

# ヘムタンパク質の高機能向上・改変

—有機合成を駆使したタンパク質工学—



研究ノート

林 高 史\*

Improvement and/or Conversion of Hemoprotein Functions  
—Protein Engineering by Organic Synthetic Strategy—

Key Words : Hemoprotein, Myoglobin, Heme, Oxygen Binding, Peroxidase

## 1. はじめに

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、その情報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、斬新な生体材料を開発することは興味深い。このような課題に対して、分子レベルで物質をデザイン・合成・制御できる我々化学者は、タンパク質などの生体分子においても、化学の立場から様々な創意工夫を施すことが可能である。

## 2. ヘムタンパク質再構成手法

ヘムタンパク質は、広く生体内に分布し、電子移動、触媒、酸素保持・運搬、センサー等の様々な機能を発揮する生体分子として知られている。その構造的な特徴は、補欠分子としてヘム(プロトポルフィリン-IX鉄錯体(1))を有することにある。この魅力的なヘムタンパク質については、様々な角度から研究がなされ、得られた知見をもとにヘムタンパク質の

機能を制御する試みも実施されているが、その大半は遺伝子工学的手法を用いて特定のアミノ酸を変換した変異体による機能評価である。しかしながらこのような手法ではタンパク質の改変は限定されたものであり、大胆な機能変換には結びつきにくいことが多い。一方、補欠分子であるヘムは通常、タンパク質マトリクスと非共有結合相互作用を介して安定化しているため、天然のヘム1を除去して非天然の機能化金属錯体を挿入することが可能である。この点に着目し、非天然補欠分子を目的に応じた的確に分子設計を施すことによって、ヘムタンパク質は有用な生体材料へと大きく生まれ変わると考えられる。我々のグループでは、これまで酸素保持・貯蔵の働

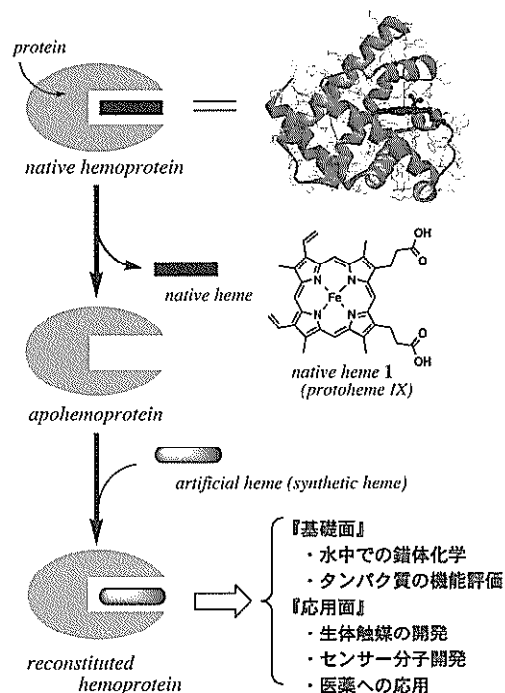


図1 機能性再構成ヘムタンパク質の調製



\*Takashi HAYASHI  
1962年9月生  
1990年京都大学・大学院工学研究科博士  
後期課程・合成化学専攻修了  
現在、大阪大学・工学研究科・応用化学  
専攻、教授、工学博士、有機化学、錯体  
化学、生化学  
TEL 06-6879-7928  
FAX 06-6879-7928  
E-mail: thayashi@chem.eng.  
osaka-u.ac.jp

きを行うミオグロビンに対して、活性中心のヘムを有機合成で得た様々な補欠分子と置換し、従来の遺伝子工学的手法にとられない斬新な再構成手法から機能改変・機能向上をめざしている(スキーム1参照)<sup>1)</sup>。ここでは、紙面の都合上、次の2例についてのみ紹介したい。

