

# 有機合成を基盤とするヘムタンパク質の高機能改変

大阪大学大学院工学研究科  
林 高史

## 1. はじめに

タンパク質とは、一般的にアミノ酸がアミド結合を介して連続的につながった分子量が1万以上の高分子である。そのほとんどは、ある一義的な3次元構造をとり、生体内では様々な機能を発現する主要な構成要素である。かつては、その複雑な形と大きな分子量ゆえに、中身が良く分からないブラックボックスとして扱われてきたが、近年、構造生物学と各種分析機器の飛躍的発展により、タンパク質の構造や物性が次第に明らかとなっている。今日では、タンパク質も有機分子あるいは有機分子と金属錯体の複合体として、一般の化学で取り扱うことの可能な「分子」として眺め、我々の手を加えることも可能な時代が到来しつつある。したがって、この潜在的に機能を有するタンパク質を有機化学の立場から分子レベルで改変し、高機能性材料として活用することは非常に魅力的なテーマである。本講演では、ヘムタンパク質に焦点をあて、我々のグループで実施している化学的な手法を用いたヘムタンパク質の機能化の例を幾つか紹介したい。

## 2. ヘムタンパク質<sup>1)</sup>

ヘムタンパク質は、名前の通り「ヘム」と呼ばれるポルフィリン鉄錯体が補欠分子として、タンパク質マトリクスに結合したホロタンパク質である。ヘムの種類、タンパク質のアミノ酸配列と立体構造、ヘムとタンパク質の結合様式により、生体内では様々なヘムタンパク質が存在する。機能としては、ヘモグロビンやミオグロビンなどの酸素運搬・貯蔵タンパク質、シトクロム P450 やペルオキシダーゼなどの酸化酵素、シトクロム *c* や *b* などの電子伝達タンパク質、あるいは *CooA* や *HemT* などのガスセンサータンパク質などに分類されるが、基本的には、いずれもヘムが活性中心となり、ホロタンパク質全体の構造の違いが多様な機能を生み出している。その多くの場合、ヘムはタンパク質の空孔（ヘムポケット）に対して配位結合と疎水性相互作用及び静電相互作用で結合している。したがって、図1に示すように、タンパク質を変性させることにより、天然のヘムが除去されたアポタンパク質を単離し、そこに、改めて天然のヘムあるいは天然類似の補欠分子（人工ヘム）を挿入した再構成タンパク質を手にすることが可能である。我々のグループではこれまで、このヘムの置換手法に着目し、ヘムタンパク質の機能制御・機能向上・機能変換を実施している。

