが、活性中心の近傍に存在するアミノ酸残基に覆われているため、通常は外部基質に対する反応性を示さない。本研究では、このようなヘモシアニンの活性中心に含まれる二核銅酸素錯体の酸化触媒として利用することを考えた。ヘモシアニンの高次構造は軟体動物と節足動物では大きく異なっているが、構造と機能の関係は不明である。本研究では、節足動物の一つであるワタリガニ由来のヘモシアニンをを用いたフェノール誘導体の酸素化反応系の構築について検討を行った。節足動物のヘモシアニンは一つの二核銅活性中心を持つ異なったタイプのサブユニットが六つ集まって6量体となり、それが更に会合して超分子複合体を形成している。本研究では、各サブユニットと6量体を単離・精製し、それぞれの性質および酸化活性について検討を行った。



**Figure 1.** (A) Native PAGE; lane 1 ~ 5: isolated hemocyanin subunits I ~ V, respectively, lane 6: hexameric hemocyanin. (B) Time courses of O<sub>2</sub> consumption observed in the monoxygenase reaction of *p*-cresol (12 mM) by the hemocyanin subunits (II ~ V) and the hexamer (26 mM based on the (μ-η<sup>2</sup>:η<sup>2</sup>-peroxo)dicopper(II) unit) in a borate buffer containing urea (3 M) at pH 9.0.

生きたワタリガニから血リンパ液を採取し、遠心分離を行って不溶物を取り除いた。次に pH 9.5 の緩衝液に尿素を添加して静置後、陰イオン交換カラムを用いてヘモシアニンの各単量体 I~V および6量体を単離・精

製した (Figure 1A)。得られた各サブユニットと6量体の紫外可視吸収スペクトル測定を行ったところ、いずれも 338 nm と 580 nm に  $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-}$ ペルオキシ二核銅(II)種に起因する吸収極大を持ち、これらのヘモシアニンは oxy 体として単離されたことを確認した。またこのペルオキシ種は 3 M の尿素存在下、嫌気下でも比較的安定に存在することが紫外可視吸収スペクトルや円二色性偏光スペクトル (CD) の測定からわかった。次に各サブユニットと6量体のモノオキシゲナーゼ活性について、酸素電極を用いて検討した (Figure 1B)。反応溶液中の酸素濃度が基質 (*p*-cresol) の添加により著しく減少することから、それぞれのサブユニットおよび6量体は、尿素 (3 M) を作用させる事によりモノオキシゲナーゼ活性を発現することを見いだした。生成物である 4-methylcatechol の生成は HPLC で確認した。本反応では溶媒にホウ酸緩衝液を用いているため、ホウ酸イオンが生成物のカテコールと錯形成し、キノン体への酸化が抑制され、選択的にカテコール体のみが得られる。各サブユニットの触媒活性は6量体の場合よりも高く、また、各々のサブユニット間にも触媒活性に違いがみられた。このような触媒活性の違いは、各サブユニット間の立体構造の違いに起因するものと思われる。

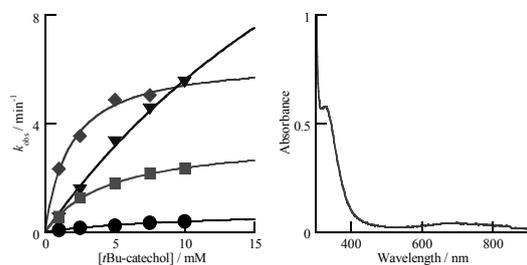


**Figure 2.** (A) Spectral changes observed upon addition of *p*-cresol (1.5 x 10<sup>-2</sup> M) to the oxy-form of hemocyanin monomer V (1.25 x 10<sup>-5</sup> M) in 0.5 M borate buffer (pH 9.0) containing 5 % MeOH and 3 M urea at 25 °C under N<sub>2</sub>: 20 s interval (Inset: First-order plot based on the absorption change at 338 nm). (B) Hammett plot.

