

1. エナンチオ選択性は「結合」という物理的ステップに由来する

私たちの研究グループは、 α/β -ヒドロラーゼ型酵素がどのようにして選択性と触媒効率を実現しているかを長年にわたり研究してきた。1990年代初頭には、二級アルコールのどちらのエナンチオマーがリパーゼやエステラーゼとより速く反応するかを予測する経験則を確立した。^[1] この法則は、不斉中心における置換基の相対的な大きさに基づいており、複数のリパーゼに対する多様な基質について、エナンチオ選択性を正しく予測できた。その後、X線結晶構造解析により、この経験則に対する構造的説明が与えられた。すなわち、アルコール結合部位には大きなポケットと中くらいのポケットが存在し、反応速度の速いエナンチオマーは、大きな置換基を大きなポケットに配置するのである。^[2] この研究により、基質の結合という物理的ステップが、酵素のエナンチオ選択性を決定づけることが明確になった。

2. 触媒的多機能性も物理的ステップに起因するのか？

触媒的多機能性とは、単一の酵素が機構的に異なる複数の反応を触媒する能力を指し、 α/β -ヒドロラーゼファミリーに広く見られる。^[3] 例えば、一部のエステラーゼは、効率は低いものの、C-C結合の切断も触媒する。私たちは、祖先配列の再構築を用いて、エステラーゼとヒドロキシニトリルリアーゼ(HNL)の進化上の分岐点に位置する酵素を復元し、これらの祖先型酵素がより高い多機能性を示すことを明らかにした。^[4] 両反応タイプとも同じ触媒三残基(Ser-His-Asp)を利用していることから、これらの結果はより深い疑問を提起した。すなわち、HNLのわずかなエステラーゼ様活性を効率的な触媒活性へと変換するためには、他に何が変わらなければならないのだろうか？本講演では、その答えとして「協調的触媒ネットワーク」という概念を提示する。つまり、効率的な触媒作用には、化学的および物理的、両方からの残基の完全な組み合わせが不可欠というものである。

3. 化学的に必須な残基と物理的に必須な残基

バイオインフォマティクス解析により、結合の形成や切断に關与する「化学的に必須な残基」は比較的容易に推定できる。しかし、酵素反応は、基質の結合、化学的な変換、生成物の放出という複数の連続したステップが含まれる。私たちは、効率的な触媒作用には、2つのクラスの残基からなる協調的なネットワークが必要であると提案する。1つは、化学反応そのものを行う「化学的に必須な残基」である。もう1つは、化学反応が起こるための条件を整える役割を果たす「物理的に必須な残基」であり、活性部位を覆い隠し、触媒の立体構造をあらかじめ整え、基質のアクセスと生成物の放出を制御する。いずれのクラスも単独では不十分である。

α/β -ヒドロラーゼ型酵素は、この仮説を検証するための理想的なモデルと考えられる。HNLとエステラーゼは、同じ折り畳み構造と同じ触媒三残基(Ser-His-Asp)を共有しているにもかかわらず、前者はHCNの放出を伴うC-C結合の切断、後者はエステル加水分解、という根本的に異なる反応を触媒する。両酵素には化学的に必須な残基(触媒三残基とオキシアニオンホール)が存在するため、両酵素の比較により、物理的に必須な残基の役割を特定できる。

4. ヒドロキシニトリルリアーゼのエステラーゼへの変換

祖先型HNL(HNL1)を出発点として、活性部位周辺の残基(7Å以内)をすべて相同なエステラーゼの残基に置換しても、kcatは改善されなかった。すなわち、活性部位の同一性だけでは不十分である。^[5,6] そこで、エステラーゼ活性が測定された酵素群を対象に、活性で重み付けした配列比較を行った結果、kcatを約60倍、kcat/Kmを約400倍向上させる、15個の置換を第1層および第2層に見い出した。この15個の置換はすべて必須であり、そのうちの1つでも欠けると活性は大きく低下した。

5. 3つの関連する構造変化

HNL1とHNL1-15のX線結晶構造を比較した結果、異なる触媒段階に対応する3種類の構造変化が明らかになった。(1) オキシアニオンホール你再構築により、四面体中間体が安定化する。(2) 基質結合ポケットの構造変化により、エステル基質が求核攻撃を受けやすい向きに配置される。(3) 生成物放出トンネルの形成により、アルコール脱離基の離脱と触媒水の進入が可能となる。これらの構造変化は、置換した残基が基質に直接作用するのではなく、主鎖の位置や柔軟性の変化、および側鎖のサイズや相互作用の変化(その多くは、活性部位から遠く離れた部位におけるもの)に起因する。

