

2023年9月19日

報道関係者各位

国立大学法人 信州大学

新規人工酵素 Syn-F4 鉄エンテロバクチンエステラーゼの立体構造を解明 天然の酵素とは全く異なる立体構造および反応機構が明らかに

信州大学繊維学部・バイオメディカル研究所の新井亮一准教授、信州大学大学院総合理工学研究科繊維学専攻修士課程の栗原航大さん、信州大学農学部・バイオメディカル研究所の梅澤公二助教、米国プリンストン大学の Michael Hecht 教授らの国際共同研究グループは、細胞内で鉄の取り込みの際に機能する新規人工酵素 Syn-F4 鉄エンテロバクチンエステラーゼの詳細な立体構造を X 線結晶構造解析により解明することに成功しました。Syn-F4 は、2 本の長い α ヘリックスが 2 組合わさった 4 本ヘリックスバンドル二量体構造を形成し、中央部分に特徴的な穴が貫通しており、天然の酵素とは全く異なる立体構造であることが明らかになりました。また、反応機構も天然の酵素と大きく異なっており、Syn-F4 が、天然の酵素と異なる機構で生命活動維持に必要な酵素として細胞内で機能することを示しました。今後、人工タンパク質や人工酵素の可能性を拡張し、タンパク質工学や合成生物学分野の発展や応用につながることを期待されます。本研究成果は米国科学アカデミー紀要(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) 9 月 19 日発行号への掲載に先立ち、同誌 Web サイトにてオンライン版が 9 月 11 日に公開されました。

1. 本研究のポイント

- ・天然には存在せず、新規に創出された人工タンパク質である新規人工酵素^{*1} Syn-F4 鉄エンテロバクチンエステラーゼの立体構造を X 線結晶構造解析^{*2}により解明
- ・Syn-F4 は、2 本の長い α ヘリックス^{*3}が 2 組合わさった 4 本ヘリックスバンドル^{*4}二量体構造を形成し、中央部分に特徴的な穴が貫通しており、天然の鉄エンテロバクチンエステラーゼ酵素とは全く異なる立体構造であることを解明
- ・Syn-F4 は、天然の酵素と大きく異なる機構で生命活動維持に必要な酵素として機能することを示しており、今後、新たな人工タンパク質や人工酵素の可能性の拡張につながることを期待

2. 研究背景

タンパク質は生体内で様々な機能を担う非常に重要で高機能な生体物質であり、生物が生きていくために必要不可欠なものです。このタンパク質を人工的にデザインし、望みの機能を実現することができるようになれば、医薬品開発や環境負荷の少ない化学反応、さらにはナノバイオテクノロジー等の発展に大きく貢献できると考えられ、タンパク質工学研究の究極的目標でもあります。しかしながら、天然に存在しないタンパク質を新規に人工的に創出した新規人工タンパク質^{*5} (*de novo protein*: デノボタンパク質) の設計開発は、現在においても困難な課題であり、特に高機能な新規人工タンパク質の創製に成功しているのは、世界でも少数のグループに限られています。これまでに、米国プリンストン大学化学科の Michael Hecht 教授の研究室では、バイナリーパターン法^{*6}を用いた新規人工タンパク質の創製に関して長年に渡り先駆的な研究を行ってきました。バイナリーパターン法とは、タンパク質の表面には親水性アミノ酸^{*7}、内側には疎水性アミノ酸^{*8}が配置されるように、アミノ酸

の配列パターンをデザインする方法です[参考文献 1]。これまで、Hecht 研究室では、特に 4 本ヘリックスバンドルタンパク質の設計開発に多く成功してきました。この中の一つの新規人工タンパク質 Syn-F4 は、鉄制限培地で増殖できないエンテロバクチンエステラーゼ欠損大腸菌株(Δfes)の生育を相補する活性により選択および分子進化することにより得られ [参考文献 2,3]、実際に細胞内で鉄の取り込みの際に機能する鉄エンテロバクチンエステラーゼ活性を有する新規人工酵素であることを明らかにしてきました[参考文献 4]。しかし、その立体構造や反応機構などは分かっていませんでした。