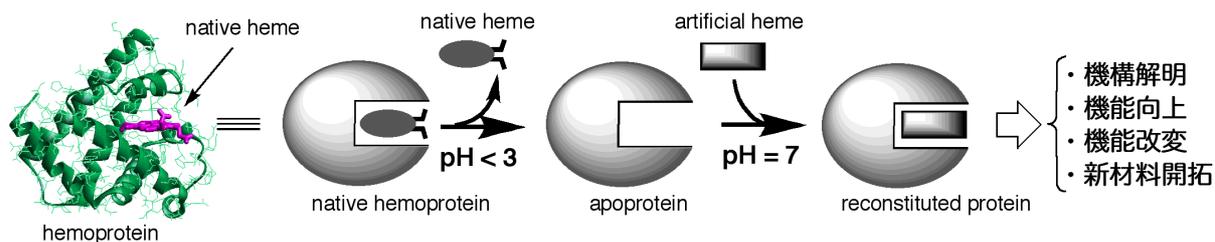


図1. ヘムタンパク質におけるヘム置換（非天然ヘムを用いた再構成）のスキーム

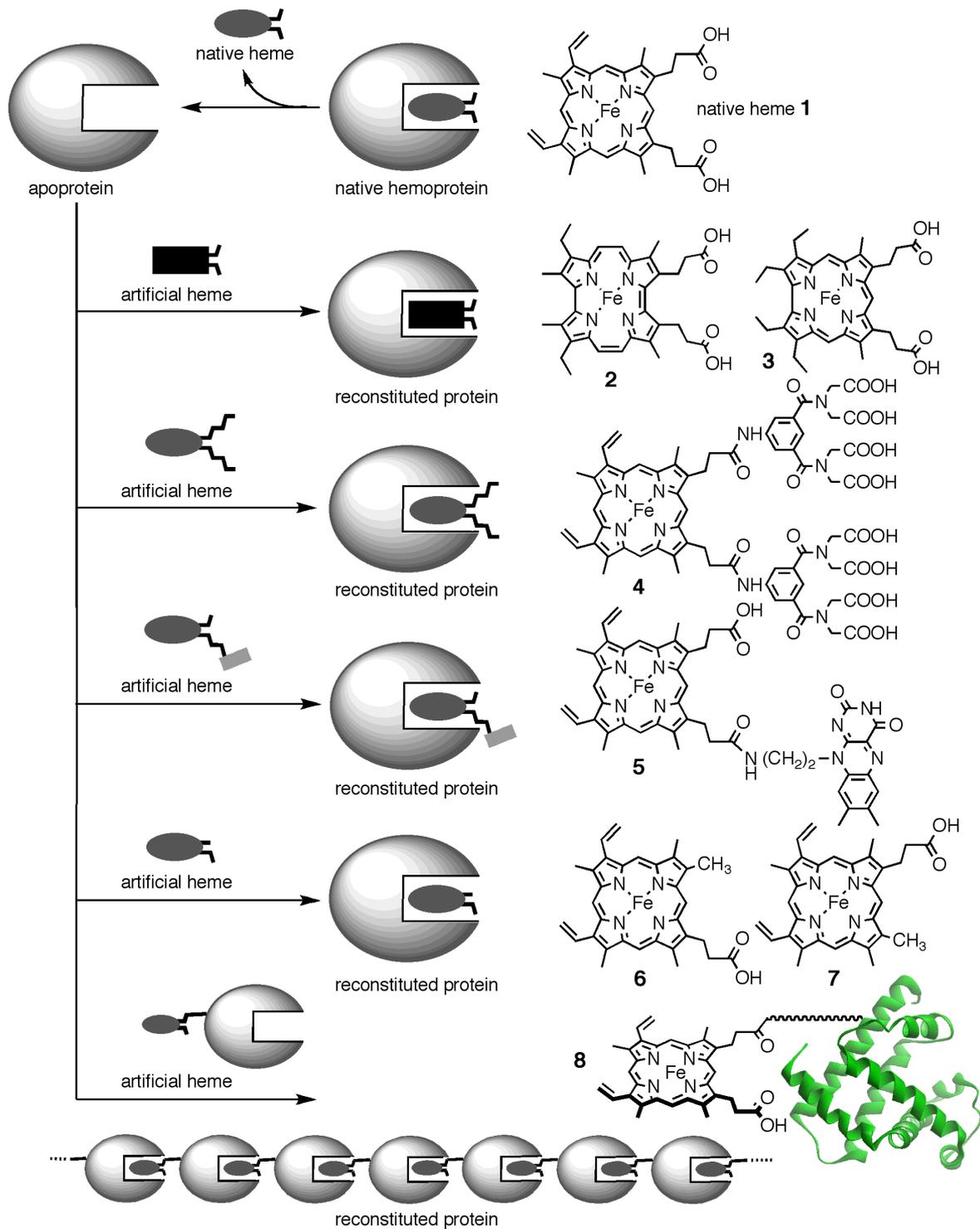


図 2. 我々の研究室で実施してきた合成ヘムによるヘムタンパク質の再構成の例

### 3. 天然のヘムタンパク質活性を超える再構成タンパク質の創製

(I) 高酸素親和性ミオグロビンの創製<sup>2)</sup>: ミオグロビンは最も古くから研究されている酸素貯蔵タンパク質であり、幾つかのグループが遺伝子工学的手法を用いてヘムポケットを改変し、酸素親和性を向上させる努力をしているが、未だに優れた成果が得られていない。我々は、タンパク質マトリクスは天然のものを使い、ヘムをポルフィリンの異性体であるポルフィセンの鉄錯体(図2:化合物**2**)に置換することにより、酸素親和性を一気に2600

