

令和6年11月21日

金属-テトラピロール補酵素を生合成する酵素の基質選別の仕組みを理解し、 その仕組みを変えた人工酵素を用いて非天然型のニッケル補酵素を創る！

概要

埼玉大学の藤城貴史教授の研究グループは、ヘムやビタミン B₁₂ などの「金属-テトラピロール」補因子群の生合成酵素「キラターゼ」の祖先型と知られる CfbA が、その活性部位の 11 番目のセリン (Ser11) の周辺で、基質テトラピロールを選別する仕組みを、X 線結晶構造解析により明らかとしました。また、Ser11 を別のアミノ酸であるトレオニン (Thr) に置換した CfbA 変異型酵素は、野生型 CfbA では利用できない非天然のテトラピロールを基質として利用できるようになることを見出し、この人工の変異型酵素を用いて非天然型ニッケル補酵素を作ることに成功しました。

本研究は、生命に必須の「金属-テトラピロール補因子群」と、CfbA を含めた「II 型キラターゼ酵素群」の補因子-酵素の共進化プロセスの検証を可能とすると共に、この知見を生かした様々な人工金属補因子を合成する酵素触媒システムの構築において、分子レベルでの設計指針を提供します。

本成果は、タンパク質科学の最大の国際学術団体である The Protein Society の機関紙『Protein Science』に、オンライン速報版として 2024 年 11 月 15 日に公開されました。

(URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pro.5208>)

