

研究課題別評価

1. 研究課題名 :蛋白質 フラスコを用いた高効率酵素型触媒

2. 研究者名 :林 高史

ポスドク研究員 :佐藤秀明 (研究期間 平成 13 年 4 月 ~ 平成 15 年 9 月)

ポスドク研究員 :松尾貴史 (研究期間 平成 13 年 4 月 ~ 平成 15 年 3 月)

3. 研究の狙い :

ミオグロビン^①は、天然に広く存在するヘム蛋白質の一つであり、酸素の貯蔵がその生理学的役割である。一方、ミオグロビンの補欠分子であるヘム (ポリフィリン鉄錯体) は、酸素分子を結合するだけでなく酸化反応の触媒としての能力を秘めている。本研究者はこの点に着目し、ミオグロビンに化学的修飾を施すことにより、環境負荷軽減型の新しい生体材料 触媒を開発することを目的とした。具体的には、ミオグロビンへの基質結合部位の構築、活性中心の変換、ヘムポケット (反応場) の改良を試みた。特に、天然ヘムをミオグロビンから除去したアポ蛋白質に対して、修飾した機能化ヘムを挿入することにより、大胆なミオグロビンの機能化を狙った。

4. 研究成果 :

4- 1 ミオグロビンの生体触媒としての開発

(1) 基質認識部位の構築

ミオグロビンは本来酸素貯蔵蛋白質であるため、酵素のような基質認識部位が存在しない。そこで、本研究者はヘム側鎖プロピオン酸を化学修飾することにより、ヘムポケット入り口にユニークな人工基質結合部位を構築した。実際には、得られた再構成ミオグロビンはペルオキシダーゼ、ペルオキシゲナーゼの基質となるフェノール誘導体、チオアニソール、スチレンなどを選択的に捕捉し、過酸化水素存在下でこれらの基質に対して円滑な酸化触媒として作用した。具体的には、触媒効率(kcat/Km)において、天然のミオグロビンに比べ約 20 倍程度の活性の上昇が認められた。

(2) ハイブリッドミオグロビンの開発

さらなる活性向上を図るために、基質結合部位の構築と酸化反応に適した反応場への改良の両方を同時に行ったハイブリッドミオグロビンを構築した。基質結合部位は前述の修飾ヘムを用い、反応場は酸化反応を促進させる目的でミオグロビンの遠位ヒスチジン(His64)をアスパラギン酸(Asp)に変換した変異体を採用し、変異体再構成ミオグロビンを得た。このミオグロビンは、天然のミオグロビンに比べフェノール誘導体への酸化反応の初速度が天然の 430 倍、触媒効率で 300 倍の上昇が認められ、天然のペルオキシダーゼ (酸化酵素) の幾つかの活性を超え、天然において極めて活性の高い西洋ワサビペルオキシダーゼとほぼ同格の触媒効率まで到達した。さらに実用化を目指す目的で、環境ホルモンの一つと考えられているビスフェノール A の分解を実施した結果、このハイブリッドミオグロビンが極めて効率よく酸化分解を促す触媒であることが明らかとなった。特にこのハイブリッドミオグロビンは、Km 値が極めて小さい (優れている) ため、水中の超微量の毒物を円滑に分解できる長所を有していることが証明された。

(3) 酸素分子の活性化をともなう酸化触媒の開発

上記の触媒的酸化反応は天然のペルオキシダーゼと同様に過酸化水素を酸素源として反応を実施した。しかし天然にはシトクロム P450 のように、酸素分子を酸素源として酸素を還元的に活性化しながら基質の酸化反応を触媒する酵素が存在する。ミオグロビンも P450 と同じ補欠分子ヘムを有するが、ミオグロビンは酸素分子を活性化する機構 (電子授受のしくみ) が存在しない。そこで、本研究者はミオグロビンに P450 活性を発現させるために (酸素分子を利用するために)、ヘムプロピオン酸末端にフラビンを結合させたフラボヘムを合成し、アポミオグロビンに挿入したフラボミオグロビンを構築した。この再構成蛋白質の反応性を評価した結果、NADH 存在下、P450 と同様に酸素分子の還元的活性化が進行することが認められ、P450 反応の一つであるアルデヒドのデホルミレ化がフラボミオグロビンによって触媒的に起こることを示した。ミオグロビンによる酸素分子の還元的活性化はこれが初めての例である。

4-2 ミオグロビンの機能向上

ミオグロビンの本来の機能である酸素貯蔵の向上については、酸素分子の親和性をいかに上昇させるか、自動酸化をいかに抑制するか、及び一酸化炭素に対して酸素分子の選択的結合をいかに制御するか、などがポイントである。この研究課題については、これまで多くの生化学者がヘムポケットの変異を実施して試みてきたが、顕著な成果は得られていない。そこで、本研究者はこれまでのアプローチとは対照的にヘムそのものを非天然のものに置換する手法を用いて大胆な機能向上を獲得した。具体的には天然ヘムの代わりにヘムの構造異性体であるボルフィセン鉄錯体を導入することにより、得られた再構成ミオグロビンは天然ミオグロビンに比べて、酸素親和性が 2600 倍上昇し、自動酸化は 1/7 に抑制した。さらに酸素と一酸化炭素との選択性は、天然の蛋白質が 1:30 程度であるが、ボルフィセン鉄錯体を有する再構成ミオグロビンは 8:1 と選択性が逆転する極めて有意義な結果が得られた。今後、ボルフィセン鉄を有するミオグロビンにおいて、超好感度センサーへの展開が大いに期待できる。

