

好熱菌由来タンパク質から耐熱性ペルオキシダーゼを創る

一般にタンパク質は壊れやすく、中性の水溶液かつ室温付近以外の条件では、すぐに機能を消失すると考えがちです。しかしこれは、普段目にするタンパク質が我々の細胞と同じ成育環境で機能する細胞に由来するからであり、（我々から見て）過酷な環境下で生育する微生物（極限環境微生物）が産生するタンパク質は、その環境で機能するための優れた特性を有しています。例えば、私たちが研究の対象としている好熱菌（*Thermus thermophilus* HB8）は、もともと伊豆地方にある温泉の噴気孔で発見されたもので、菌体を構成するタンパク質は、100℃に近い温度でも変性することなく機能することが知られています。好熱菌由来タンパク質は、耐久性や耐有機溶媒性に優れたものも多く、我々の「タンパク質はもろくて使えない」という観念を覆し、現在では、様々な分野で利用が進んでいます（文献 1, 2）。好熱菌には様々な機能を有するタンパク質が存在するでしょうから、その一つ、一つを単離し、特性を調べてゆけば、有用なタンパク質を見つけることは、これからも可能でしょう。ただしこれでは、化学者の出番はありません。化学者である私としては、好熱菌由来タンパク質の優れた性状を維持・利用しつつ、化学のチカラを使って新たな機能性タンパク質を作りたいものです。

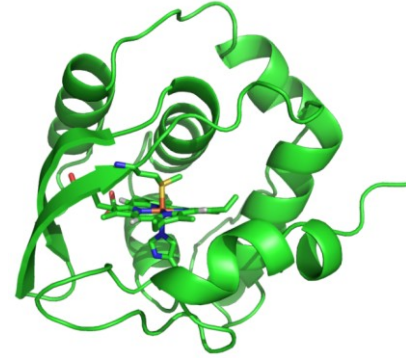


図 1. チトクロム c_{552} (Cyt c_{552}) の結晶構造。プロテインデータバンク (PDB) : 1C52

好熱菌由来タンパク質を人工酵素・機能性タンパク質の基盤として用いる利点として、

- 1) 大腸菌を宿主とする組換え体として、タンパク質を大量に得られることが多い。
- 2) タンパク質が高温でも安定であるため、精製および精製後の取り扱いが容易である。
- 3) 複数の変異導入に対しても、もとの高次構造を保つことが多く、機能設計がしやすい。

が挙げられます。1) , 2) は研究の本質には、関係なさそうなことですが、生成・精製が簡単というのは、日々の研究では、結構重要です。以下では、好熱菌由来タンパク質を使った我々の研究を簡単に紹介します。

我々は、*Thermus thermophilus* 由来タンパク質の中から、立体構造が明らかであり、ヘム（鉄プロトポルフィリン誘導体）を補因子として有する電子伝達タンパク質、シトクロム c_{552} (Cyt c_{552} , 図 1) を選び、これを基盤分子とする耐熱性ペルオキシダーゼの創製を試みました。ペルオキシダーゼ反応には、触媒作用の鍵となる一般酸-塩基触媒機構というものがあります（図 2）。電子伝達タンパク質である

Cyt c_{552} には、もともところした機構はありませんので、ヘムの近傍で変異導入を行い、人工的に触媒機構を組み込みます。タンパク質の立体構造をよく眺め、ヘム鉄の上方およそ 5.2 Å に位置する Val⁴⁹ をアスパラギン酸に置換しました。Cyt c_{552} のヘムは、八面体 6 配位構造をとっており、鉄イオン上には、反応を起こすための配位部位がありません。そこで、もとの配位子の一つである Met⁶⁹ をアラニンに置換し、鉄イオンの配位座を一つ空位にしました。こうして得られた変異体 (V49D/M69A) のヘム近傍を模式的に示すと図 2 のようになります。この変異体のペルオキシダーゼ

