

大阪科学・大学記者クラブ 御中
(同時提供先：文部科学記者会、科学記者会)

2023年3月15日
大阪公立大学

高い立体選択性を持つ人工金属酵素の簡便な創製に成功！ ～天然酵素のメカニズム解明に期待～

<ポイント>

- ◇天然の非ヘム金属酵素^{*1}にみられる共通金属結合モチーフ 2-His-1-carboxylate^{*2}を持つ人工金属酵素を簡便に創製することに成功。
- ◇天然酵素にも見られる金属イオンの位置遷移が、本研究で創製した人工金属酵素でも観測。
- ◇本研究で創製した人工金属酵素の反応機構を詳細に解析することで、天然酵素の反応メカニズム解明に繋がるのが期待。

<概要>

大阪公立大学大学院 農学研究科 藤枝 伸宇教授らの研究グループは、天然の非ヘム金属酵素にみられる共通金属結合モチーフ 2-His-1-carboxylate を持つ人工金属酵素を簡便に創製することに成功しました。

近年、酵素を用いた物質生産は環境にやさしい技術として注目されています。しかし、化学工業に展開可能な反応を触媒する天然酵素は少なく、人工的に酵素を創製することが求められています。

本研究により、高い立体選択性^{*3}を持つ人工金属酵素を簡便に創製できることが明らかとなりました。また、この人工金属酵素では天然酵素に見られる金属イオンの位置遷移が観測されたことから、未解明な部分が多い天然酵素の反応メカニズム解明の一助となるのが期待されます。

本研究成果は、2023年3月13日に、国際学術誌「Chemical Science」のオンライン速報版に掲載されました。

農学研究科 生命機能化学専攻 教授 藤枝 伸宇 (ふじえだ のぶたか)
研究分野：タンパク質酵素有効活用・人工酵素設計法・生物無機化学

■コメント

反応部位が柔軟な非ヘム金属酵素を作り出すことに成功しました。金属酵素の分子設計は難易度が高く、計算科学が発達した今も自在に行うことはできません。本研究を発展させることで、温和な条件下で活躍するさまざまなバイオ触媒が生み出されていくことを期待しています。



<研究の背景>

細胞内ではさまざまな酵素が働いて、化学・位置・立体特異的で非常に難しい反応がいつも簡単に実現しています。こういった酵素を人工的に作り出すことができれば、持続可能で環境に優しい物質生産につながります。ただ、酵素の反応メカニズムは未解明なことが多く、思いのままに設計することはできません。そのため、簡便に酵素を作り出す方法が求められています。本研究グループでは、これまで分子量が1万程度の小さな耐熱性の金属結合タンパク質を作り直すことで人工金属酵素を創製してきました。

<研究の内容>

本研究では、はじめに金属イオンが直接アミノ酸残基に配位した天然の非ヘム金属酵素にみられる共通金属結合モチーフである 2-His-1-carboxylate を持つ人工金属酵素を創製しました。この人工金属酵素は、4つのヒスチジンからなる金属結合サイトを持っており、これら4つのアミノ酸部位に変異導入することでさまざまな金属配位構造を創出することができます。

そこで、1つのヒスチジンをアラニン、もう1つのヒスチジンをグルタミン酸に変異させることで、12種類の 2-His-1-carboxylate をもつタンパク質ライブラリーを作製しました。ベンチマーク反応として、アザカルコンとアセト酢酸メチルを用いたマイケル付加反応^{*4}でそれらのライブラリーをスクリーニングした結果、H52A/H58E という変異体に銅イオンを結合させた酵素において最も良い立体選択性を達成しました(図 a)。

次に、この人工金属酵素の選択性を明らかにするため、X線結晶構造解析により金属結合サイトを解析しました。その結果、2つのヒスチジンと1つのグルタミン酸が銅イオンに結合しており、銅イオンに由来する電子密度が2つ観測されました(図 ab)。