### 3. スーパーミオグロビンをめざして

ヘム骨格を非天然のものに変換し、錯体化学的見地からタンパク質の機能変換や機能向上を試みる手法が考えられる。そこで、ミオグロビンの酸素親和性向上が期待される対称性の低いヘム異性体としてポルフィセン鉄錯体2(図2参照)を補欠分子としてデザインし合成を実施した。得られたポルフィセン鉄錯体2は、常法の再構成手法によって、アポミオグロビンに挿入し、再構成タンパク質rMb(2)を調製した。ミオグロビンをはじめとする天然のヘムタンパク質は通常メト体(Fe(III))では褐色であるが、rMb(2)は2本来の色を反映して鮮やかなライトブルー色を呈し、ESR測定から低スピン状態であることが明らかとなった。得られたメト体のrMb(2)は天然のミオグロビンと同様に、ジチオナイトの添加により、デオキシミオグロビンに還元された。さらにこのデオキシ体の溶液に酸素分子、一酸化炭素をそれぞれ吹き込むと酸素錯体、一酸化炭素錯体が可逆的に形成された<sup>2)</sup>。この知見をもとに、酸素分子の結合速度定数を算出した。表1に示すように、天然のミオグロビン(native Mb(1))に比べ再構成ミオグロビンrMb(2)は酸素分子の結合速度定数は5.4倍上昇し、一方、解離速度定数は490分の1に減少している。それぞれのパラメータの比から、rMb(2)の酸素分子結合定数は $K_a = 1.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ となり、天然のミオグロビンに比べて酸素親和性が2600倍向上したことが示された。特にこの主たる要因は酸素分子の解離速度の減少、即ち酸素錯体の安定性によるものである<sup>3)</sup>。

さらに、一酸化炭素の結合についても検討した結果、rMb(2)は天然のミオグロビンに比べてさほど親和性の向上は認められなかった。表1に酸素分子と一酸化炭素の親和性の比較を $M'$ 値で表記した。一般にポルフィリン鉄錯体は、酸素分子よりも一酸化炭素との親和性の方が圧倒的に大きい。天然のミオグロビンでも一酸化炭素との親和性の方が酸素分子よりも20倍程度大きい。一方、ポルフィセン鉄錯体を

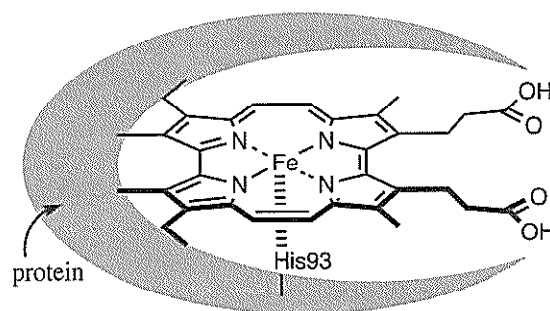


図2 鉄ポルフィセン(2)を人工補欠分子に有する再構成ミオグロビンrMb(2)。

表1. ミオグロビンの酸素分子結合能評価(25 °C, pH 7.0)

Myoglobin	$k_{on} (\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$k_{off} (\text{s}^{-1})$	$k_{cat} (\text{h}^{-1})$	$K_{O_2} (\text{M}^{-1})$	$M' (=K_{CO}/K_{O_2})$
native Mb(1)	17	28	0.10	$6.1 \times 10^5$	13
rMb(2)	91	0.057	0.024	$1.6 \times 10^9$	0.10

有するミオグロビンrMb(2)では、本来のヘムタンパク質とは逆に酸素分子が10倍程度選択的に結合する極めて興味深い結果を得た。酸素分子と結合することにより、青から緑に変色することから、応用としては、超高感度(ppbの酸素濃度まで計測可能)な酸素センサー、酸素保持剤、酸素除去剤が考えられる。その他、別途、同様の手法を用いて代替血液をめざす目的で、ヘム末端に疎水性クラスターを導入したミオグロビンの酸素保持機能向上も試みている<sup>4)</sup>。

### 4. 機能的な新しい生体触媒を求めて

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部位の巧みな構造で発現されている。そこで、以前我々は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。具体的には図3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3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

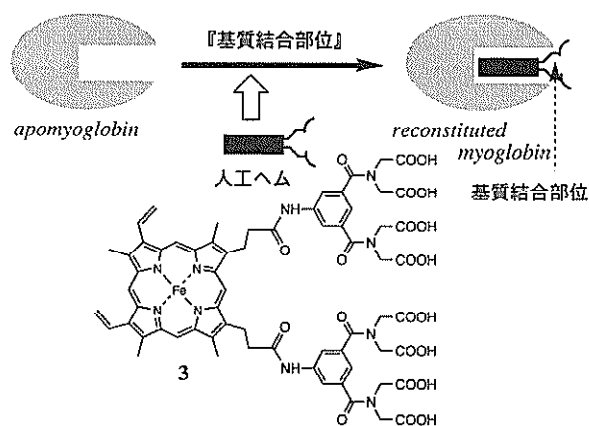


図3 基質結合部位を有する再構成ミオグロビンの構築

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倍の加速が観測された<sup>5)</sup>。しかしながら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3と活性の向上が期待されるミオグロビン変異体(H64D)を組み合わせたハイブリッドタンパク質rMb(H64D・3)の構築を行った。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(2-methoxyphenol)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、天然のシトクロムcオキシダーゼに比較しても約100倍程度優れており、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<sup>6)</sup>。さらに  $K_m$  値に着目すると、rMb(H64D・

