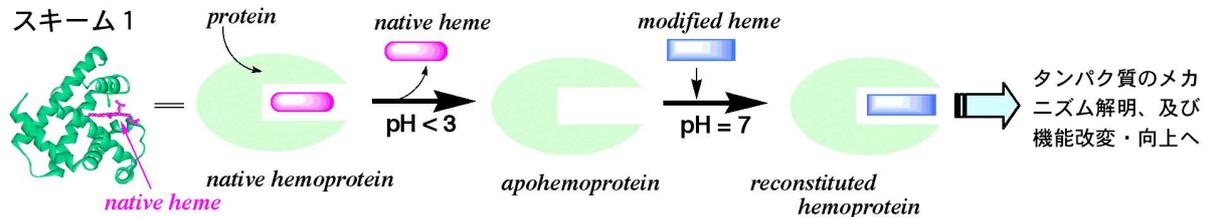


高活性酸化触媒をめざした機能性人工ヘムを有するヘム酵素創製

大阪大学大学院工学研究科 林 高史

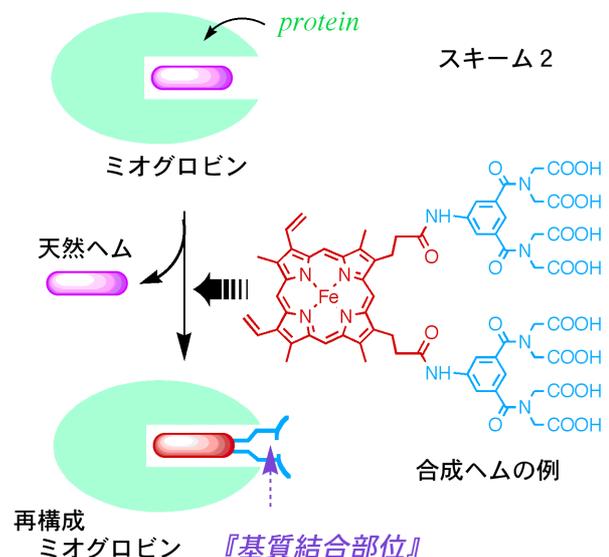
近年、分子生物学、構造生物学の飛躍的な進歩により、複雑な生体分子の挙動が次第に明らかになり、その知見を利用したタンパク質の機能変換が次世代のターゲットの一つとして注目されている。特に、天然のタンパク質のユニークな構造や特性を活かしながら、タンパク質に新しい機能を付与し、斬新な生体触媒材料を開発することは興味深い。例えば生体内に広く分布するヘムタンパク質の場合、活性中心の補欠分子ヘムは、様々な化学反応を触媒する潜在的能力を有しているため、タンパク質の機能改変に対して極めて興味深い素材といえる。

ヘムタンパク質の改変については、ヘムを取り囲む幾つかのアミノ酸の配列に着目し、遺伝子工学的手法を用いた特定の変異体の調製を実施したり、タンパク質表面を修飾する方法を用いて活性の向上をめざす例が幾つかのグループで報告されている。しかしながら、それらの手法のみでは、大胆に機能をコントロールすることは必ずしも容易ではない。そこで、我々は遺伝子工学的手法に頼らず、スキーム1に示す合成化学的手法を用いたヘムタンパク質（化学合成によって得られた人工ヘムを有するタンパク質）の調製と機能解析、機能変換・向上を精力的に実施している。本講演では、これまでに得られた天然のペルオキシダーゼに匹敵するミオグロビンの創製や、ペルオキシダーゼを超える新しい酸化酵素構築の成果を中心に、目的に応じた分子設計に基づく人工ヘムの合成と、それを有するヘムタンパク質の再構成、構造、物性、反応性について報告する。



