

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13660

研究課題名(和文) セレノアミノ酸の特性に着目した高活性生体金属触媒の創成

研究課題名(英文) Construction of metallo-catalysts with high reactivities based on characters of selenoamino acid

研究代表者

松尾 貴史 (Matsuo, Takashi)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・准教授

研究者番号：50432521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質構造により構築される反応場で、金属錯体の反応性を用いて触媒反応を進行させるために、生体金属触媒の設計が数多く行われている。その際、その金属配位元素を重視することが必要である。そこで、本研究では、従来の生体金属触媒の創成で用いられることがほとんどなかったセレン含有アミノ酸残基が金属錯形成場となる新規金属酵素に創成を試みた。入手容易なサブチリシンをホストタンパク質として、化学修飾によりセレノシステインを導入し、遷移金属錯体の形成を行った。その結果、効率的なセレノシステインの導入条件を決定でき、さらにケトンの還元を触媒する構造上ユニークな金属酵素として機能しうることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：A variety of artificial metallo-biocatalysts have been developed aiming at catalytic reactions based on reactivities of metal complexes in protein cores with highly-ordered structures. For molecular design of the catalysts, we pay attentions to characters of elements that coordinate to the centered metal ion. In this context, this project has focuses on the characters of selenium as a coordinating element although amino acids with a selenium atom have been rarely employed for the construction of artificial metalloenzymes. We have attempted to construct a metal coordination site with selenocystein in subtilisin, a protease readily obtainable from conventional vendors, through chemical modification and to incorporate several transition metal ions into the site. We successfully optimized the conditions for the incorporation of selenocysteine and found that the metalloenzyme is able to mediate the reduction of ketones in the presence of suitable reducing reagents.

研究分野：生物無機化学

キーワード：セレノシステイン 金属酵素 サブチリシン

1. 研究開始当初の背景

(1) タンパク質高次構造により構築されるキラル反応場で、金属錯体の反応性を用いて触媒反応を進行させるために、タンパク質を基盤とする金属含有バイオ触媒の開発研究が数多く行われている。その方法には、(i) アミノ酸側鎖官能基を金属配位子とする、(ii) 合成錯体を導入する、という2つの方法がある。いずれに方法においても、アミノ酸側鎖やヘム類縁体等の合成補因子が配位子として機能する。したがって、従来の金属含有バイオ触媒の活性部位は *N*-, *O*-, *S*-配位錯体からなる構造がベースであり、その配位構造の最適化が主に検討されてきた。

(2) 一方、有機金属化学の分野では、重典型元素が配位子となっている遷移金属錯体が合成され、水素分子活性化などの高度な反応性が報告されている。さらに、近年の金属含有バイオ触媒においても、水中で比較的安定な有機金属錯体(すなわち *C*-配位)とタンパク質のハイブリッド触媒が数多く報告されている。したがって、金属含有バイオ触媒においても、従来あるような配位形式にとらわれることなく、配位元素の特色に基づいた分子設計を行えば、これまでにないユニークなバイオ触媒が創成できると考えられた。

2. 研究の目的

有機金属化学の研究において、セレン配位遷移金属錯体は水素活性化などの有用な触媒活性を示すことが知られている。そこで、前項で述べた経緯より、本研究では、コンパクトな構造で高難度な反応を触媒する金属含有バイオ触媒として、セレン-遷移金属錯体を活性中心に有する新規バイオ触媒の構築をめざした。具体的には、セレン含有アミノ酸を素材タンパク質の適切な位置に配置させ、セレン配位遷移金属錯体とすることで、酵素活性中心の構築を試みた。この研究の基本概念は、タンパク質構造による立体保護効果による錯体の安定性の向上と、セレン原子がもつ電子受容性である。

本研究を通して、配位する元素の特性に着目し、重ヘテロ元素がもつ元素特性とタンパク質高次構造の融合を図り、自然界では複雑かつ巨大な分子構造を持つ酵素により達成している高難度な触媒活性が、配位元素の特性を活かすことで、シンプルな構造の人工金属酵素により達成可能かどうかを検討した。

3. 研究の方法

入手容易で熱安定性が高く、さらにシステイン残基を含まないセリンプロテアーゼである枯草菌由来サブチリシカールスバークをホストタンパク質として用いた。この酵素分子の活性部位残基を担う Ser221 を、Bender (Bender *et al. Biochemistry*, 1967, 6,

610) および Hilvert (Hilvert *et al. Biochemistry*, 1995, 34, 6616) らによって報告されている下記のスキームに従って、カルコゲン含有アミノ酸残基(Cys, SeCys)に置換した。