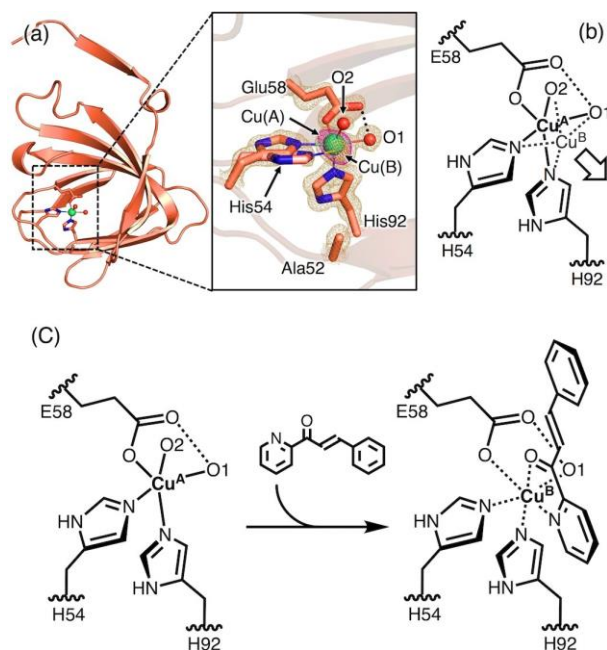


図 新規人工金属酵素の結晶構造と推定反応機構

続いて、基質であるアザカルコンとドッキングシミュレーション^{*5}を行った結果、この2つの銅イオンのうち金属結合サイトから少しはみ出している方の銅に結合する可能性が示唆されました。つまり、基質が結合しやすいところまで銅イオンが動くことによって選択性が最大となったと考えられます(図 c)。こういった金属イオンの位置遷移は天然酵素でも見られており、この人工金属酵素の反応機構を詳細に解析することで天然の酵素に関する知見をより深めることが期待されます。

<期待される効果・今後の展開>

本研究により我々の手法が効率よく、高い立体選択性をもつ人工金属酵素を創製する手法であることが示されました。さらに、人工酵素金属を作り出すことによって天然酵素の反応メカニズム解明のヒントを得る可能性を示しました。

本研究成果を基盤として更に研究を展開することで、さまざまな反応を触媒する人工酵素が生み出されると考えられます。また、この酵素を組み合わせることで、環境にやさしい物質変換系が構築できると期待されます。

<資金情報>

本研究は新学術領域研究(公募研究)「タンパク質を多能性配位子とした精密制御反応場の創出」(課題番号: 18H04270)、科研費基盤研究(B)「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」(課題番号: 21H01954)、ノバルティス科学振興財団、公益財団法人住友財団などの支援の下で実施されました。

<用語解説>

※1 非ヘム金属酵素: 遷移金属イオンが直接アミノ酸残基に配位した活性中心をもつ酵素のこと。ヘモグロビンなどに含まれるヘム鉄とは異なることから非ヘムと名付けられた。

※2 2-His-1-carboxylate: 2つのヒスチジンとカルボン酸(グルタミン酸とアスパラギン酸)からなるもので、特に facial 配位構造をとるものは配位アミノ酸が逆側に広い基質結合サイトをもち、酵素活性の促進を考えると考えられています。

※3 立体選択性: 分子内での化学反応において、反応に参加する分子の立体構造によって反応速度や反応生成物に変化すること。高い立体選択性は、酵素の立体構造が非常に複雑であることによって実現されます。

※4 マイケル付加反応: α,β -不飽和カルボニル化合物に対して求核剤を1,4-付加させる反応。

※5 ドッキングシミュレーション: 低分子と生体高分子(タンパク質など)間相互作用における複合体の安定構造をコンピュータ上で推測する方法。

<掲載誌情報>

【発表雑誌】 Chemical Science (IF=9.969)

【論文名】 An artificial metallozyme with pliable 2-his-1-carboxylate facial triad for stereoselective Michael addition

【著者】 Ryusei Matsumoto, Saho Yoshioka, Miho Yuasa, Yoshitsugu Morita, Genji Kurisu and Nobutaka Fujieda

【掲載 URL】 <https://doi.org/10.1039/D2SC06809E>

【研究内容に関する問い合わせ先】

農学研究科

教授 藤枝 伸宇 (ふじえだ のぶたか)

TEL : 072-254-9457

E-mail : fujieda@omu.ac.jp

【報道に関する問い合わせ先】

広報課 担当 : 久保

TEL : 06-6605-3411

E-mail : koho-list@ml.omu.ac.jp