1. ミオグロビンのペルオキシダーゼ活性向上

ミオグロビンは生体内で酸素分子を保持する役割を果たしているが、その補欠分子であるヘムは様々なヘムペルオキシダーゼ（酸化酵素）のヘムと同一分子である。しかしながら、ミオグロビンのペルオキシダーゼ活性（酸化触媒能）は極めて低い。一方、天然酵素の活性は基質結合部位と反応活性中心の巧みな構造で発現されている。そこで、我々のグループではまずミオグロビンに人工基質結合部位を導入するために、ヘムプロピオン酸側鎖末端に基質結合部位を化学修飾し、ミオグロビンの酸化酵素としての機能を評価した。具体的にはスキーム2に示すように、2つのヘム側鎖プロピオン酸末端にベンゼン環を結合させた修飾ヘムを合成し、ヘムポケット出口に疎水性の



ドメイン，即ち疎水性基質の結合部位を構築する試みを実施した．その結果，過酸化水素存在下においてフェノール誘導体の1電子酸化（ペルオキシダーゼ活性）では天然ミオグロビンの10–30倍の加速が認められた．一方，天然のミオグロビンに比べて10倍程度の活性の上昇では，実用化にはまだ十分とは言えない．そこで次のアプローチとして，上述の修飾ヘムと，活性の向上が期待される変異体 (H64D) を組み合わせたハイブリッドタンパク質の構築に挑戦した．得られた変異体再構成ミオグロビンについて，グアイアコールを基質として過酸化水素存在下での触媒活性を求めたところ天然のミオグロビンに比べ初速度で300倍，触媒効率 k_{cat}/K_m で430倍向上した．これは，天然の西洋わさびペルオキシダーゼにほぼ匹敵する活性となった．さらに，今回開発したハイブリッドタンパク質の生体触媒としての有用性を検証するために，内分泌攪乱物質として問題になっているビスフェノールAの酸化的分解を試みた．その結果，図1に示すように過酸化水素存在下でのハイブリッドタンパク質によるビスフェノールAの分解は，天然のミオグロビンに比べ，40倍以上の速度で進行することが明らかとなった．これは，ハイブリッドミオグロビンにおける人工的に構築した基質結合部位と優れた反応場設計の相乗的な効果と見なされ，ミオグロビンに適切な基質結合部位と反応場を与える手法によって，実用的な生体触媒，即ち人工酵素を創製することが可能であることを実証した．

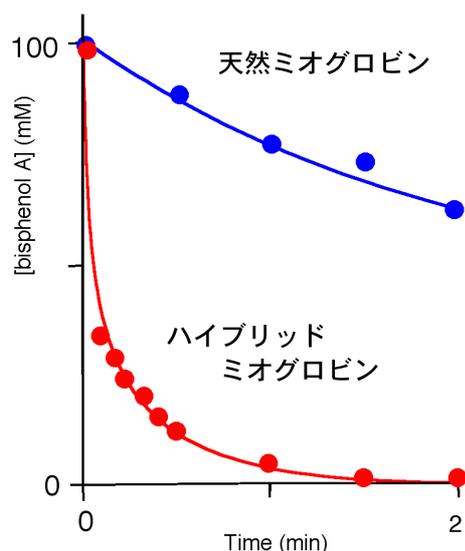


図1. 過酸化水素存在下、ミオグロビンによるビスフェノールAの分解反応追跡

2. 天然を超える高活性酸化酵素の創製

さらなる高酸化触媒活性タンパク質をめざし，我々は天然の西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) の補欠分子ヘムを，より優れた人工ヘムに置換することにより，天然を凌駕する酸化酵素の構築を試みた．具体的には，鉄ポルフィリンの構造異性体である鉄ポルフィセンを補欠分子として有する再構成 HRP の調製を行った．この鉄ポル

フィセンは中心鉄のルイス酸性が高いため，第5配位子のヒスチジンから鉄への配位が天然のヘムの場合に比べて強くなることが予想され，過酸化水素の活性化と O-O 結合の不均一開裂を促すことが期待される．実際に，基質として ABTS の酸化反応を評価したところ，この再構成 HRP は天然の HRP に比べ， k_{cat} で2倍程度の加速が観測され，補欠分子の骨格そのものも，より酸化反応に適した金属錯体に変換することにより，天然を超えた酵素の創製が可能であることが示された．

以上，複合タンパク質の補欠分子を精密な分子設計に基づいた人工金属錯体に置換することにより，新しい酵素活性を有するタンパク質の創製に応用可能である方法論を実証した．

スキーム3