倍向上させた。さらに、酸素と一酸化炭素の結合選択性を示す  $M'$  値 ( $M' = K_{CO}/K_{O_2}$ ) は、天然のミオグロビンでは 20–40 程度で一酸化炭素との親和性が顕著に高いが、ポルフィセン鉄錯体を有するミオグロビンでは  $M'$  値は 0.1 となり、酸素が優先して結合することが判明し、天然とは逆の興味深い結果を得た。以上、補欠分子として、天然に存在しないポルフィセン金属錯体を我々の手で合成して、ヘムと置換することにより、リガンド結合挙動が大胆に変化する極めて興味深い例を見出した。

(II) 高活性ペルオキシダーゼの創製<sup>3),4)</sup>：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) のアポ体に前述のポルフィセン鉄錯体 **2** を挿入した再構成タンパク質を調製した。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となった (図 3)。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た。

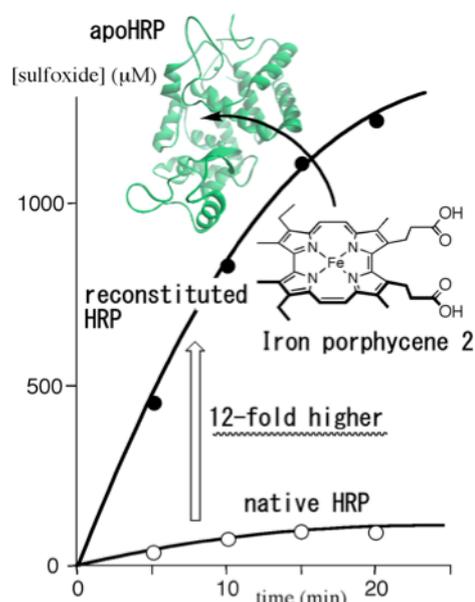


図 3. HRP を触媒とする過酸化水素存在下でのチオアニソールの酸素化反応追跡 (pH = 7.0 at 20 °C)

一方、我々は、その他の人工補欠分子として、例えばポルフィリンの類縁体であるコロールの鉄錯体 (図 2 : 化合物 **3**) 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た。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、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た。

#### 4. ミオグロビンの表面修飾を介した非天然機能の付与

(I) ミオグロビンの酸化酵素への変換<sup>5),6)</sup>：酸素貯蔵タンパク質であるミオグロビンは、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ているが、上記でも述べたようにペルオキシダーゼ活性は極めて低い。その理由の一つは、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 (図 2 : 化合物 **4**) を合成し、ミオグロビンの天然ヘムと置換した。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 ( $k_{cat}/K_m$ ) 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た。

一方、酸素添加酵素であるチトクロム P450 もミオグロビンと同じヘム補欠分子を有して

いるが、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）を持ち合わせていない。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（図 2：化合物 5）を作製し、P450 が触媒するデホルミル化反応を追跡した。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となった。

## (II) ミオグロビン表面へのインターフェース形成<sup>7)</sup>

ミオグロビンは  $pI = 7.4$  の中性タンパク質である。一方、我々は、ヘムプロピオン酸側鎖の末端にカルボキシラートクラスターを導入することにより（図 2：化合物 4）、 $pI = 5.5$  の酸性タンパク質に変換した。その結果、この再構成ミオグロビンと塩基性タンパク質であるチトクロム *c* との静電相互作用を介した安定な複合体 ( $K_a = 10^5 M^{-1}$ ) を獲得した（図 5）。また、修飾ヘムの鉄を亜鉛に置換したポルフィリンを有するミオグロビンを用いた場合、光駆動型電子移動反応が亜鉛ポルフィリンからチトクロム *c* へ、数ミリ秒以内で進行し、鉄三価のチトクロム *c* が鉄二価に還元された。さらにこの電子移動反応は、タンパク質表面のインターフェース（カルボキシラートクラスター）の形状に依存することが明らかになり、ヘム側鎖修飾ミオグロビンは、タンパク質複合体形成を介した電子移動のゲート効果モデルとして提案した。一方、ヘムプロピオン酸末端に、糖鎖を導入したミオグロビンでは、レクチンとの安定なタンパク質複合体を形成することも見出した。このように、ヘムプロピオン酸側鎖末端に適切な修飾を施すことにより、様々なタンパク質複合体を容易に獲得可能であることを証明した。