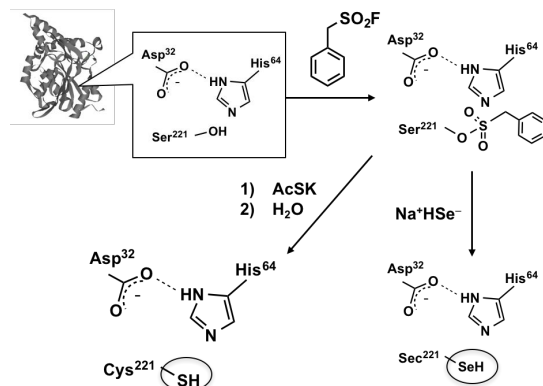


図1 サブチリシカールスバーク Ser221 の置換方法

まず、取り扱いが比較的容易なチオールサブチリシを用いて、置換効率およびホストタンパク質の精製方法について最適化を行ったのち、その置換方法および精製条件をセレンサブチリシにも適用した。ホストタンパク質キャラクタリゼーションを、SDS-PAGE、MALDI-TOF-MS および CD スペクトルによって行ったのち、これらの残基が配位子となる金属錯体の形成を試みた。

4. 研究成果

(1) Ser221 残基のカルコゲン含有アミノ酸残基への置換は、フェニルメタンスルホニルフロリドを Ser221 に作用させた PMSF 化サブチリシ (PMS-STL) に対して、目的とする元素を含む求核剤を作用させて行う。Bender らは、チオールサブチリシの調製において、この求核剤との反応を、pH = 5.25 の緩衝溶液中で、65 時間かけて行い、脱塩後、弱陽イオンクロマトグラフィー (CM カラム) の非吸着成分として得ていたが、収率は 10% 以下と低いものであった。Hilvert のセレンサブチリシの調製も、この方法に沿って行われていたが、収率は高くなかった。そこで、Ser221 の変換の実用的な最適条件の探索を行った

表1 チオールサブチリシの精製検討

pH ^{a)}	Time (h)	Yield of Thiol-STL (%) (from PMS-STL)
5.25	65	<10 (previous method)
6.0	48	14
6.0	65	45

^{a)} 50 mM MES, 50 mM CaCl₂ buffer, under N₂

表1に示すように、求核剤の反応性を考慮して、pH = 6.0にすると、短時間でも収率が少し改善する傾向が見られ、65時間の反応時間では、収率45%と、通常の実験レベルで適用できる条件であった。そこで、セレンサブチリン調製のためのNaHSeとの反応も、この条件に従って行った。しかし、pHをさらに高くすると、チオールサブチリンはほとんど得られず、元のサブチリンがCMカラムの吸着成分として得られた。これは、PMS-STLとチオ酢酸カリウムとの反応と並行して、加水分解が優先したものと考えられる。

また、これらのタンパク質の純度を上げるために、タンパク質をカラムクロマトグラフィーの非吸着成分として得るのでなく、チオール選択的カラム担体であるチオプロピルセファロース6Bへの担持によって得る方法を検討した。得られた粗チオールもしくはセレンタンパク質をバッチ法にて、チオプロピルセファロース6Bに担持させ、バッファでペプチド断片および未変換のサブチリンを洗浄除去したのち、2-メルカプトエタノールを含むバッファで、Ser221が変換されたサブチリンを溶出させた。その結果、DTNB滴定で99%以上の純度のチオール(もしくはセレン)サブチリンを得ることに成功した。

(2) Ser221残基をセレンシステイン(Sec)に置換したセレンサブチリンは、MALDI-TOF-MS分析により、セレンの反応性により、2-メルカプトエタノール非存在下では、空気酸化によって、セレン酸残基(-SeO₂H)として単離された(図2)。また、紫外可視吸収スペクトルでは、タンパク質部分由来の280nm付近のバンド以外に、400nm付近に吸収バンドが観測され(図3)、セレン酸残基特有のバンドと帰属された。NaBH₄の添加により、この吸収バンドは消失することからセレン酸がセレンオールに還元されたと考えられる。還元型セレンサブチリンは、還元剤存在下では安定であるが、非存在下、空気中ではただちに酸化型に戻った。また、CDスペクトルにおいて、セレンサブチリンはサブチリン本来の2次構造の特徴を保持していることが分かった。

