

## 生体触媒：

## 「ヘムタンパク質の機能改変 - 天然の酵素を超える生体触媒をめざして」



特集

大阪大学 大学院工学研究科 応用化学専攻  
教授 林 高史

## ●はじめに

酵素とは生体内の触媒です。加水分解や酸化還元など、酵素はいろんなことをします。特徴的なのは室温で加圧しないで、ほとんどは中性（水中）で、しかも基質の濃度希薄で反応が進む。非常に選択性が高いというのが、酵素の触媒としての長所だと思います。皆さんの体内、動物や植物の体の中で起きている1個1個の有機反応を示した代謝マップをみると、この中に1,000 くらいの有機反応のスキームがあり、これらのスキームの殆どは酵素が関与しています。酵素の特徴ですが、基質と酵素は鍵と鍵穴の関係にあります。鍵ですから、ある酵素に対して特異的なものだけが入る。鍵を回すと化学反応が起こる。もう1つの特徴として、例えばペプチドタンパク質、アミド結合があります。フラスコの中でタンパク質やアミド結合のあるものをくると回しても、基本的に何も起こりません。なぜかと言えば、アミド結合は非常に強いからです。もしもアミド結合が水の中で分解するのなら、我々の体はプールに入った瞬間に、ぼろぼろに溶けてしまいます。そうでないということは、アミド結合が強いということです。皆さんは肉や魚を食べて、体の中でどんどんアミド結合を切っている。酵素がアミド結合を瞬時に切っているところにトリックがあるわけです。

タンパク質や酵素は20世紀初頭からどんどん見つかってきています。この頃は生物屋さんの領域でしたが、20世紀後半から構造生物学や分子生物学の分野ができて、21世紀初めにかけてタンパク質の構造やメカニズムが分かってきました。今後、タンパク質工学や創薬への応用が次の段階だと私は考えています。この中で我々化学の人間が、いかにしてタンパク質を使っていいものを作るか、利用するかが大事な課題の1つではないかと考え、私はタンパク質化学者としてタンパク質や酵素を意識しています。今までのタンパク質工学や酵素化学は、新しいことを見つける、あるいはそれを調べるという解析的な仕事を中心でした。それは今でも大事なこと

ですが、様々な構造が分かってきた中で、これからそれを真似てモデルを作る、あるいは新しい生体金属を作り、使うことが必要ではないのか考えています。

この中で本日は、金属酵素を含んだタンパク質について話をさせていただきます。金属酵素は、金属イオンや金属錯体をタンパク質の中に含んだものを言います。全体の酵素の約30%は、金属が基質であって、その金属が働いて初めて酵素が動いているそうです。周期律表の中でピンク色に塗りつぶした金属が、体の中でタンパク質がこれらの金属を含んで酵素として機能しています。特徴的なのは鉄やニッケルなどで、この辺りのいちばんシンプルな遷移金属を使っています。元素戦略という言葉が使われていますが、できるだけ安価な手に入りやすい金属で反応するという意味で、酵素を学ぶのは非常に大事なこともかもしれません。

具体的に金属酵素にはどんなものがあるのか。代表的なものとして2つを示します。まずP-450という酵素です。これはヘムという補欠分子で、真ん中に鉄が入っています。皆さんの血液の中にもたくさんあります。例えばベンゼンをフェノールに換える。有機化学を勉強された方にはよく分かると思いますが、ベンゼンをフェノールに換えるのは大変なこと



講師 林 高史 氏

で、強アルカリ 200 度で初めて変わる。体内で強アルカリ 200 度という条件はとても無理ですが、肝臓が元気であればフェノールに簡単に換えられる。それが金属酵素のなせる業です。メタンをメタノールに換える。メタンは不活性な化合物ですが、生物は酵素によって簡単に換えられます。こうしたことを学ぶことによって、我々は新しい触媒開発の糸口をつかむことができるかもしれません。もう1つ、窒素をアンモニアに換える。それもマメ科の植物の根っ子では、室温でさっと窒素をアンモニアに換えることをやっています。

昔と違って、今は分子式、化学の力でほとんどのことを解き明かすことができるようになりました。我々の体はほとんどが有機物でできているから、まさに有機化学の領域です。化学者として、まずは生体分子を正しく理解するところから始まりますが、金属酵素の次の目標は天然に似たものをまず作り、天然を超えたものを作り、さらには天然と違った有用なものを作る。私はそれを目標に研究を進めております。

#### ●ヘムタンパク質の化学改変

本日はヘムタンパク質の改善ということで、話をさせていただきます。例えば筋肉の中にある赤いタンパク質、ミオグロビンですが、そこにヘム（鉄ポルフィリン）が刺さっています。鉄ポルフィリンは化学的には酸化還元能力があり、触媒反応などもできる。ヘムタンパク質はいろんな機能を潜在的に持っていると考えてよいと思います。実際には、いろんな機能を持ったヘムタンパク質が存在していますが、反応中心は全て同じ鉄ポルフィリンで出来ていることがポイントです。ヘムタンパク質を解析するのも大事ですが、工学的に改変するには化学的な手法を使って変換させます。まずは表面を化学修飾する。これは有機化学にとって簡単なことです。遺伝