6. 多段階酵素触媒反応がアミノ酸残基間の協調作用を生み出す

酵素触媒反応には、基質の結合、化学的な変換、生成物の放出という3つのステップが少なくとも含まれ、多くの場合はさらに多くの段階が存在する。これらはいずれも全体的な反応速度を制限する「律速ステップ」になり得る。仮に、物理的なステップが律速となっている場合は、化学反応を最適化しても全体の反応速度にはほとんど効果を与えない。HNL1-15における15個の置換はすべて、異なるボトルネックを解消するのに協調的に作用しており、すべてのボトルネックが同時に解消されたときにのみ、完全な速度向上が実現する。

7. 酵素工学への示唆

私たちは酵素の触媒能に注目するあまり、化学的ステップのみに焦点を当て、それを支える物理的ステップを無視しがちである。物理的ステップは、基質を正しい向きに整え、活性部位から水を排除し、基質のアクセスと生成物の放出を制御する。これらの物理的ステップに不可欠な残基を無視してきた理由の一つは、アミノ酸配列の保存性に基づくバイオインフォマティクス検索では見つけることが困難なためである。同じ物理的役割を果たすアミノ酸の組み合わせは数多く存在するため、それらの同一性は緩やかな制約を受ける。もう一つの理由は、物理的ステップは触媒反応よりも速いものと誤って想定してしまう点にある。しかし現実には、物理的ステップは反応速度を制限し得るものであり、実際に制限している。そのため、効果的な酵素設計には、単なる化学的な変換だけでなく、基質のアクセス、生成物の放出、および立体構造のダイナミクスといった、触媒サイクル全体を対象とすべきである。

参考文献

1. R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 2656.
2. M. Cygler, P. Grochulski, R. J. Kazlauskas, J. D. Schrag, F. Bouthillier, B. Rubin, A. N. Serreqi, A. K. Gupta, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 3180.
3. A. M. Rauwerdink, R. J. Kazlauskas, *ACS Catal.* **2015**, 5, 6153.
4. T. Devamani, A. M. Rauwerdink, M. Lunzer, B. J. Jones, J. L. Mooney, M. A. O. Tan, Z.-J. Zhang, J.-H. Xu, A. M. Dean, R. J. Kazlauskas, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 1046.
5. C. T. Pierce, P. Tan, L. R. Greenberg, M. E. Walsh, K. Shi, A. H. Nguyen, E. L. Meixner, S. Sarak, H. Aihara, R. L. Evans III, R. J. Kazlauskas, *Acta Crystallogr. Sec. D Struct. Biol.* **2025**, 81, 511.
6. S. Sarak, H. Yang, C. T. Pierce, *et al.* (2026) in preparation.

略歴

1982年 米国マサチューセッツ工科大学(MIT)にて化学の博士号取得

1985年 米国ハーバード大学にて博士研究員として研究に従事

Romas J. Kazlauskasは、ミネソタ大学の生化学・分子生物学・生物物理学の教授である。 α/β -ヒドロラーゼ型スーパーファミリーに属する酵素のタンパク質工学に焦点を当てた研究を行っており、酵素のエナンチオ選択性、祖先酵素の触媒的多機能性、および酵素機能における協調的触媒ネットワークの役割の解明に貢献している。さらに、天野エンザイム株式会社と共催する「The North America-Japan Enzyme Technology Symposium」では、これまでに2度、ミネソタ大学側の主催者を務めている。

1. Enantioselectivity Stems from a Physical Step — Binding

My research group has long studied how the α/β -hydrolase fold achieves selectivity and catalytic efficiency. In the early 1990s, we established an empirical rule predicting which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster with lipases and esterases.^[1] The rule, based on the relative sizes of substituents at the stereocenter, correctly predicted enantioselectivity for the vast majority of substrates across multiple lipases. X-ray crystallography later provided a structural explanation: the alcohol-binding site contains a large and a medium pocket, and the fast-reacting enantiomer places its large substituent in the large pocket.^[2] This work established that the binding of the substrate, a physical step, governs enzyme enantioselectivity.

2. Does Catalytic Promiscuity Also Stem from Physical Steps?

Catalytic promiscuity—the ability of a single enzyme to catalyze mechanistically distinct reactions—is widespread in the α/β -hydrolase family.^[3] For example, some esterases also catalyze C–C bond cleavage, albeit inefficiently. Using ancestral sequence reconstruction, we resurrected enzymes at the evolutionary junction between esterases and hydroxynitrile lyases (HNLs) and found that these ancestors showed enhanced promiscuity.^[4] Because both reaction types use the same catalytic triad (Ser-His-Asp), these results raised a deeper question: what else must change to convert the modest promiscuous esterase activity of a HNL into efficient catalysis? The answer, as presented in this talk, lies in the *cooperative catalytic network*—the full set of residues, both chemical and physical, required for efficient catalysis.