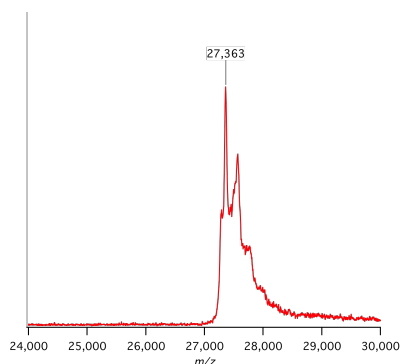


図2 酸化型セレンサブチリンのMALDI-TOF-MSスペクトル

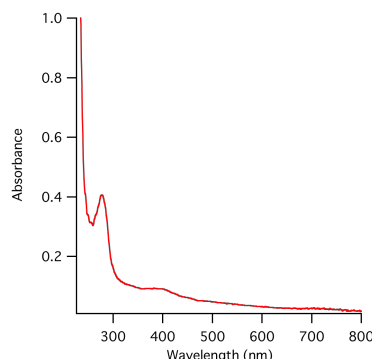


図3 酸化型セレンサブチリンの紫外可視吸収スペクトル

(3) 窒素下で脱塩操作を行って、還元型セレンサブチリンを得たのち、チオールサブチリンにおいて錯形成が確認されているCu²⁺の錯形成能を検討したところ、340nm付近に特徴的な吸収バンドが出現した(図4)。このような吸収バンドは、チオールサブチリンでも観測されており、CysS⁻ Cu²⁺電荷移動吸収バンドと帰属している。また、Sec221の近傍には、His64が位置していることから、セレンサブチリンにおいても、Sec221とHis64がCu²⁺の錯形成を担う配位子として機能すると考えられる。この吸収バンドは、時間の経過とともに消失していく過程が観測された(半減期約60min)。この減少は、Cu(II)からCu(I)への自動還元であれ、チオールサブチリンにおいても観測された。また、半減期はチオールサブチリンにおけるCu錯体よりも小さく、Cu(I)状態が安定であることが示唆された。即ち、当初の分子設計の妥当性が示された。

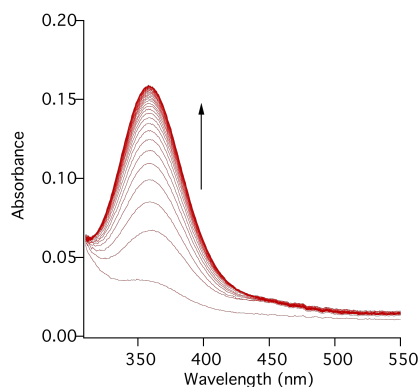


図4 セレンサブチリン + Cu²⁺(1.1等量)の吸収スペクトル変化(150 msec 毎、5 sec の変化、50 mM Tris pH = 7.4、10 mM CaCl₂ 溶液中)

(4) 他の遷移金属イオンの錯形成を検討するために、第一周期遷移金属イオンについて上記の実験を行い、ICP-MSによる金属イオン定量を実施したところ、Fe³⁺、Co²⁺、Zn²⁺について、1:1錯形成が確認された。また、後周期遷移金属錯体形成能について、検討する

ために、Ru(terpy)Cl₂(H₂O)錯体を前駆体錯体として、還元型セレノサブチリシンに作用させたところ、橙色のタンパク質が得られた。ICP-MS によって、Ru : タンパク質 = 1 : 1 が確認でき、Ru-Se 錯体がタンパク質空間内で形成されたことが示唆された。

さらに、このタンパク質に対して、NaBH₄ を作用させたところ、450 nm 付近の LMCT バンドの吸収変化が観測され、次いでアセトフェノンを用いて還元させたところ、元の吸収スペクトルに回復し、同時にフェニルエタノールが LC-MS にて検出された。以上のことから、Ru 中心でヒドリド中間体が形成され、反応活性種としてケトン還元したものと考えられる。すなわち、構築したタンパク質が金属酵素として機能しうることが示された。

(5)以上に述べたように、本研究においては、比較的シンプルな構造かつ入手容易なタンパク質をホストタンパク質として用い、化学修飾を基盤として、従来の非天然金属含有酵素にはない新たな配位形式をもつ新規酵素の創成に成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yuki Kanai, Ryu Nishimura, Kotaro Nishiyama, Tomokazu Shibata, Sachiko Yanagisawa, Takashi Ogura, Takashi Matsuo, Shun Hirota, Saburo Neya, Akihiro Suzuki, Yasuhiko Yamamoto
“Effects of Heme Electronic Structure and Distal Polar Interaction on Functional and Vibrational Properties of Myoglobin”
Inorg. Chem. 55, 2016, 1613-1622 査読有
DOI: 0.1021/acs.inorgchem.5b02520

〔学会発表〕(計 4 件)

Takashi Matsuo, Takamasa Kono, Katsuya Gonda, Masaya Ishida, Shun Hirota

「Experimental Investigation on Correlation between the reactivities of transition Metal Ions in Protein Core and the Global Protein Flexibility」

錯体化学会第 66 回討論会

2016 年 9 月 10 日、福岡大学七隈キャンパス (福岡県福岡市)

松尾貴史、石田昌也、河野尊匡、権田勝也、廣田俊

「チオールサブチリシンをモデルタンパク質としたタンパク質に結合した金属イオンの性質と分子全体の構造柔軟性との相関関係の実験的検証」

第 43 回生体分子科学討論会

2016 年 6 月 24 日、名古屋大学東山キャンパス (愛知県名古屋市)

松尾貴史

「素材タンパク質の構造的特徴に基づく生体触媒の創成および反応性制御」

第 16 回日本蛋白質学会年会

2016 年 6 月 27 日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

Takashi Matsuo, Masaya Ishida, Takamasa Kono, Shun Hirota

「Correlation between the reactivity of a metal complex in a protein core and the global flexibility of the protein: Mechanistic study using thiol-subtilisin as a model protein」

日本化学会第 96 春季年会

2016 年 3 月 24 日、同志社大学田辺キャンパス (京都府京都田辺市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ウェブサイト

http://mswebs.naist.jp/LABs/hirota/tmatsuo/matsuo_jpn.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

松尾 貴史 (MATSUO, Takashi)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・准教授

研究者番号：50432521

(2)連携研究者

廣田 俊 (HIROTA, Shun)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・教授

研究者番号：90283457