3. 研究内容・成果

そこで、本研究では、X線結晶構造解析により、新規人工酵素 Syn-F4 の立体構造を解明しました。Syn-F4 は、2 本の長い α ヘリックスからなる構造が 2 組合わさった 4 本ヘリックスバンドル二量体構造を形成し、天然のエンテロバクチンエステラーゼ酵素とは全く異なる立体構造であることを明らかにしました(図 1)。特に興味深いことに、Syn-F4 立体構造の中央付近に特徴的な穴が貫通していました。網羅的な変異実験により 5 つの残基 (Glu26, His74, Arg77, Lys78, Arg85) が酵素活性に必要であることが分かり[参考文献 4]、これらの 5 残基は全て Syn-F4 構造の中央部の穴の付近に位置し、活性部位を形成することが推定されました(図 2)。実際にこれらの変異体を作製することにより、これらの 5 残基が活性に必須であることを確認しました。また、分子動力学シミュレーションにより推定活性部位の動的特性が示唆され、さらに、ドッキングシミュレーションにより鉄エンテロバクチンが結合した構造を予測しました。以上の結果をもとに、新規人工酵素 Syn-F4 は、天然のエンテロバクチンエステラーゼのセリン残基を含む触媒三残基による反応機構とは異なり、グルタミン酸とヒスチジン残基による触媒二残基 (Glu26・His74) による反応機構であることが示唆されました。

本研究成果は、遺伝子欠損株の細胞内で機能的に相補可能な新規人工酵素の立体構造を解明した世界で初めての例と考えられます。

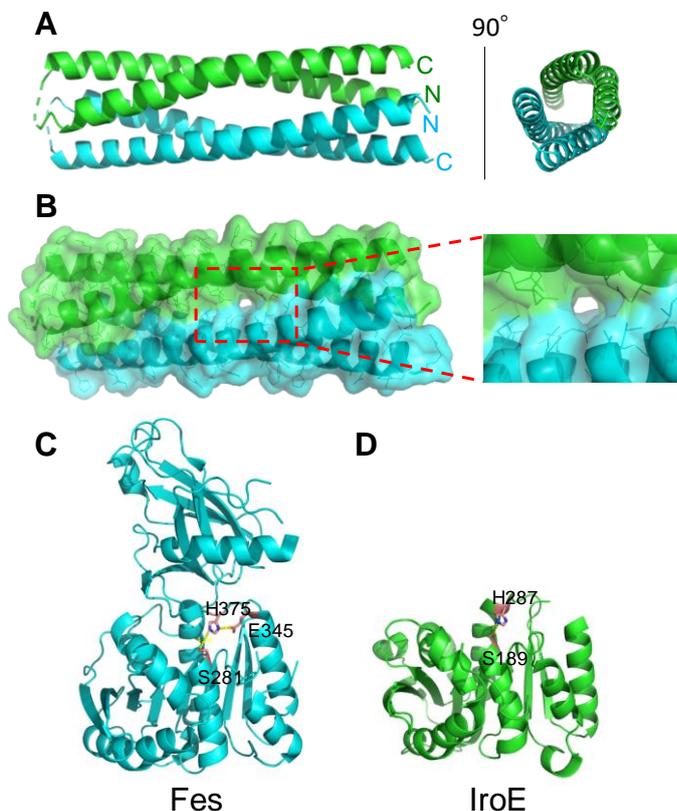


図 1 新規人工酵素 Syn-F4 の立体構造および構造比較

- (A) Syn-F4 全体構造のリボン表示図。
- (B) Syn-F4 全体構造の表面表示図。中心付近に貫通した穴が開いている。
- (C) 天然のエンテロバクチンエステラーゼ Fes の立体構造(PDB: 3C87)のリボン表示図。
- (D) 天然のエンテロバクチンエステラーゼ IroE の立体構造(PDB: 2GZR)のリボン表示図。