次に、反応機構の詳細を明らかにするため、嫌気性条件下で  $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-}$ ペルオキシ二核銅(II)種と各種 *p*-置換フェノールとの反応を速度論的に検討した。活性の評価は、ペルオキシ種由来の 338nm の吸収の減少速度を紫外可視吸収スペクトルを用いて追跡する事により行った。嫌気性条件下における各種 *p*-置換フェノールとの反応は、ヘモシアニン6量体の場合、異なる活性を持ったサブユニットが数種類存在する為に反応の速い過程と遅い過程が存在し、単純な1次反応として解析する事が出来なかった。しかしサブユニット V の場合は、きれいな一次反応として解析する

事が可能であった (Figure 2A)。得られた  $k_{\text{obs}}$  を基質濃度に対してプロットすると Michaelis-Menten 型の飽和曲線が得られ、Hanes-Woolf プロットより  $K_m$ 、 $V_{\text{max}}$  をそれぞれ求めた。更に各種  $p$ -置換フェノール誘導体 ( $X = \text{Me, F, Cl, Br, CN}$ ) を基質として用いて同様に速度論的検討を行い基質置換基の電子的効果について検討したところ、置換基の電子ドナー性が上がるにつれて  $V_{\text{max}}$  の値も増大し、 $V_{\text{max}}$  の  $\log$  値をハメットの  $\sigma^+$  に対してプロット (Hammett プロット, Figure 2B) すると、 $\rho$  値は  $-1.6$  であった。この値は、これまで我々の研究室で明らかにしたマッシュルームチロシナーゼによるフェノールの酸素化反応における  $\rho$  値、 $-2.4$  や、軟体動物のマダコ由来のヘモシアニンの触媒反応における  $\rho$  値、 $-2.0$  という値と非常によい一致を示した。以上のような結果から、サブユニット V のモノオキシゲナーゼ反応は、芳香族求電子置換反応で進行していることが明らかになった。またこの反応メカニズムは負の同位体効果 ( $k_{\text{H}}/k_{\text{D}} = 0.94$ ) が得られたことから支持された。

(2) *Stenophonomas maltophilia* 由来の金属  $\beta$ -ラクタマーゼ L1 の cDNA を合成し、発現用プラスミド pET30 に導入した。このプラスミドを BL21(DE3) に形質転換した後、1 mM の  $\text{CuSO}_4$ 、誘導物質として 0.2% のラクトースを含む培地中で大量培養を行った。発現誘導後の菌体をコールドオスモティックショック法により破菌し、SDS-PAGE を行ったところ、ペリプラズム画分に金属  $\beta$ -ラクタマーゼのバンドが確認できた。さらに SP-sepharose を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーで精製を行ったところ、SDS-PAGE 上で金属  $\beta$ -ラクタマーゼに由来する単一のバンドが確認された。ICP 測定からタンパク質一分子に対して、約 2 当量の Cu イオンが結合していることが分かった。またゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより、溶液中 4 量体を形成していることが確認できた。



**Figure 3.** Left: Rate dependence on substrate concentration Wild type (circle), D120H (square), S221H/D120G (diamond), and S221H/D120G/P262G (triangle). Right: UV-spectrum of S221H/D120G

続いて外部基質に  $t$ -ブチルカテコールを用

いて、その酸化活性について検討を行った。pH 7 のリン酸緩衝液中で  $t$ -ブチルカテコールと反応させたところ、400 nm の吸収増大が観測され、 $t$ -ブチルキノンが生成したことが分かった。さらにカテコールの濃度依存性について検討を行ったところ、Michaelis-Menten 型の飽和曲線を示し、ターンオーバー数は  $0.66 \text{ min}^{-1}$  となった。この結果から銅置換型ラクタマーゼがカテコール酸化酵素として機能することが明らかとなった。

