非天然金属中心をもつ新たな還元酵素

A New Reductase Containing Non-natural Metal Active Site

小野田 晃* (大阪大学大学院工学研究科)

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University, Akira Onoda*

Received July 31, 2010; E-mail: onoda@chem.eng.osaka-u.ac.jp

Abstract. One useful synthetic reaction missing from nature's toolbox is the direct hydrogenation of substrates using hydrogen. To create an enzyme that can directly reduce organic substrates with hydrogen, researchers have combined metal hydrogenation catalysts with proteins. A direct hydrogenation of olefins catalyzed by rhodium(I) bound to carbonic anhydrase (CA) was reported by Kazlauskas and the colleagues recently. They minimized nonspecific binding of rhodium by replacing histidine residues on the protein surface using site-directed mutagenesis or by chemically modifying the histidine residues. Hydrogenation catalyzed by their Rh-bound CA is slightly slower than for uncomplexed rhodium(I), but the protein environment induces stereoselectivity favoring *cis*- over *trans*-stilbene by about 20:1. This enzyme is the first cofactor-independent reductase that reduces organic molecules using hydrogen.

天然の酵素は、広範な化学反応を効率的に触媒する機能をもっている反面、その対象は生命活動に有益な反応に限定されているともいえる。したがって、生体反応の枠組みの外に着眼すれば、新しい反応を触媒するタンパク質の創出につながる。天然の酵素がもたない反応性で、有機合成化学では一般的で重要な反応の一つが、水素分子を還元剤とする水素化反応である。生体系では、ヒドロゲナーゼが水素分子からプロトンと電子を取り出すが、有機分子の還元には関与しない。通常の代謝過程では、有機分子を還元する際には、NAD(P)H や、FADH₂ を用いている。生体系では、これらの補因子を使うことで、酵素内の活性部位にて補因子と基質を近接させ、かつ、適切な配置に固定化できるので、反応効率を高めることができる。また、異なる酸化還元電位の補因子を使うことで、細胞内で様々な物質の還元を効率的に行うことができる。しかし、補因子の安定性や価格の点を考慮すれば、単離したタンパク質を用いた反応系の場合には、補因子を使わない水素化にも利点がある。

水素分子による還元反応を触媒する酵素を創製するた

めに、これまでに金属触媒とタンパク質を組み合わせた系が報告されている^{1), 2)}。Ward らは、ロジウムのホスフィン配位子にリンカーを介してビオチンを導入し、この触媒ユニットをビオチン-アビジン間の強力な分子間相互作用によって、アビジン内に埋め込む手法を發展させ、高エナンチオ選択的な水素化反応を達成している^{3), 4)}。また、モノクローナル抗体にロジウムホスフィン錯体を取り込ませた系においても、高いエナンチオ選択性に成功した例がある⁵⁾。このように触媒部位を分子間相互作用で固定するアプローチの他には、タンパク質の側鎖をロジウムの配位子として直接利用している例もあるが、選択性は概して低い。一方、フェリチンの内部空間(約 12 nm)に、パラジウム粒子を直接埋め込んだ系では、基質分子のサイズ選択的な水素化反応が報告されている⁶⁾。

Kazlauskas らは、活性中心の金属イオンの置換によって新しい反応性をタンパク質に組み込むアプローチに取り組んでおり、最近、炭酸脱水素酵素(CA)の活性中心の亜鉛をロジウムに置換したタンパク質が、スチルベン触媒の水素化反応においてシス体選択性をもつことを報告した⁷⁾。CAを亜鉛キレーターである2,6-ピリジンカルボン酸の存在下で透析をおこない、活性中心の亜鉛を取り除いてアポ体を調製した後に、[Rh(cod)₂]BF₄ (cod = 1,5-cyclooctadiene)を加えることで、ロジウム(I)を導入したCAを調製した(Scheme 1)。アイソフォームである human CAII 及び bovine CAII を用いたいずれの場合においても、活性中心だけでなく、タンパク質の表面にもロジウムが約5当量程度錯形成していることを、ICP-MSによる金属定量と Bradford 法によるタンパク質定量から示している。この方法で得た置換タンパク質では、過剰のロジウムはタンパク質表面のヒスチジンやリジン残基に結合している可能性が高いと考えられる。そこで、diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理によって、タンパク質表面のヒスチジンイミダゾール窒素に選択的にエトキシカルボニル基の修飾をおこなった。一方で、このような修飾はタンパク質の構造的な安定性を損なうので、表面のヒスチジン残基をアミノ酸置換(His3/4/10/36Arg, His15/17/107/122Phe, His64Ala)することで安定性を向上させている。彼らは、部位特異的変異導入と化学修飾を合わせることで、活性部位以外に1.3当量しか過剰の