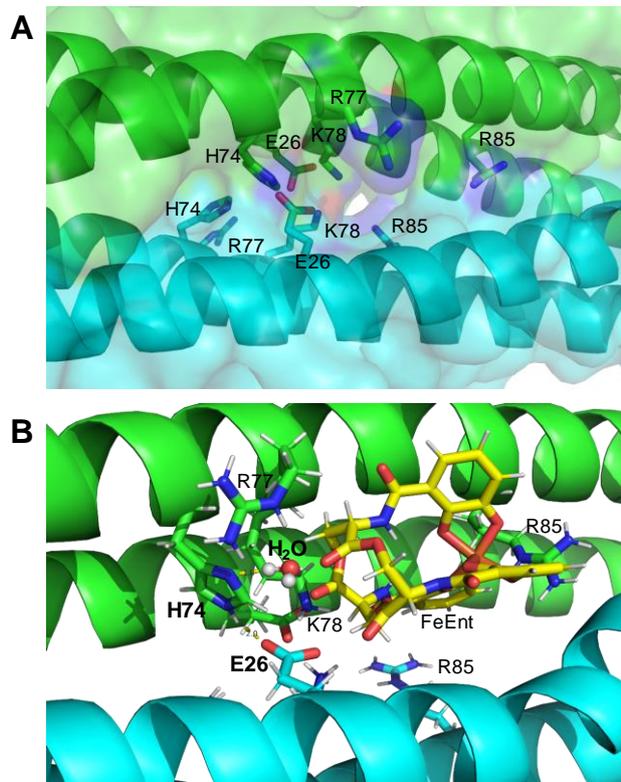


図2 新規人工酵素 Syn-F4 の推定活性部位構造
 (A) Syn-F4 の中央部付近の拡大図。棒状表示で示した活性に必須な 5 残基 (Glu26, His74, Arg77, Lys78, Arg85) はすべて中央部の穴の付近に存在している。
 (B) 基質の鉄エンテロバクチン(FeEnt)と Syn-F4 とのドッキングシミュレーション結果の例。加水分解反応機構を説明するために水分子を追加した。

4. 今後の展開

以上の研究成果は、Syn-F4 のような新規人工酵素が、天然の酵素と大きく異なる構造および機構で生命活動維持に必要な酵素反応の機能を担うことができる例を示しています。今後、今回得られた知見を基にして、人工タンパク質や人工酵素の可能性をさらに拡張することにより、さらなる新しい人工酵素や機能性人工タンパク質の設計創出につながり、タンパク質工学や合成生物学分野の発展や応用に寄与することが期待されます。

<謝辞>

本研究は、日本学術振興会科学研究費助成事業(JP24780097, JP16K05841, JP16H00761, JP17KK0104, JP19H02522)の助成を受けて行われました。また、放射光 X 線回折実験や散乱実験は高エネルギー加速器研究機構(KEK)放射光科学研究施設共同利用実験(2016G606, 2016G617, 2018G634, 2018G636, 2020G658)として フォトンファクトリービームライン BL-5A, BL-10C, AR-NW12A にて行われました。初期のサンプル調製や結晶化予備実験では、信州大学卒業生の山中竜一さんにも多大なご協力を頂きました。この場を借りて心より御礼申し上げます。

<原論文情報>

論文題名: Crystal structure and activity of a de novo enzyme, ferric enterobactin esterase Syn-F4

題名和訳: 新規人工酵素 Syn-F4 鉄エンテロバクチンエステラーゼの結晶構造と活性

著者: 栗原 航大¹, 梅澤 公二^{2,3}, Ann E. Donnelly⁴, Brendan Sperling⁴, Guanyu Liao⁴, Michael H. Hecht^{4*}, 新井 亮一^{1,2*} (*責任著者)

¹信州大学 繊維学部 応用生物科学科

²信州大学 先鋭領域融合研究群 バイオメディカル研究所 生体分子ノーベーション部門

³信州大学 農学部 農学生命科学科

⁴ Princeton University, Department of Chemistry

掲載誌: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America

Vol. 120, No. 38, e2218281120 (2023) DOI: [10.1073/pnas.2218281120](https://doi.org/10.1073/pnas.2218281120)

URL: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.2218281120>

立体構造データ: Protein Data Bank (PDB): 8H7C, 8H7D, 8H7E

<参考文献>

1. M. H. Hecht, A. Das, A. Go, L. H. Bradley, Y. Wei, De novo proteins from designed combinatorial libraries. *Protein Science*, **13**, 1711-1723 (2004).
2. M. A. Fisher, K. L. McKinley, L. H. Bradley, S. R. Viola, M. H. Hecht, De novo designed proteins from a library of artificial sequences function in *Escherichia coli* and enable cell growth. *PLoS One* **6**, e15364 (2011).
3. B. A. Smith, A. E. Mularz, M. H. Hecht, Divergent evolution of a bifunctional de novo protein. *Protein Science*, **24**, 246-252 (2015).
4. A. E. Donnelly, G. S. Murphy, K. M. Digianantonio, M. H. Hecht, A de novo enzyme catalyzes a life-sustaining reaction in *Escherichia coli*. *Nature Chemical Biology*, **14**, 253-255 (2018).