## 5. チトクロム P450cam におけるヘムプロピオン酸側鎖の役割<sup>8), 9)</sup>

ヘム側鎖のプロピオン酸は、ヘムとタンパク質を結びつけるアンカーとして見なされているが、一方で、ヘムプロピオン酸側鎖とタンパク質の静電相互作用は、機能と密接に関係するという理論的研究もある。しかし、実験的にこれを実証した例は今までになかった。我々はヘムプロピオン酸側鎖のタンパク質内での役割を直接解明するために、6 位、

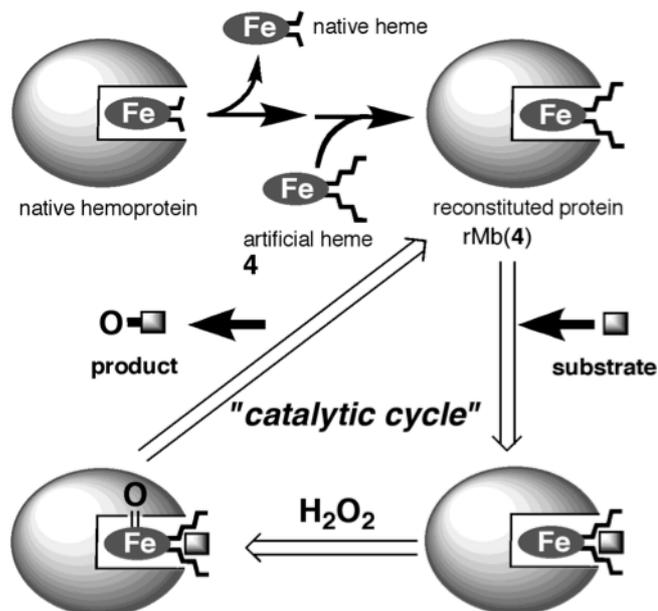


図 4. ヘムプロピオン酸側鎖末端に基質結合部位を有したミオグロビンの調製と触媒反応への応用

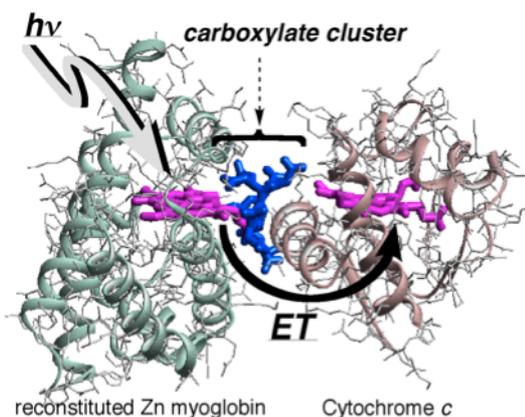


図 5. タンパク質間の電子移動モデル：再構成亜鉛ミオグロビン-チトクロム *c* 複合体形成の模式図

7位のプロピオン酸側鎖の片方を選択的に欠損した片足ヘムをそれぞれ合成した。例えば、モノオキシゲナーゼとして有名なチトクロム P450cam の場合、特に7位プロピオン酸側鎖欠損ヘム (図2:化合物7) を有する再構成タンパク質では、基質結合定数が1/1000に低下し、触媒反応も大きく減速した。P450cam への基質(*d*-camphor)の結合の際に、基質結合部位に元来存在する水分子クラスターの排出が必須であるが、詳細な結晶構造解析 (図6) 及び種々の分光学的測定結果から、7位プロピオン酸側鎖がタンパク質の特定のアミノ酸と協調しながら水分子を排出するゲートの機能的役割を果たしていることが明確になった。今まで、このような酵素の基質結合に存在する水分子の排出経路や機構に言及した報告はほとんど無く、本成果は有機合成を駆使して得られた片足ヘムを用いて初めて明らかになったものであり、酵素化学の上でも非常に重要視されている。