5. 自己評価：

(1) 研究計画、内容、結果に対する評価

研究を開始する時点での目標は、単純な酸素保持蛋白質であるミオグロビンに化学的な摂動を加えて有用な触媒を開発することにあった。初期段階では、ヘム側鎖プロピオン酸末端に化学修飾を施すことにより、十数倍程度の活性の向上が見られたが、最終的にはヘムポケットの改良も加えたハイブリッドミオグロビンにより、400倍以上の活性を獲得し、天然の酸化酵素 (ペルオキシダーゼ) に匹敵する機能を有するまでになった。また水中に存在する微量のビスフェノール A などの環境ホルモンを分解する能力も備えており、当初の目的は達せられたと考えている。さらに、計画当初では予定していなかった酸素分子の活性化やミオグロビンそのものの機能の飛躍的向上も同様な蛋白質への改造手法を用いて、期間内に実現することができた。以上、ヘム蛋白質において、ヘムの再構成法が大胆な機能化に極めて有効であることを提唱した点で有意義であった。今後、これまでの知見をもとにさらなる応用・実用を目指した研究を取り組みたい。

(2) ポスドク参加型のシステムについて

本研究を通じて、極めて優秀な2名のポスドク (グループメンバー) を得ることができ、上記の研究成果は彼らの貢献が極めて大きいと言える。特にポスドクを選考するにあたり、意識的に本研究者とは異なる分野 (生化学と物理化学) から人材を選んだ。その結果、本研究者の専門分野と

円滑に融合し、研究が予想以上に幅広く展開した。従来の本研究者の専門分野である錯体化学や触媒化学、有機化学にとどまらず、研究範囲がタンパク質の発現から高度な分光学的解析までカバーすることが可能となり、極めて有意義な発展をとげた点で、このポスドク参加型システムは最大限に活用出来たと考えている。

6. 研究総括の見解：

本課題は天然のタンパク質であるミオグロビンを化学修飾することで性能向上、あるいは新しい機能を持たせる試みで、単なる修飾にとどまらずヘムポケットを反応場として改変する構想が新しい可能性を示すものとして採用された。

当初の修飾程度の改変でも酵素機能の大幅な向上が達成されたが、更にヘム自体を改変することで機能の向上、あるいは新しい選択制など興味ある結果を得ている。成果は十分とみられるが、今後実際の応用を考えるには、ターゲットを絞り活性、選択性、安定性、安全性などを総合的に追求する必要がある。可能性と実用性には大きなひらきがあることを忘れず、今後の発展を追求することを期待する。

7. 主な論文等：

主な論文

1. Hybridization of Modified-Heme Reconstitution and Distal Histidine Mutation to Functionalize Sperm Whale Myoglobin, H. Sato, T. Hayashi, T. Ando, Y. Hisaeda, T. Ueno, Y. Watanabe, J. Am. Chem. Soc. in press.
2. Synthesis, Characterization and Autoxidation of a Highly Electron-Deficient Porphycenatoiron(III) with Trifluoromethyl Substituents, T. Hayashi, Y. Nakashima, K. Ito, T. Ikegami, I. Aritome, K. Aoyagi, T. Ando, Y. Hisaeda Inorg. Chem. 2003, 42, 7345-7347.
3. Enhancement of Peroxygenase Activity of Horse Heart Myoglobin by Modification of Heme-propionate Side Chains, T. Hayashi, T. Matsuda, Y. Hisaeda, Chem. Lett. 2003, 32, 296-297.
4. Reductive Activation of Dioxygen by a Myoglobin Reconstituted with a Flavohemin, T. Matsuo, Takashi Hayashi, Yoshio Hisaeda, J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 11234-11235.
5. Blue Myoglobin Reconstituted with an Iron Porphycene Shows Extremely High Oxygen Affinity T. Hayashi, H. Dejima, T. Matsuo, H. Sato, D. Murata, Y. Hisaeda, J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 11226-11227.
6. New Functionalization of Myoglobin by Chemical Modification of Heme-Propionates T. Hayashi, Y. Hisaeda Acc. Chem. Res. 2002, 35, 43-44.

招待講演 (国際会議)

1. The 26th ISMC Satellite-Symposium "Dreaming Supramolecular Chemistry for New Millennium", Hiroshima, July, 2001. "Supramolecular Composite via Protein-Protein Recognition. Architecture of Artificial Binding Domain on the Protein Surface"
2. 10th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC-10), Florence, Italy,

August, 2001. "Functionalization of Hemoproteins by Heme-Propionates Modification"

3. 2nd International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-2), Kyoto, June, 2002. "Functionalized Hemoproteins Reconstituted with Artificially Created Iron Porphyrin Derivatives"
4. 11th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC-11), Cairns, Australia, July, 2003. "Role of Heme-Propionate Side Chains in Myoglobin Function"
5. Singapore International Chemical Conference III: Frontiers in Physical and Analytical Chemistry (SICC-3), Singapore, December, 2003. "Functionalization of Myoglobin by Chemical Modification"
6. 3rd International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-3), New Orleans, USA, July, 2004. "Modification of Hemoproteins by Reconstitutive Methods"

ほか 2 件

招待講演 (国内)

9 件

口頭発表：国際 10 件 / 国内 33 件

特許

1. 半人工ヘムタンパク質から成る酸素センサー, 林 高史・松尾貴史・久枝良雄・出島裕久, 出願日 2002 年 5 月 22 日 出願番号 特願 2002-147344
2. ポルフィセン金属錯体, 林 高史・久枝良雄・出島裕久, 出願日 2001 年 8 月 10 日 出願番号 特願 2001-243968

受賞

1. 日本化学会生体機能関連化学部会講演賞 (2001 年 9 月)