<用語説明>

※1 新規人工酵素

酵素は、生体でおこる化学反応に対して触媒（特定の化学反応の反応速度を速める物質で、自身は反応の前後で変化しないもの）として機能するタンパク質である。酵素は、消化・吸収・代謝などの生体内のあらゆる反応過程に関与しており、生きるために必要不可欠なタンパク質である。

新規人工酵素とは、天然タンパク質のアミノ酸配列をもとにしないで、新規に配列を設計創出した新規人工タンパク質^{※5}のうち、酵素の機能を有するものである。

※2 X線結晶構造解析

物質の三次元構造（立体構造）を決定するための実験的な手法の一つ。物質の結晶にX線を照射して得られる回折パターンデータをもとに計算及びモデル構築を行い、物質の立体構造を決定する。タンパク質の立体構造を原子レベルで求める代表的な方法の一つである。X線結晶構造解析法で立体構造を求めるためには、良質な単結晶の作製が困難な場合も多く、目的タンパク質の結晶化が実験の成否の鍵を握る非常に重要なポイントとなる。

※3 α ヘリックス

タンパク質の立体構造を構成する基本的な共通骨格構造の1つで、バネに似た右巻きらせん形状をしている。骨格となるアミノ酸のアミノ基は4残基離れたカルボニル基と水素結合を形成し、構造を安定化している。

※4 4本ヘリックスバンドル

4本の α ヘリックスを束ねた(bundle)形状のタンパク質構造（図1A参照）。疎水性残基を内側に配して4つのヘリックスが疎水性相互作用で安定化している例が多い。天然にも広く存在し、比較的単純な構造であることから、新規人工設計タンパク質のデザインターゲット構造としてもよく用いられてきた。

※5 新規人工タンパク質

天然タンパク質のアミノ酸配列をもとにしないで、新規に配列を設計創出した人工タンパク質。英語で *de novo protein* ということより、「デノボタンパク質」とも呼ぶ。

※6 バイナリーパターン法

バイナリーパターン法とは、タンパク質の表面には親水性アミノ酸、内側には疎水性アミノ酸が配置されるように、目的とする立体構造に応じてアミノ酸の配列パターンをデザインし、半合理的 (*semirational*) に新規人工設計タンパク質を創製する方法である。特に、親水性 (極性)、疎水性 (非極性) の2つの性質に着目してアミノ酸配列パターンをデザインすることより、バイナリーパターン法と呼ばれている。プリンストン大学化学科の Michael H. Hecht 教授の研究室等で主に研究開発されてきた。

※7 親水性アミノ酸

水に対して親和性を示す極性の側鎖を持つアミノ酸。水によくなじみ、水に溶けやすい性質を持つ。代表的なものは、荷電アミノ酸のアスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、リシン(リジン)、ヒスチジンや、中性アミノ酸のセリン、トレオニン(スレオニン)、システイン、アスパラギン、グルタミンなどである。水に溶けているタンパク質においては、タンパク質の表面上に、水とよくなじむ親水性アミノ酸が多く存在している。

※8 疎水性アミノ酸

水に対する親和性が低い非極性の側鎖を持つアミノ酸。水に比較的溶解しにくく、油のように水となじみにくい性質の側鎖を持つ。代表的なものは、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、トリプトファン、フェニルアラニン、プロリンなどである。水に溶けているタンパク質においては、水を避けるように、タンパク質の内側中心部に疎水性アミノ酸が集中し、疎水性アミノ酸同士の相互作用によりタンパク質の立体構造の安定性に重要な役割を果たしている。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、各社科学部等に送信させていただいております。

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

・研究内容についてのお問い合わせ先

信州大学 繊維学部応用生物科学科・バイオメディカル研究所生体分子ノーベーション部門
准教授 新井 亮一 (あらい りょういち)

TEL : 0268-21-5881 E-mail : rarai@shinshu-u.ac.jp

・本リリースの配信元

信州大学 繊維学部 総務グループ

TEL : 0268-21-5303 FAX : 0268-21-5318

E-mail : tex_koho@shinshu-u.ac.jp

Website: <http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/textiles/>