

研究成果概要

1. 研究課題

和 文	高酸素耐久性を持つ CO ₂ を CO へ還元可能な人工酵素の創製
英 文	Creation of highly oxygen-tolerant artificial enzyme converting CO ₂ to CO

2. 申請者名(代表研究者)

氏 名 藤城貴史	ローマ字表記 Takashi Fujishiro
所属大学・機関名 埼玉大学	英訳表記 Saitama University
研究科専攻名・部課名等 大学院理工学研究科	英訳表記 Graduate School of Science and Engineering
役職名 教授	英訳表記 Professor

3.研究目的、成果、今後の見通し

研究目的

昨今の地球温暖化や化石燃料消費からの脱却と行った SDGs 実現のための課題の1つとして、低炭素社会の実現が掲げられ、その基盤技術の「大気中の CO₂ の効率的な利用」の開発に注目が集まっている。このような背景を踏まえ、我々のグループでは、天然の生物が利用する CO₂ を CO へ変換する酵素「CO デヒドロゲナーゼ (CODH)」を参考に (図 1 a)、CODH の弱点である分子状酸素に対する化学的脆弱性を克服した「酸素耐久型の人工 CODH」の合成と、その触媒としての利用を目的として掲げ、研究を進めてきた (図 1 b)。

酸素耐久型の人工 CODH の合成アプローチとして、2つの手法を検討してきた。1つ目のアプローチは、CODH と、その進化的祖先となる酵素 Hybrid cluster protein (HCP) の活性部位の類似性に着目し、HCP に遺伝子工学的なアミノ酸置換変異を導入することで、CODH 型の活性部位を HCP に再現した HCP 変異型ベースの人工 CODH 型酵素の作成である (図 1 b 左図)。この場合、HCP が、CODH にはない"酸素耐久性"を持つことをそのまま生かすことができる。

また、もう1つの方法としては、CODH の活性部位が Fe-S クラスター骨格を有する点に注目し、より単純な小型の Fe-S クラスター含有タンパク質であるフェレドキシンに CODH の活性を再現する、"ミニチュア CODH"の合成である (図 1 b 右図)。この場合にも、HCP 同様にフェレドキシンが酸素存在下で精製可能である点を生かした分子設計が可能となっている。以下、これまでの進捗、成果について報告する。