さらなる活性の向上を目指してアミノ酸残基に種々の変異を導入し、チロシナーゼの構造を模倣した D120H、S221H/D120G、S221H/D120G/P262G 変異体を調整した。野生型と同様の発現・精製方法により単離したところ、それぞれ 2 当量の銅と結合し、また 4 次構造を保持していることが確認できた。調整した変異体は  $t$ -ブチルカテコールの酸化反応に対し活性を示し、ターンオーバー数は D120H において  $k_{\text{cat}} = 3.9 \text{ min}^{-1}$ 、S221H/D120G において  $k_{\text{cat}} = 6.2 \text{ min}^{-1}$ 、S221H/D120G/P262G において  $k_{\text{cat}} = 86 \text{ min}^{-1}$  と算出され、野生型に比べ 130 倍にまで活性を上昇させることに成功した (Figure 3)。これら変異体の活性変化の要因について検討を行うため紫外可視吸収スペクトルを測定したところ、活性が上昇するに従って  $d-d$  バンドが 740 nm から 700 nm へとブルーシフトしていることがわかった。また活性の高い S221H/D120G、S221H/D120G/P262G は 330 nm にショルダーピークを有し、チロシナーゼ *met* 体のスペクトルと類似していることから、チロシナーゼと類似のジオメトリーをとっていると考えられる (Figure 3)。また ESR スペクトルを測定したところ、野生型が ESR アクティブであったのに対し、変異体は全て ESR サイレントであった。それゆえに変異導入により活性中心の銅間距離が近付き、磁氣的に相互作用した Type 3 銅タンパク質の特性を有していることがわかった。以上本研究では二核亜鉛酵素である金属  $\beta$ -ラクタマーゼを用いて、活性中心の金属成分や配位子を操作し、人工的にカテコール酸化酵素の活性を生み出すことに成功したと考えられる。今後、天然の銅水酸化酵素やモデル研究の情報をもとに人工的に酸化酵素を改質していくことでより効率的で汎用性の高い化学触媒が構築できると期待される。

## 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. Nobutaka Fujieda, Takuya Ikeda, Michiaki Murata, Sachiko Yanagisawa, Shigetoshi Aono, Kei Ohkubo, Satoshi Nagao, Takashi Ogura, Shun Hirota,

- Shunichi Fukuzumi, Yukihiro Nakamura, Yoji Hata, and Shinobu Itoh  
*J. Am. Chem. Soc.* **133** (5), 1180-1183 (2011). [査読有]
2. Nobutaka Fujieda, Aki Yakiyama, and Shinobu Itoh  
*Biochem. Biophys. Acta*, **1804**, 2128-2135 (2010). [査読有]
3. Nobutaka Fujieda, Aki Yakiyama, and Shinobu Itoh  
*Dalton Trans.* **39** (12), 3083-3092 (2010). [査読有]

[学会発表] (計 16 件)

