

化学修飾を施した人工金属酵素の調製と反応性・立体選択性の評価

○久保裕暉・松本隆聖・森田能次・藤枝伸宇（大阪公大院農）

Preparation of chemically modified artificial metalloenzymes and evaluation of their reactivity and stereoselectivity (Graduate School of Agricultural Sciences, Osaka Metropolitan University) HIROKI, Kubo; RYUSEI, Matsumoto; YOSHITSUGU, Morita; NOBUTAKA, Fujieda

近年、人工金属酵素は自然界に見られない化学反応を触媒することから注目を集めている。これまでに我々は、超好熱菌由来の金属結合タンパク質 TM1459 のアミノ酸に直接遷移金属イオンを配位させた人工金属酵素を構築してきた^{1,2}。TM1459 は 4 つのヒスチジンからなる金属結合サイトを有しており、1 つのヒスチジン残基を Ala に置換した 3-His モチーフの変異体は、立体分岐型マイケル付加反応を触媒する¹。本研究では、3-His モチーフ変異体の活性中心近傍のアミノ酸をピリジル基で化学修飾した人工金属酵素を調製し、修飾位置とマイケル付加反応の立体選択性の関係を明らかにした。

TM1459 の C106 を Asp に、また活性中心近傍の異なるアミノ酸を Cys に置換した変異体を設計した。大腸菌 BL21 (DE3) 株を宿主とする発現系を用いて、変異体を調製した。次に、タンパク質に対して 5 当量の化学修飾剤を添加し、1 時間反応させ、ゲル濾過クロマトグラフィーにより未反応の化学修飾剤を除去した。モデル反応として、2-アザカルコンをアクセプター、ニトロメタンをドナーとするマイケル付加反応を選択した (Fig. 1)。タンパク質溶液に硫酸銅、基質を添加し、20°C、3 時間反応させ、HPLC 分析により収率および立体選択性を算出した。

H52A/C106D の収率は 69 %、S 体のエナンチオ過剰率は 88 %であった。構築した修飾体をライブラリーとしてスクリーニングしたところ、I49C/H52A/C106D 変異体において収率は 15 %、S 体のエナンチオ過剰率は 36 %に低下した。一方、4,4'-Dithiodipyridine (4-PDS) を化学修飾すると収率が 51 %まで向上し、立体選択性が S 体から R 体に変化する上、エナンチオ過剰率が 71 %に向上することが明らかとなった。

次に、49 番目の位置のアミノ酸の立体障害と立体選択性の関係を詳細に調べた。側鎖の体積が異なる疎水性アミノ酸 (Ala, Phe) に置換した変異体を調製した。また、Cys と特異的に反応する N-ethylmaleimide (NEM)、2-PDS を用いてそれぞれ化学修飾を行ったものを調製した。調製した変異体・修飾体を用いて反応を行った結果、49 番目のアミノ酸の側鎖の体積が大きいほど R 体の生成量が増加する傾向が見られた。特に I49C/H52A/C106D 変異体に 4-PDS を添加した修飾体では R 体の生成量が最も大きくなった。これは化学修飾により立体障害が増加することに加えて、ピリジル基の窒素原子が銅に配位しピリジル基が固定され、基質がポケットに入る方向がより効果的に制限されることで、R 体の立体選択性が向上したと考えられる。

[引用文献]

1. Fujieda, N.; Itoh, S., *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **59**, 7717 (2020).
2. Fujieda, N., *et al.*, *Chem. Sci.*, **14**, 3932 (2023).

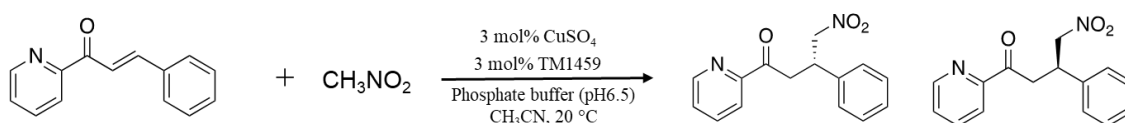


Fig 1. Michael addition reaction as a model reaction