

PEG を結合した人工金属酵素の合成と反応性評価

(阪府大生命¹・大阪公大院農²) ○岩渕祥吾¹・松本隆聖²・森田能次²・藤枝伸宇²
 Synthesis and reactivity evaluation of PEGylated artificial metalloenzymes (¹*Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University*, ²*Graduate School of Agriculture, Osaka Metropolitan University*) ○ Shogo Iwabuchi,¹ Ryusei Matsumoto,² Yoshitsugu Morita,² Nobutaka Fujieda²

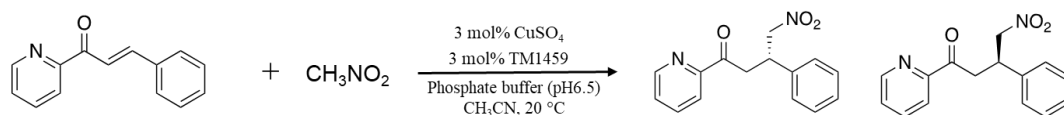
Artificial metalloenzymes are bio-hybrid catalysts that combine proteins and metal complexes.¹⁾ We have developed an artificial metalloenzyme using TM1459, a protein from hyperthermophiles.²⁾ On the other hand, modification of a protein with polyethylene glycol (PEG) stabilized the protein structure but reduced the activity.³⁾ In this study, we report preparation of artificial metalloenzymes with PEG site-specifically bound near the interface of the dimer or at a highly fluctuating position of TM1459 and reactivity in a stereoselective Michael addition catalyzed by the PEGylated artificial metalloenzyme (Scheme. 1).

First, the amino acid residue of TM1459(H52A/C106D) was replaced with cysteine and reacted with maleimide-terminated PEG. The PEGylated mutants were identified by SDS-PAGE analysis and size exclusion chromatography. The Michael addition reaction was performed using the PEGylated mutants. The PEGylation at K31C or E114C position in the TM1459 mutants enhanced the stereoselectivity.

Keywords : Artificial Metalloenzymes; Polyethylene Glycol; Stereoselective Michael Addition Reaction

人工金属酵素はタンパク質と金属錯体を組み合わせたバイオハイブリッド触媒である¹⁾。これまで我々は超好熱菌由来のタンパク質 TM1459 を用いた人工金属酵素を開発してきた²⁾。一方、ポリエチレングリコール (PEG) をタンパク質に結合するとタンパク質の構造は安定化されるが、活性が低下することが問題である³⁾。そこで本研究では、TM1459 の二量体の界面付近や揺らぎの大きい位置に部位特異的に PEG を結合させた人工金属酵素を合成した。それらを触媒に用いて、立体選択的なマイケル付加反応における反応性を明らかにすることを目的とした (Scheme. 1)。

まず、TM1459(H52A/C106D)の上述のアミノ酸残基をシステインに置換し、マレイミド基を末端にもつ PEG と反応させた。SDS-PAGE およびサイズ排除クロマトグラフィーにより、PEG が結合した変異体を同定した。得られた PEG 修飾体を用いて、マイケル付加反応を実施した。興味深いことに、TM1459 変異体の K31C あるいは E114C の位置で PEG を結合すると、立体選択性が向上することが明らかとなった。



Scheme 1. Michael addition reaction as a model reaction.

1) F. Schwizer, T. R. Ward, *et al.*, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 142. 2) N. Fujieda, *et al.*, *Chem. Sci.*, **2023**, *14*, 3932. 3) A. Zaghmi *et al. Mater. Today Chem.* **2019**, *12*, 121.