子工学を使って、アミノ酸に換えることも簡単にできるようになっています。ヘムという補欠分子、鉄ポルフィリンについては外すことができます。なぜかと言えば、共有結合で付いていません。配位結合と疎水性相互作用でヘムがヘムポケット内に結合していますので、これを外して別のものに入れ替えることもできます。

図1はパックマンの漫画風に描いたミオグロビンですが、ここにヘム（ピンク色）というものが入っています。これを酸性の溶液の中に入れると簡単に外すことができ、空っぽになったタンパク質ができます。これをアポタンパク質と呼びます。そこに似た構造のものを加えると再構成されたヘムタンパク質、例えばミオグロビンができます。この方法を使うと、最初の天然系とは違いますが、これを比較することによって、様々な天然のことが分かりますし、天然のヘムよりもっといいものを入れたら、もっと機能的なタンパク質ができるだろうと考えています。天然のヘム骨格に対していろんな官能基を付けてポルフィリンそのものを換えてみたりして、これまでに様々なタンパク質を作ることができました。

#### ●天然の活性を超えるヘムタンパク質の創製 (その1): 基質結合部位導入

過酸化水素依存酵素であるヘムペルオキシダーゼ



図1. ヘムタンパク質におけるヘム置換のスキーム

の触媒サイクルを図2に示します。酸素貯蔵タンパク質であるミオグロビン、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) と同じ構造のヘムを補欠分子として有し、同様の反応と活性中間体 (Compound I & II) を経由することが知られていますが、本来の機能ではないため、過酸化水素存在下でのペルオキシダーゼ活性は極めて低い。その理由の1つは、ミオグロビンは天然の酵素のように基質結合部位を有していないことに起因する。

そこで、我々は、ヘムポケットに疎水性の基質を誘導するために、タンパク質表面に露出している二本のヘムプロピオン酸側鎖末端にベンゼン環を導入した修飾ヘムを合成し、ミオグロビンの天然ヘムと置換しました (図3)。その結果、フェノール誘導体の基質がヘムポケットに結合することを電子スペクトルから確認し、過酸化水素を効率よく活性化するミオグロビン変異体 (H64D) と修飾ヘムを組み合わせることにより、酵素効率 ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) は、天然のミオグロビンの1600倍となり、HRPの酵素活性に匹敵しました。

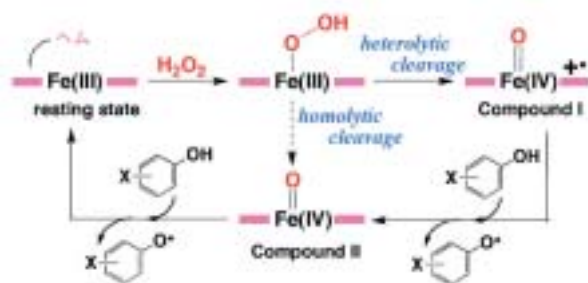


図2. ペルオキシダーゼの触媒サイクル

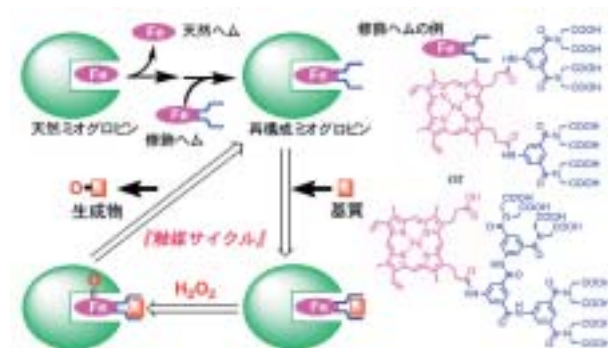


図3. ヘムプロピオン酸側鎖末端に基質結合部位を有したミオグロビンの調製と触媒反応への応用

一方、酸素添加酵素であるモノオキシゲナーゼチトクロムP450もミオグロビンと同じヘム補欠分子

を有していますが、ミオグロビンにはP450のように、酸素を還元的に活性化する仕組み (含フラビン還元酵素との結合部位) を持ち合わせていません。そこで、我々は、ヘムプロピオン酸側鎖の片方に電子メディエーターであるフラビンを修飾したフラボミオグロビンを作製し (図4) 外部からスムーズに電子が流れ込む経路を構築し、P450が触媒するデホルミル化反応を追跡しました。その結果、得られたフラボミオグロビンもP450と同様にNADHの添加によって、酸素の還元的活性化を伴った酸化反応を触媒することが明らかになりました。