1. **CuB** 近傍のアミノ酸残基へ部位特異的変異を導入したチロシナーゼにおけるペルオキシ活性酸素種の特性評価 藪田真太郎・池田拓也・柳澤幸子・藤枝伸宇・小倉尚志・伊東 忍  
日本化学会第 91 春季年会 (2011)、神奈川県大学、平成 23 年 3 月 26 日～29 日
2. **CuA** 近傍のアミノ酸残基へ部位特異的変異を導入したチロシナーゼにおけるペルオキシ活性酸素種の特性評価 藤枝伸宇・池田拓也・藪田真太郎・柳澤幸子・小倉尚志・伊東 忍  
日本化学会第 91 春季年会 (2011)、神奈川県大学、平成 23 年 3 月 26 日～29 日
3. Monooxygenase Activity of Arthropod Hemocyanin Subunits. Nobutaka Fujieda, Aki Yakiyama, and Shinobu Itoh  
PacifiChem2010 Symposium on Dioxxygen Activation Chemistry and Catalytic Oxidation Reactions (#108)  
Convention Center, Waikiki, Hawaii, USA, December 18-20, 2010.
4. Chemical Function of Fungal Tyrosinase and Its Mutants (Invited Talk)  
Nobutaka Fujieda, Takuya Ikeda, Shintaro Yabuta, Michiaki Murata, and Shinobu Itoh  
60th Anniversary Conference on Coordination Chemistry, Osaka, Japan, September 27-30, 2010.
5. 金属置換型チロシナーゼの調製と特性評価 藪田真太郎、藤枝伸宇、池田拓也、伊東 忍  
第 25 回生体機能関連化学シンポジウム、大阪大学、平成 22 年 9 月 24 日～26 日
6. ラクタマーゼをプラットフォームとした二核銅タンパク質の調製 長谷川篤彦、藤枝伸宇、江口奈緒、伊東 忍第 25 回生体機能関連化学シンポジウム、大阪大学、平成 22 年 9 月 24 日～26 日
7. ペルオキシ二核銅(II)活性種によって誘起されるチロシナーゼ活性中心の Cys-His 架橋形成 池田拓也、藤枝伸宇、

- 藪田真太郎、伊東 忍第 25 回生体機能関連化学シンポジウム、大阪大学、平成 22 年 9 月 24 日～26 日
8. チロシナーゼの銅イオン取り込みに伴う活性中心の形成機構 藤枝伸宇・池田拓也・藪田真太郎・伊東 忍  
第 37 回生体分子科学討論会、山口大学、平成 22 年 6 月 18 日、19 日
9. オキシチロシナーゼに含まれるペルオキシ種の特性評価と反応性の検討 藤枝伸宇・池田拓也・伊東 忍  
日本化学会第 90 春季年会 (2010)、平成 22 年 3 月 26 日～29 日、近畿大学
10. 金属置換型チロシナーゼの調整とその分光学的特性 藪田真太郎・藤枝伸宇・伊東 忍  
日本化学会第 90 春季年会 (2010)、平成 22 年 3 月 26 日～29 日、近畿大学
11. 銅の取り込みに伴うチロシナーゼ活性中心の Cys-His 架橋形成 池田拓也・藤枝伸宇・伊東 忍  
日本化学会第 90 春季年会 (2010)、平成 22 年 3 月 26 日～29 日、近畿大学
12. 銅置換型 metall- $\beta$ -lactamase の酸化還元特性 長谷川篤彦・藤枝伸宇・伊東 忍  
日本化学会第 90 春季年会 (2010)、平成 22 年 3 月 26 日～29 日、近畿大学
13. ワタリガニ由来のヘモシアニンサブユニットの単離・精製と反応性 焼山亜紀・藤枝伸宇・伊東 忍  
日本化学会第 90 春季年会 (2010)、平成 22 年 3 月 26 日～29 日、近畿大学
14. 変異導入によるチロシナーゼの機能改変 池田拓也、村田理章、藤枝伸宇、伊東 忍  
第 24 回生体機能関連化学シンポジウム、九州大学、平成 21 年 9 月 14～15 日
15. カニ由来ヘモシアニン単量体の酸化機能 焼山亜紀、藤枝伸宇、伊東 忍  
第 24 回生体機能関連化学シンポジウム、九州大学、平成 21 年 9 月 14～15 日
16. 麹菌由来の新規なチロシナーゼが含有する二核銅活性中心の反応性 藤枝伸宇、村田理章、池田拓也、伊東 忍 (口頭)  
第 36 回生体分子科学討論会、平成 21 年 6 月 19 日～20 日、北海道大学

[その他]

URL:[http://www-bfc.mls.eng.osaka-u.ac.jp/BioFunctional\\_Chemistry](http://www-bfc.mls.eng.osaka-u.ac.jp/BioFunctional_Chemistry)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤枝 伸宇 (FUJIEDA NOBUTAKA)

大阪大学・工学研究科・助教

研究者番号：00452318