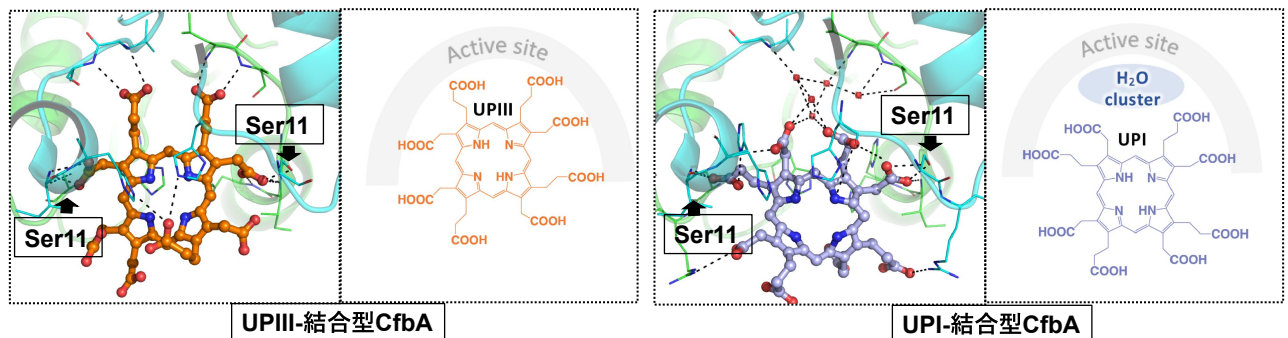


図 1. CfbA がテトラピロール UPIII、UPI を結合した状態の活性部位の構造

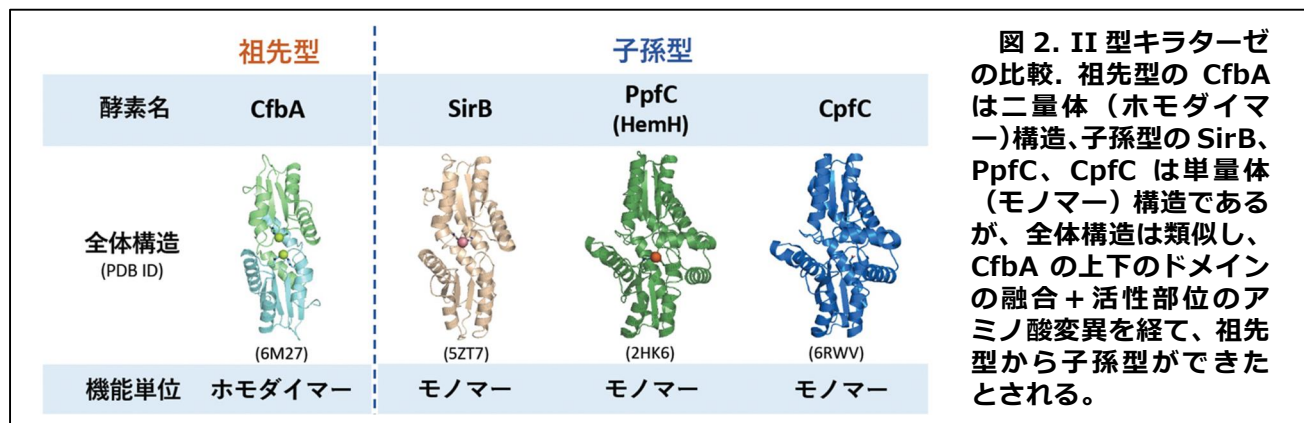
【ポイント】

- ・ CfbA はニッケル-テトラピロール補酵素 F430 の生合成系で金属錯体構造を作る酵素であり、ニッケル、鉄、コバルトなどの利用が知られる「金属-テトラピロール」補因子群の生合成酵素「II 型キラターゼ生合成酵素ファミリー」の祖先型として知られる。
- ・ 今回、天然の基質に類似し、基質となる UPIII、基質とならない UPI と CfbA との複合体の X 線結晶構造解析により、CfbA の基質選別機構を調べた。
- ・ その結果、CfbA の活性部位の Ser11 周辺構造 がもたらす親水性相互作用により、UPIII、UPI がそれぞれ異なる配置で CfbA に結合することを見出した (図 1)。
- ・ さらに、Ser11 を Thr に人工的に変異させた CfbA 変異型酵素は、野生型が基質として利用しない CPI を利用できる ことを見出した。
- ・ 本研究で得られた知見は、この祖先型 CfbA を進化の起点とした、他のテトラピロール補因子とキラターゼ酵素の共進化過程の検証や、新たな人工金属補因子合成のための酵素触媒系の構築に役立つと期待される。

PRESS RELEASE

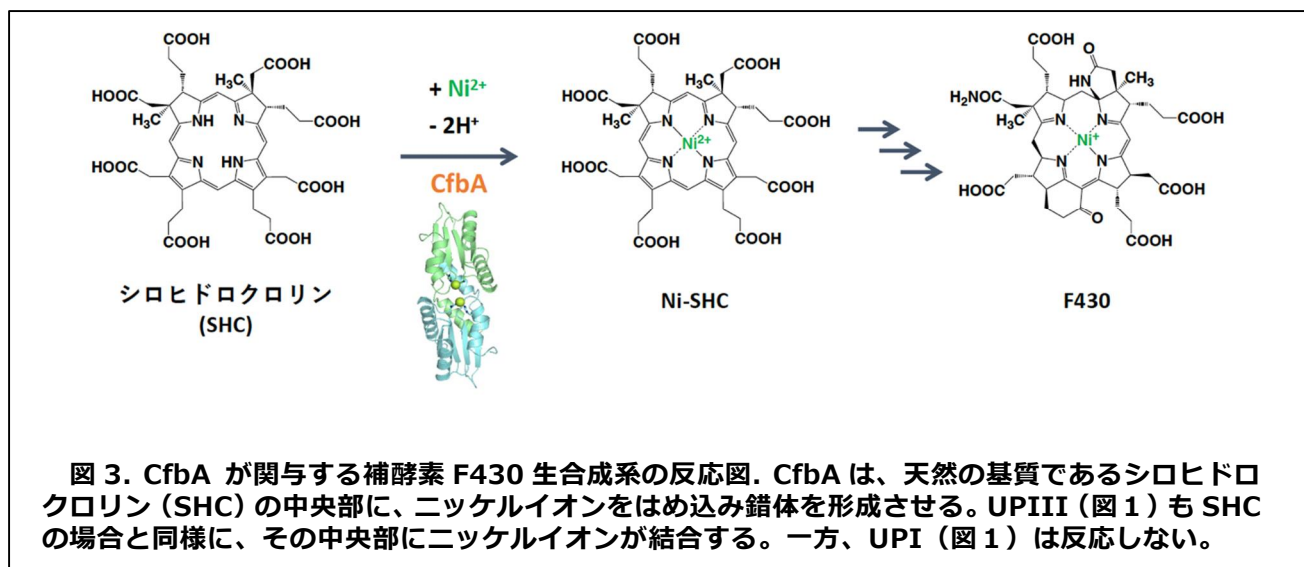
【研究の背景】

金属-テトラピロール型の補因子群は、ヒトの血液中のヘモグロビンのヘム（鉄）や、ビタミン B₁₂（コバルト）などが知られ、生命に必要不可欠です。この補因子群は、金属の種類によって反応性が大きく変わるため、金属をテトラピロールに錯体化させる「キラターゼ」酵素の仕組みの理解は生命と金属の関わり方の理解に向けて、重要な研究課題の1つとなっています。



我々は、最も多様な種類が知られる"II 型"の「キラターゼ」に注目し（図 2）、その祖先型の CfbA に着目して研究を進めてきました(Fujishiro, *et al. Chem. Sci.* 2021)。CfbA は、メタン生成古細菌に必須のニッケル-テトラピロール補酵素"F430"の生合成系で、F430 の前駆体ニッケル-テトラピロールである「Ni-SHC」を組み立てます（図 3）。CfbA は二量体の形状を取り、活性部位は対称的かつアミノ酸側鎖がごくわずかであり、単純な構造の活性部位を持ちます。一方で、ヘムの生合成には子孫型の「キラターゼ」（例：PpfC、CpfC）などが用いられますが、これらは CfbA とは異なり、単量体で非対称かつ多くのアミノ酸側鎖を含む複雑な活性部位を持ち、これらアミノ酸は基質テトラピロールの選択性に重要です。