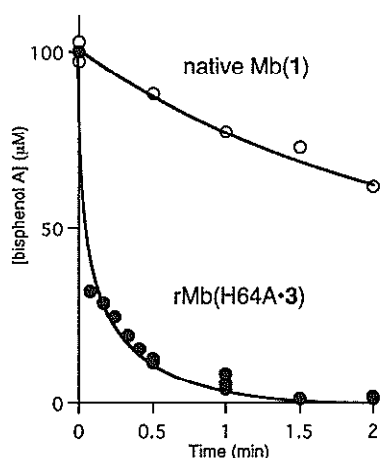


図4 過酸化水素存在下、ミオグロビンによるビスフェノールAの分解反応追跡

3)は非常に大きく減少しており、水中に極めて微量に存在する基質とも円滑に反応することを示唆している。

さらに、今回開発したハイブリッドタンパク質rMb(H64D・3)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指摘されているビスフェノールAの酸化的分解を試みた。図4に示すように、過酸化水素存在下でのビスフェノールAの分解は、天然のミオグロビン(native Mb(1))に比べrMb(H64D・3)を触媒として用いることによって、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る。以上、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。

## 5. 結 言

本研究を通じて得られた成果は、従来の遺伝子工学的手法に基づくアミノ酸の変換ではなく、合成化学的にヘムの修飾・変換を行い、タンパク質の機能化を可能とした点に特徴がある。またここでは紹介しなかったが、天然のヘムよりタフな補欠分子を有する優れたタンパク質、通常のヘムタンパク質には見られない新しい反応を行うタンパク質の創成などにも挑戦している。以上、有機・錯体化学を駆使することにより、物質変換、分解、センサー、医薬に結びつく有用な生体材料の開発への可能性が期待される。また今後は、ヘムタンパク質のみならず、様々な魅力的な生体分子をターゲットとした材料開発、または生体関連分子を巧みに操った機能性分子の構築を主眼においた研究を推進したい。このような研究を通じて、有機化学者の立場から物質変換、分解、センサー、医薬に結びつく有用な生体材料の開発をめざしたい。

最後に本研究を通じてお世話になった共同研究者の皆様、及び日夜研究に励んでくれた博士研究員、学生諸君に感謝したい。また、平成17年4月より、阪大で新しい研究室を立ち上げる機会を与えていただいたことを契機に、阪大そして関西の方々との新しい交流、情報交換を通じて、研究の幅を広げる所存である。

- 1) T.Hayashi, Y.Hisaeda, *Acc. Chem. Res.* 2002, 35, 35-43.
- 2) T. Hayashi, H. Dejima, T. Matsuo, H. Sato, Y.Hisaeda, *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 11226-11227.
- 3) T.Matsuo, H.Dejima, S.Hirota, D.Murata, H.Sato, T.Ikegami, H.Hori, Y.Hisaeda, T.Hayashi, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 16007-16017.
- 4) H. Sato, M. Watanabe, Y. Hisaeda, T. Hayashi, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 56-57.
- 5) T. Hayashi, Y. Hitomi, T. Ando, T. Mizutani, Y. Hisaeda, S. Kitagawa, H. Ogoshi, *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 7747-7750.
- 6) H. Sato, T. Hayashi, T. Ando, Y. Hisaeda, T. Ueno, Y. Watanabe, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 436-437.

この記事をお読みにになり、著者の研究室の訪問見学をご希望の方は、当協会事務局へご連絡ください。

事務局で著者と日程を調整して、お知らせいたします。

申し込み期限：本誌発行から2ヵ月後の月末日

申し込み先：生産技術振興協会 tel 06-6944-0604 E-mail [seisan@maple.ocn.ne.jp](mailto:seisan@maple.ocn.ne.jp)

必要事項：お名前、ご所属、希望日時(選択の幅をもたせてください)、複数人の場合はそれぞれのお名前、ご所属、代表者の連絡先

著者の都合でご希望に添えない場合もありますので、予めご了承ください。