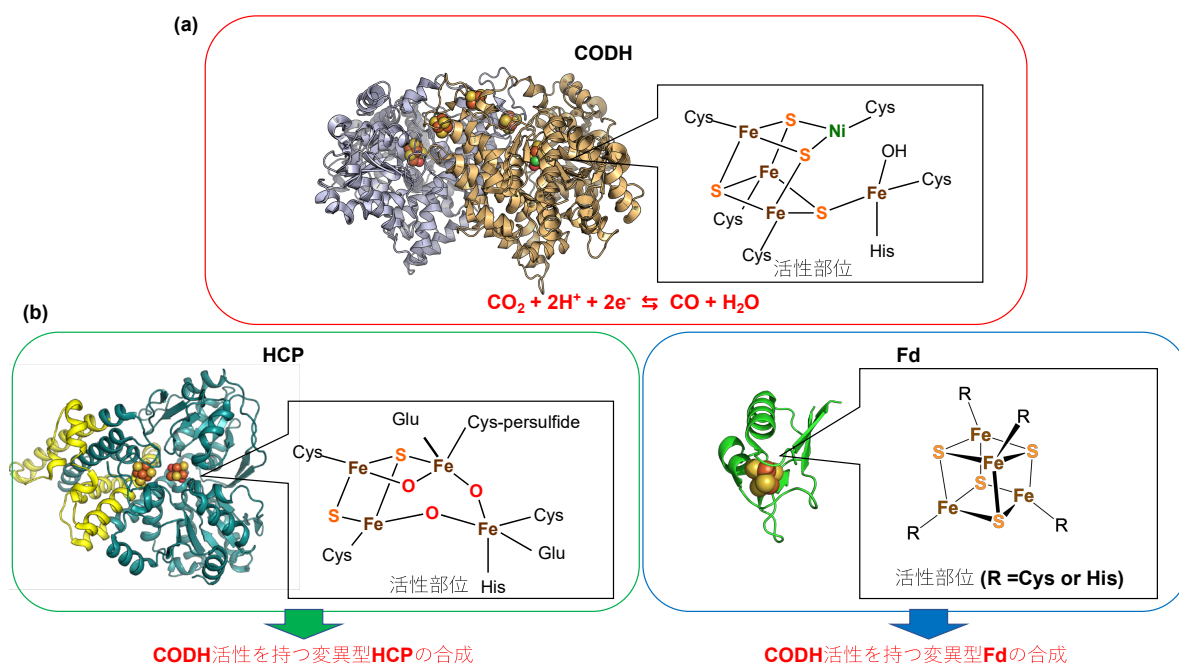


図 1. (a) CODH の全体構造と活性部位の構造、および、触媒する CO₂ の CO への還元反応。
(b) HCP の全体構造と活性部位の構造 (左図) と、Fd の全体構造と活性部位の構造 (右図)。
HCP と CODH は全体構造のトポロジーと活性部位の一部のアミノ酸残基が共通である。よって、両者の構造比較上、HCP にはなく、CODH にある残基に注目し、それらを HCP に変異導入することで CODH 活性を付与する。Fd の場合は、CODH の活性部位が部分的な [4Fe-4S] であることを参考に、Ni や CO₂ が結合できる反応場を変異により導入した Fd 変異型を作成する。

成果

(1) CODH を模倣した HCP 変異型の作成

HCP は $[4\text{Fe-2S-3O}]$ クラスター、CODH は $[\text{Ni-4Fe-4S}]$ クラスターを活性部位としており、これらの立体構造比較により、HCP と CODH で異なる金属配位子であるアミノ酸残基として、HCP のみが2つの Glu、1つの Cys を追加で有するという情報を抽出した。この情報をもとに、これら合計3つの残基の箇所を、CODH 型の残基へと置換した HCP 3重変異型 (1) の遺伝子を Polymerase chain reaction (PCR) により作成し、タンパク質発現プラスミドの形とした。また、 CO_2 が外界から HCP の活性部位に到達すると予想されるチャンネルにいくつか変異を導入した HCP 変異型 (= HCP の Lys 置換変異型 (2)、Leu 置換変異型 (3)、Phe 置換変異型 (4)、Ile 置換変異型 (5)) も、(1) と同様に発現プラスミドを構築した。HCP 野生型と変異型 (1)~(5) それぞれを、大腸菌組換え体として、好氣的条件 (酸素を含む大気下) で発現、精製した。精製の結果、変異型 (1) は不安定であり、活性部位の評価を行うための EPR 測定に必要となる高濃度サンプルの調製が困難であった。一方、他の HCP は、EPR 測定を行なったところ、変異型 (3) がもっとも野生型とは異なるシグナルを与え、活性部位が少なくとも HCP 野生型とは異なる性質を持つことが示唆された。

(2) フェレドキシンを用いたミニチュア CODH の作成

$[4\text{Fe-4S}]$ クラスターを1つだけ持つ好熱性菌由来のフェレドキシン (Fd) の立体構造情報を基に、クラスター周辺の残基に変異を導入することで、Ni イオンおよび CO_2 がクラスターに結合しやすいような極性環境を備えつつ、Ni イオンや CO_2 、CO など小型の分子が出入り可能な空間を確保する Fd 変異型を *in silico* 設計した。この設計に基づき、PCR 法により、Cys の代わりに His を配位子となるようにした Fd 変異型 (6)、His を活性部位近傍のループに導入した Fd 変異型 (7)、His を活性部位表面に導入した Fd 変異型 (8) を、それぞれ大腸菌で発現、好氣的条件 (酸素を含む大気下) で精製した。精製した Fd 変異型の結晶化、および X 線結晶構造解析を行い、活性部位クラスター周りの構造について評価した。その結果、変異型 (6) は、 $[4\text{Fe-4S}]$ の代わりに、3つの Cys を配位子とした $[3\text{Fe-4S}]$ クラスターが生じ、導入した His 周辺には小型の分子が取り込めるような空間が生じていた。変異型 (7) は、微結晶は得られたものの、X 線回折が不十分であり、その構造解析には至らなかった。変異型 (8) は、 $[4\text{Fe-4S}]$ クラスターを維持しつつ、導入した His 周辺には小型の分子が取り込めるような空間と、水分子を取り込めるだけの極性環境があることが明らかとなり、最も CODH 活性が期待できる結果といえた。

今後の見通し

(1) のアプローチでは、現在、CODH 活性評価のための反応条件の検討と、X 線結晶構造解析による変異型の構造評価を行なっている。また (2) のアプローチでは、構造解析により変異型 (8) が、CODH 活性を期待できる Fd 変異型であったため、今後は、実際にその変異型に Ni イオンを添加し、 CO_2 を飽和させた反応液での CODH 活性を評価する予定である。