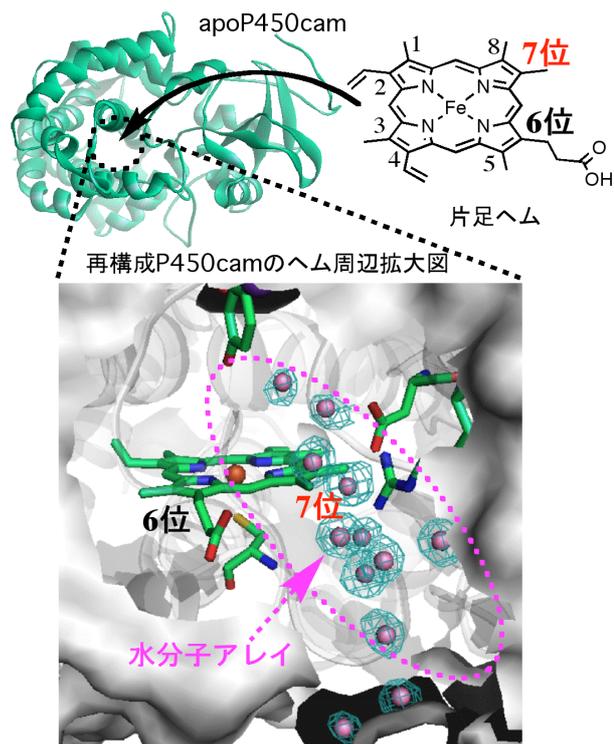


図6. 7位プロピオン酸側鎖欠損ヘムを有する再構成 P450cam の結晶構造。7位プロピオン酸側鎖をメチル基に変換することによって発生したバルクから基質結合部位まで連続した『水分子アレイ』の存在が見られる。

## 6. ヘムタンパク質を用いた超分子ポリマー構築<sup>10)-15)</sup>

天然ではタンパク質や核酸などの生体分子による様々な自己組織化集合体が見られる。このような精緻な構造体を模倣した超分子ポリマーの報告例は幾つかあるが、その殆どは小分子を水素結合や配位結合で直線的に並べただけである。一方、我々は、ヘム-ヘムタンパク質の安定な非共有結合相互作用を利用したヘムタンパク質超分子ポリマーの構築に挑戦した。具体的には図7に示すように、遺伝子工学を用いてヘムタンパク質チトクロム  $b_{562}$  の表面 (ヘムポケットの反対側) に導入したシステインのチオール基に対して、ヘム誘導体を共有結合で修飾した。その上で、天然ヘムを酸変性によって除去した後に、溶液を中性に戻すことによってタンパク質の自己組織化分子集合体を獲得した。特にAFM (原子間力顕微鏡) によって、200~500 nm 程度 (タンパク質の数として100分子程度) のファイバー状ヘムタンパク質ポリマーを観測した。

また我々は、ミオグロビンの場合でも、ヘムポケットの裏側の Ala125 を Cys125 に変異させた後に、得られたチオール残基へ同様にヘムを修飾し、ミオグロビンの自己組織化集合体を得た。このミオグロビンポリマーの酸素親和性は、単量体の天然ミオグロビンと遜色なく、タンパク質の機能を保持したままクラスター化していることが明らかとなった。ミオグロビンポリマーの場合には、過酸化水素処理を施すことにより、ファイバー間がクロスリンクしたスポンジ状の巨大3次元構造体を形成することをSEM (走査型電子顕微鏡) で確認した。以上、ヘムとヘムタンパク質の分子間相互作用を応用し、これまで報告例