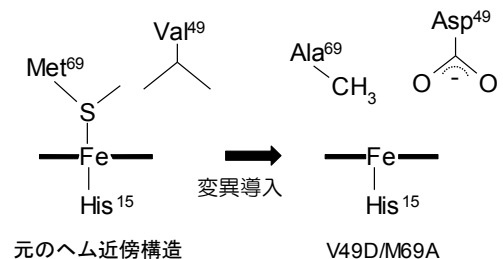


図 2. 変異導入によって Cyt c_{552} に組込んだ反応活性部位。

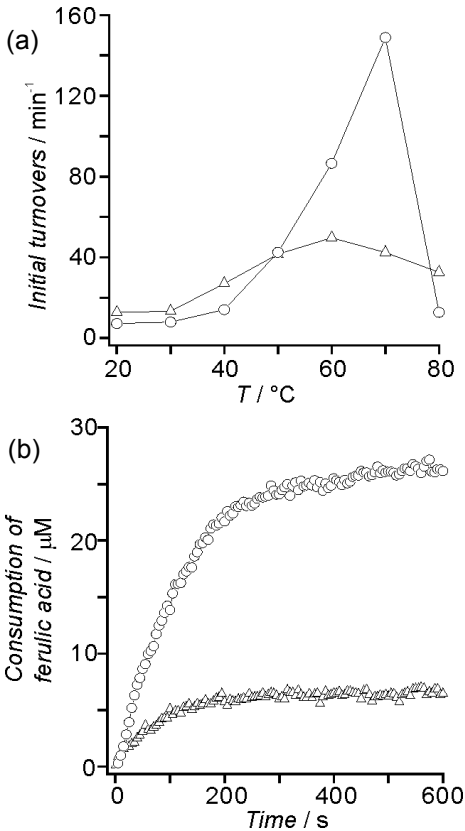


図 3. V49D/M69A 変異体、Mb H64D 変異体によるペルオキシダーゼ反応。○: V49D/M69A、△: Mb H64D。(a) 触媒活性の温度依存性。反応開始時点の触媒回転数で比較。(b) 70 °C における基質消費量の時間変化。反応条件: タンパク質 0.2 μM; 酸化基質 (フェルラ酸) 200 μM; H₂O₂ 200 μM, 20 mM MES-MaOH (pH 5.0) 緩衝溶液。

後もそのまま残っていることがわかっています。) 触媒反応の過程で活性中心であるヘムが分解するためであることを突き止めました。人工酵素として更なる耐熱・耐久性を追究するにはこの問題を解決する必要がありましたが、現在では、この失活過程がどのような反応経路で進むのかを解明し、活性低下を抑制するための分子デザインを行うことも可能となりました。その結果、最新の変異体を用いたペルオキシダーゼ反応では、70°C でも 1 時間以上触媒活性を持続させることに成功しています。

我々は、ここで紹介したものの他にも好熱菌由来 Cyt c552 使った研究を進めています。その過程で、このタンパク質が、一般的な常温細胞由来のチトクロム c とは異なる性質を示すことがわかってきました。

引用文献)

1. 「極限環境微生物とその利用」堀越弘毅、関口武司、中村 聡、井上 明 著、講談社サイエンスティフィック、2000 年、東京

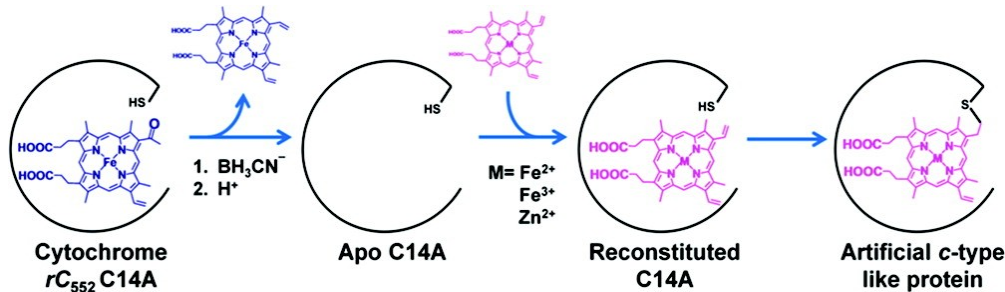
活性を図 3 に示します。V49D/M69A 変異体の触媒活性 (図 3a, ○) は、温度の上昇に伴って増大しており、熱による反応速度の上昇が触媒活性に反映されています。以前報告されているミオグロビンの H64D 変異体 (基質の種類によっては、天然に匹敵する高いペルオキシダーゼ活性を示す) と比較すると (図 3a, △)、40°C までの触媒回転数では Mb H64D が上回るものの、60 および 70°C では、V49D/M69A 変異体がミオグロビン変異体を大幅に上回る触媒回転数を示します。なお 80°C における急激な活性低下は、未同定配位子によって 6 配位型ヘムが生成し、活性部位が塞がれるためであり、タンパク質は無傷であることを確認しています。このため、温度を少し下げると再び触媒活性が出てきます。80°C になると触媒のプレーカーが落ちるような感じでしょうか。高温条件下における V49D/M69A 変異体の優位性は、活性の持続性にもみられます。図 3b は、V49D/M69A 変異体および Mb H64D 変異体を用いて、70°C でペルオキシダーゼ反応を行った際にみられる基質消費量の経時変化を示しています。V49D/M69A 変異体は、ミオグロビン変異体より常に基質消費量で上回っており、触媒活性の持続性においてもミオグロビン変異体よりも優位であることが分かります。以上の結果は、V49D/M69A 変異体が、高温条件下で、高い触媒活性とその持続性をもつことを示しており、タンパク質本来の耐熱・耐久性が高温域における触媒活性の発現にも有効に機能することを物語っています。

図 3b から明らかなように、V49D/M69A 変異体の酵素活性は、200 秒付近を境に急速に低下しています。様々な検討の結果、この現象は、タンパク質が熱で変性したためではなく (タンパク質の骨格自体は、失活

2. Thermophiles Biodiversity, Ecology, and Evolution, A. –L. Reysenbach, M. Voytek, and R. Mancinelli Ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2001, NY.