連絡先著者名: 小野田 晃

連絡先: 565-0879 大阪府吹田市山田丘 2-1

大阪大学大学院工学研究科

Tel: 06-6879-7929 Fax: 06-6879-7930

Corresponding Author: Akira Onoda

Address: 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0879, Japan

Keywords: artificial metalloproteins, protein modification, rhodium catalyst, hydrogenation

ロジウムが結合していないタンパク質触媒の構築に成功した。

次に、得られた CA 触媒を用いて、*cis*- スチルベンの水素化反応を水溶液中 (MES バッファー) にておこなった (Scheme 2)。比較として原料の $[\text{Rh}(\text{cod})_2]\text{BF}_4$ についても MES バッファーにて反応を行ったところ、水素化 (80.0 %) と同時に *trans*- スチルベンへの異性化反応も (12.6 %) 進行するが、この水素化と異性化の比率 (H/I 比) は 6.3 であり水素化の選択性は低かった。同様に、タンパク質表面にロジウムが結合した置換タンパク質では、H/I 比は 0.9 であり選択性は低い。また、表面に結合した金属が 1.3 当量と少ないロジウム CA では、H/I 比が 16.7 と選択性が高いことから、活性中心に導入したロジウムが水素化の触媒活性に寄与していると考えられる。また、シス体との反応性が、トランス体と比べて、20 倍以上高かった。活性部位近傍の基質認識部位の構造的なシミュレーションからも、シス体の方が、より適切な配置になることが示唆された。

彼らのロジウム CA は、ホスフィン配位子を介さずに活性部位のアミノ酸側鎖に直接配位したロジウム (I) が活性点となって水素化反応を触媒しており、この点は非常に興味深い。克服すべき点として、金属イオンの導入を活性部位に完全には限定できずタンパク質表面にも錯形成してしまうこと、タンパク質マトリクスの中では反応が失速していることが挙げられるが、活性部位の金属置換を軸に、酵素が持つ反応性を広域化して還元酵素を作製した点で意義は大きい。

一方で、金属を含まない人工酵素の開発では、活性部位近傍のアミノ酸を、網羅的なコンピューターデザインと実験室進化を駆使することで最適化をおこない、新しい反応を触媒する酵素の作製に成功した報告がある⁸⁾。⁹⁾ 今後は、このようなアプローチも取り入れることで、遷移金属触媒がもつ多様な反応性を、タンパク質内部へ機能移植できれば、タンパク質進化の過程で選択されなかった触媒能をもつ人工タンパク質を創り出すことになる。今後もタンパク質内部への様々な金属活性点の構築とその反応性の開拓が期待される。

文献

- 1) D. F. Qi, C. M. Tann, D. Haring and M. D. Distefano, *Chem. Rev.*, **101**, 3081 (2001).
- 2) C. M. Thomas and T. R. Ward, *Chem. Soc. Rev.*, **34**, 337 (2005).
- 3) M. Skander, N. Humbert, J. Collot, J. Gradinaru, G. Klein, A. Loosli, J. Sauser, A. Zocchi, F. Gilardoni and T. R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 14411 (2004).
- 4) J. Collot, J. Gradinaru, N. Humbert, M. Skander, A. Zocchi and T. R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 9030 (2003).
- 5) H. Yamaguchi, T. Hirano, H. Kiminami, D. Taura and A. Harada, *Org. Biomol. Chem.*, **4**, 3571 (2006).
- 6) T. Ueno, M. Suzuki, T. Goto, T. Matsumoto, K. Nagayama and Y.

Watanabe, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **43**, 2527 (2004).

- 7) Q. Jing, K. Okrasa and R. J. Kazlauskas, *Chemistry Eur. J.*, **15**, 1370 (2009).
- 8) D. Rothlisberger, O. Khersonsky, A. M. Wollacott, L. Jiang, J. DeChancie, J. Betker, J. L. Gallaher, E. A. Althoff, A. Zanghellini, O. Dym, S. Albeck, K. N. Houk, D. S. Tawfik and D. Baker, *Nature*, **453**, 190 (2008).
- 9) L. Jiang, E. A. Althoff, F. R. Clemente, L. Doyle, D. Rothlisberger, A. Zanghellini, J. L. Gallaher, J. L. Betker, F. Tanaka, C. F. Barbas, D. Hilvert, K. N. Houk, B. L. Stoddard and D. Baker, *Science*, **319**, 1387 (2008).

Scheme 1

Scheme 2