3. Chemically and Physically Essential Residues

Bioinformatic analysis reliably identifies chemically essential residues—those that participate in bond-making and bond-breaking. However, catalysis involves multiple serial steps: substrate binding, chemical transformation, and product release. We propose that efficient catalysis requires a cooperative catalytic network comprising two classes of residues. The chemically essential residues perform the chemistry. The physically essential residues create the conditions under which chemistry can occur: they bury the active site, preorganize catalytic geometry, and control substrate access and product release. Neither class is sufficient alone.

The α/β -hydrolase fold offers an ideal system in which to test this hypothesis. HNLs and esterases share the same fold and catalytic triad (Ser-His-Asp), yet catalyze fundamentally different reactions: C–C bond cleavage with release of HCN versus ester hydrolysis. Because the chemically essential residues—the triad and the oxyanion hole—are already present in both enzyme types, comparing an HNL with an esterase isolates the contribution of the physically essential residues.

4. Converting a HNL into an Esterase

Using an ancestral HNL (HNL1) as starting point, we found that replacing all active-site residues (within 7 Å) with those of a homologous esterase did not improve k_{cat} . Active-site identity alone is not enough.^[5, 6] Using activity-weighted sequence comparison across enzymes with measured esterase activities, we identified 15 first- and second-shell substitutions that increased k_{cat} ~60-fold and k_{cat}/K_M ~400-fold. All 15 substitutions are essential: removing any one substantially reduces activity.

5. Three Coordinated Structural Changes

Comparing the X-ray structures of HNL1 and HNL1-15 revealed three categories of structural change addressing distinct catalytic steps. (1) Restoration of the oxyanion hole stabilizes the tetra-hedral intermediate. (2) Reshaping the substrate-binding pocket correctly orients the ester for nucleophilic attack. (3) Formation of product-release tunnels enables departure of the alcohol leaving group and entry of the catalytic water. These structural changes arise from shifts in main-chain positions and flexibility, as well as changes in side-chain sizes and interactions — many of them far from the active site — rather than from the substitutions themselves acting directly on the substrate.

6. Multi-Step Enzyme Catalysis Creates Cooperativity between Residues

Enzyme catalysis involves a minimum of three steps—substrate binding, chemical transformation, and product release—and often many more. Any one of these steps can be the slow step that limits the overall rate. Optimizing chemistry has little effect on the overall rate when a physical step limits the rate. All 15 substitutions act cooperatively in HNL1-15 to fix different bottlenecks, and the full rate enhancement emerges only when all are relieved simultaneously.

7. Implications for Enzyme Engineering

We admire the catalytic power of enzymes so much that we focus on the chemical step and ignore the supporting steps. Physical steps orient the substrate correctly; they exclude water from the active site, which requires controlling substrate access and product release. One reason we have ignored these physically essential residues is that they are invisible to conservation-based bioinformatic searches — their identity is loosely constrained because many amino acid combinations can fulfill the same physical role. Another reason is that we incorrectly imagine physical steps to be fast, faster than catalysis. In reality, physical steps can and do limit the speed of catalysis. Effective enzyme design must target the full catalytic cycle — substrate access, product egress, and conformational dynamics — not just the chemical transformation.

References

1. R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656.
2. M. Cygler, P. Grochulski, R. J. Kazlauskas, J. D. Schrag, F. Bouthillier, B. Rubin, A. N. Serreqi, A. K. Gupta, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3180.
3. A. M. Rauwerdink, R. J. Kazlauskas, *ACS Catal.* **2015**, *5*, 6153.
4. T. Devamani, A. M. Rauwerdink, M. Lunzer, B. J. Jones, J. L. Mooney, M. A. O. Tan, Z.-J. Zhang, J.-H. Xu, A. M. Dean, R. J. Kazlauskas, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 1046.
5. C. T. Pierce, P. Tan, L. R. Greenberg, M. E. Walsh, K. Shi, A. H. Nguyen, E. L. Meixner, S. Sarak, H. Aihara, R. L. Evans III, R. J. Kazlauskas, *Acta Crystallogr. Sec. D Struct. Biol.* **2025**, *81*, 511.
6. S. Sarak, H. Yang, C. T. Pierce, *et al.* (2026) in preparation.

Brief Biography

1982 PhD Chemistry, Massachusetts Institute of Technology, USA

1985 Postdoctoral studies, Harvard University, USA

Romas J. Kazlauskas is a Professor of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics at the University of Minnesota. His research focuses on protein engineering of enzymes within the α/β -hydrolase fold superfamily, with contributions to understanding enzyme enantioselectivity, catalytic promiscuity of ancestral enzymes, and the role of cooperative catalytic networks in enzyme function. He has twice co-organized the North America–Japan Enzyme Technology Symposium series co-sponsored by Amano Enzyme, Inc.