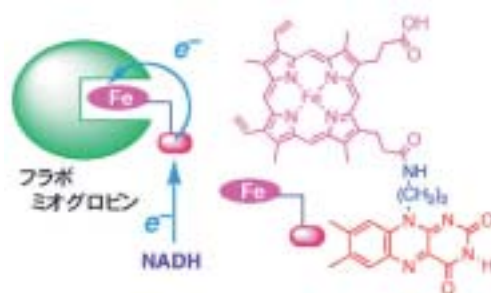


図4. フラボヘムの構造と、フラボミオグロビンの模式図

#### ●天然の活性を超えるヘムタンパク質の創製 (その2): ヘム骨格変換

天然の酵素を超えるタンパク質を創製する目的から、我々は次に、ヘムのポルフィリン骨格を非天然の環状テトラピロール骨格に置換した鉄錯体を検討し、まずヘムの異性体であるポルフィリン鉄錯体を選択しました (図5)。最初に、ポルフィセン鉄錯体を有する再構成ミオグロビンのペルオキシダーゼ活性を測定したところ、グアイアコールの酸化、チオアニソールの酸素化、スチレンのエポキシ化のいずれも、低活性の天然ミオグロビンに比べ10 - 20倍の反応加速が見られました。

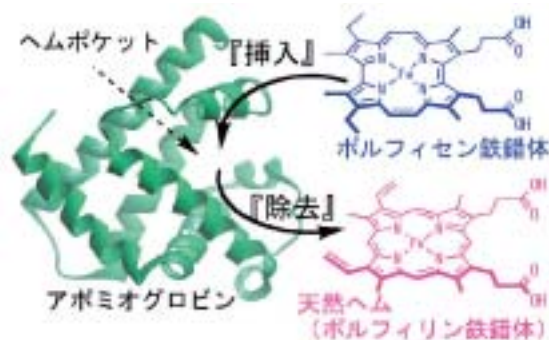


図5. アポミオグロビンへのポルフィセン鉄錯体の挿入

そこで、前述の過酸化水素依存酸化酵素として有名な西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) のアポ体に、このポルフィセン鉄錯体を挿入した再構成タンパク質を調製しました。得られたタンパク質の活性を評価するために、チオアニソールの酸素化を追跡したところ、天然の HRP に比べて、再構成体は 12 倍以上の加速効果を与えることが明らかになりました (図 6)。

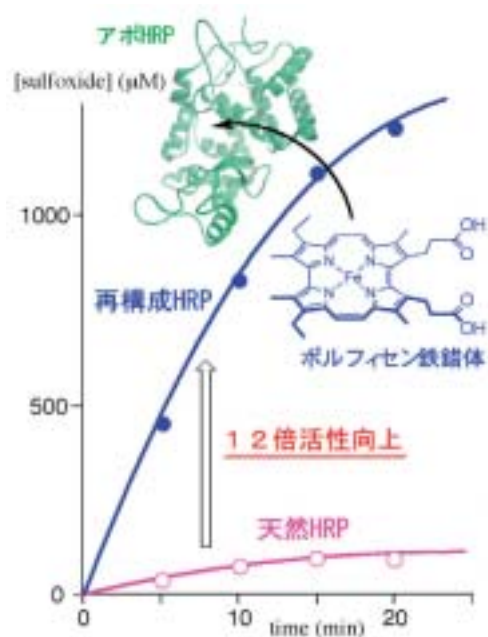


図 6 . HRP を触媒とする過酸化水素存在下でのチオアニソールの酸素化反応追跡 (pH = 7.0 at 20 °C)

また、再構成 HRP と過酸化水素の反応における中間体をストップフロー法による UV-vis 及び EPR 測定で追跡したところ、鉄四価オキソポルフィセン  $\pi$  カチオンラジカルの高酸化種を初めて観測することに成功し、その中間体の酸化活性が天然ヘムの同等活性種 (Compound I) の活性に比べて高いことを検証しました。

一方、我々は、ポルフィリンの類縁体であるコロールの鉄錯体もヘムタンパク質の補欠分子として興味深いことを示しました (図 7)。例えば、本来極めて低いミオグロビンのペルオキシダーゼ活性を、



図 7 . コロール鉄錯体のアポミオグロビンへの挿入

コロール鉄錯体への置換により 200 倍も上昇させ、一般のペルオキシダーゼと同等の活性を獲得しました。

以上、適した補欠分子を設計・合成してヘムタンパク質に導入することにより、天然を凌駕する高活性のタンパク質が獲得可能であることを実証しました。

#### 質疑応答

<問> 天然のヘムと比べて、先生の入替える方法を使うと活性が上がるとのことですが、天然が、現在のヘムの構造を維持していることには、何かの理由があつてのことなのでしょうか。

(答) これは進化と関わってくる問題です。非天然の本で紹介したようなものを作る酵素が体内になく、進化の過程でそのようにならなかったのではないのでしょうか。でも 1 億年後には、ヘムは変わっているかもしれません。例えば突然変異が起きて、もっといいヘムでないものができるかもしれません。もしかしたら過渡的かもしれません。