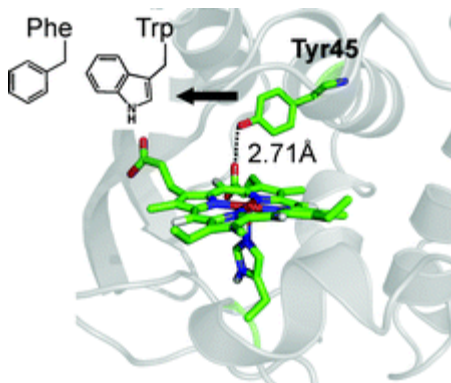
関連する我々の論文より)

1. Cytochrome *c*₅₅₂ from *Thermus Thermophilus* Engineered for Facile Conversion of the Prosthetic Group, *Biochemistry Accepted*, Ibrahim, Sk. Md., Nakajima, H., Ramanathan, K., Takatani, N., Ohta, T., Naruta, Y., Watanabe, Y.



シトクロムcには、補欠分子族であるヘムとタンパク質骨格との間に共有結合があるため、ヘムをタンパク質から除去し、非天然の分子に置換するには、時間と手間がかかり、反応収量も高くありません。我々は、好熱菌由来のタンパク質 Cyt *c*₅₅₂ を利用することで、「ヘムの除去、非天然分子への置換、置換分子とタンパク質骨格との共有結合形成」を簡単に行う仕組みを創り出しました。

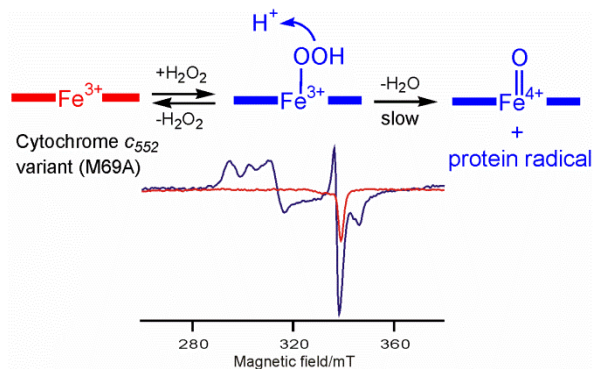
2. Molecular Design of Heme Proteins for Future Application, *Catal. Surv. Asia* 2011, **15**, 134-143. Nakajima, H., Shoji, O., Watanabe, Y.
3. Rational engineering of *Thermus thermophilus* Cytochrome *c*₅₅₂ to thermally tolerant artificial peroxidase, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 2010, **39**, 3105-3114, Nakajima, H., Ramanathan, R., Kawaba, N., Watanabe, Y.



好熱菌由来のCyt *c*₅₅₂は、高温でも機能するペルオキシダーゼに改変可能ですが、触媒反応の進行とともに急速に失活することが問題でした。この研究では、その失活の機構を明らかにすることで、高温下での反応における触媒失活の抑制を可能にしました。

4. Engineering of *Thermus thermophilus* Cytochrome *c*₅₅₂: Thermally Tolerant Artificial Peroxidase, *ChemBioChem* 2008, **9**, 2954-2957, Nakajima H., Ichikawa Y., Satake Y., Takatani N., Manna SK., Rajbongshi J., Mazumdar S., Watanabe Y.

- Reactivities of oxo and peroxo intermediates studied by hemoprotein mutants., *Acc Chem Res* 2007, **40**, 554-562, Watanabe Y., Nakajima H. and Ueno T.
- Characterization of peroxide bound heme species generated in reaction of thermally tolerant cytochrome c_{552} with hydrogen peroxide. *ChemBioChem* 2006, **7**, 1582-1589, Ichikawa Y., Nakajima H., Watanabe Y.



ペルオキシダーゼサイクルにおいて、CompoundO と呼ばれる反応中間体は、寿命が短く、これまで極低温状態でのみ生成・観測が可能でした。我々は、好熱菌由来 Cyt c_{552} の極端に疎水的なヘム空間を利用することで CompoundO を室温付近で生成させ、EPR による観測と反応性の調査しました。