のないヘムタンパク質の斬新的1～3次元自己組織化集合体（タンパク質をモノマーとする超分子ポリマー）を自在構築することが可能となった。

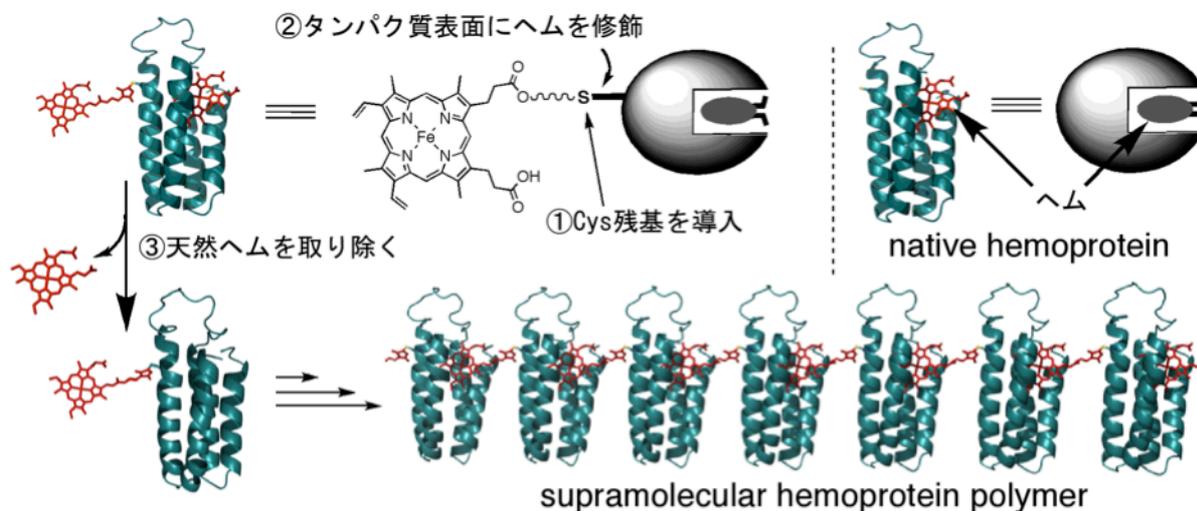


図7. ヘムタンパク質チトクロム  $b_{562}$  超分子ポリマー構築手法

## 6. 最後に

タンパク質の機能変換・改変や解析研究はタンパク質表面の化学的修飾や遺伝子工学を用いたアミノ酸置換が主な手法として採用されている。一方、我々は、補欠分子を有するヘムタンパク質において、ヘム補欠分子が非天然の金属錯体に容易に置換可能であることにいち早く着目し、本来のタンパク質機能の向上や改変、あるいは評価を積極的に推進している。特に天然のヘムよりも優れた環状テトラピロール配位子を有する金属錯体について、有機合成化学及び錯体化学の知識と手法を駆使して設計・合成し、高活性な機能性ヘムタンパク質を創製した成果は、我々の研究の大きな特徴である。また、混沌としていたヘムプロピオン酸側鎖のタンパク質中での機能的役割について、ヘムプロピオン酸側鎖を欠損させたヘムを有するタンパク質を作成して一気に解決した。さらに、ヘムタンパク質クラスター構築についても、ヘムとヘムポケットを分子間で相互作用させ、連続的に連結する報告例はこれまでにない。我々の合成化学的手法に基づく斬新なアイデアによって、初めて得られたヘムタンパク質超分子ポリマーの構築手法は、今後、様々なユニークなタンパク質自己組織化集合体へ展開できるものと大いに期待される。

**謝辞：**ここで紹介した一連の研究は、本講演者が京都大学、九州大学、大阪大学で実施した研究成果の一部を要約したものであり、ご指導いただいた生越久靖先生（京都大学名誉教授）、久枝良雄先生（九州大学大学院工学研究院教授）、及び一緒に携わってくれたスタッフの松尾貴史先生（現奈良先端技術科学大学院大学准教授）、小野田晃先生、大洞光司先生（大阪大学大学院工学研究科助教）および多くの学生諸君、共同研究者の皆様にこの場を借りて感謝したい。

- 1) *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 35–43. 2) *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 16007–16017. 3) *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 10326–10327. 4) *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 15124–15125. 5) *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 436–437. 6) *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11234–11235. 7) *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 1098–1101. 8) *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 432–433. 9) *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 1398–1400. 10) *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 10326–10327. 11) *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 1271–1274. 12) *Chem. Sci.* **2011**, 2, 1033–1038. 13) *Chem. Commun.* **2010**, 46, 9107–9109. 14) *Angew. Chem. Int. Ed.* in press. 15) *Angew. Chem. Int. Ed.* in press.