活性部位の違いから、より単純な構造の活性部位を持つ CfbA が基質選別をするのは難しいと予想されました。しかし実験の結果、CfbA は基質テトラピロールを選別できることが示されました (Liptak, *et al. Dalton Trans.* 2020)。しかし、CfbA がどのように基質選別を行うかは不明であり、この基質選別の仕組みを明らかにすることにより、キラターゼ酵素群の祖先型から子孫型への進化過程における、アミノ酸の変異の入り方（アミノ酸の変遷）と基質選択性との関連性の解明が望まれています。



【研究結果】

本研究では、X線結晶構造解析により、種々の非天然型テトラピロールが CfbA に結晶内で活性部位に結合し、基質として酵素に認識されるかどうかを検証しました。その結果、天然の基質 SHC と同じ数のカルボキシ基を持ち、SHC に近い親水性を持つ UPIII、UPI の2つのテトラピロールが CfbA の活性部位に取り込まれることを見出しました。しかし、UPIII、UPI の両者の結合位置は異なり、UPIII は天然基質の SHC と同じ位置となるのに対し、UPI は活性部位の入り口側に寄った位置となりました。この結果は、UPIII は CfbA により基質として利用されるのに対し、UPI は利用されないことを示しており、実際に溶液中、UPIII のみが基質となることを確認しました。

また、興味深いことに、UPI の結合した活性部位の奥には水分子のクラスター構造が見られ、この水分子を介した水素結合ネットワークが UPI の固定化に寄与していました。また、SHC、UPIII、UPI で共通の固定化の仕組みとして、活性部位内部で左右対称的な位置に配置された Ser11 が、SHC/UPIII と UPI で位置が異なるにも関わらず、テトラピロールに水素結合を行い、その取り込みを"選別"している様子が見られました。

この CfbA の基質選別の Ser11 周辺構造の重要性を検証するため、Ser11 をいくつかのアミノ酸残基に置換した CfbA 変異型を作成しました。すると、Ser11 を Thr に変化させた CfbA S11T 変異型が、野生型 CfbA が用いないテトラピロール CPI を基質として利用できることが分かりました。これは、たった1箇所の変異 (S11T) により、祖先型の CfbA を人工的に分子進化させることができたとも見なせます。また、この結果は、CfbA S11T 変異型を用いることで、新たに Ni-CPI 人工補酵素の酵素による合成系を構築したとも言えます。

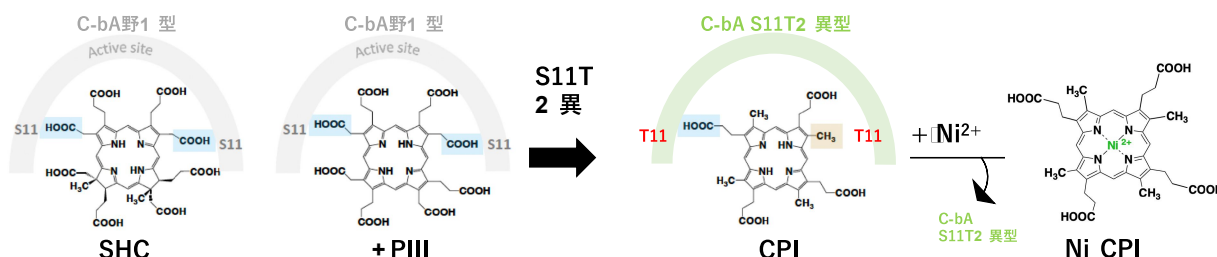


図 4. CfbA 野生型の Ser11 を Thr に変異させた S11T 変異型が CPI を利用可能になる模式図.

【今後の展望】

祖先型キラターゼである CfbA で、その単純な構造の活性部位中、たった1箇所の変異で基質選択性が変わるという事実を鑑みると、キラターゼの祖先型から様々な子孫型への分子進化では、より多くの変異が活性部位に入って、それぞれ適材適所のテトラピロール選択性を獲得して行っただろうことが想像できます。今後は、試験管内での CfbA 人工進化により、天然のキラターゼ様の活性や基質選択性が得られるか、また、その際どのような変異が入っていくかを検証していく予定です。また、CfbA やその類似の酵素ファミリーの酵素を選別し、多種多様な変異を組み合わせることで、天然の補酵素を超えた高機能（高い触媒活性や化学的安定性）を備えた人工補酵素の合成にも挑戦していきます。

【原論文情報】

掲載誌 Protein Science

論文名 Structural insights into the recognition of tetrapyrrole substrates by ancestral class II chelatase CfbA

著者名 Shoko Ogawa, Masahide Hikita, Takashi Fujishiro

DOI 10.1002/pro.5208 (URL: <https://doi.org/10.1002/pro.5208>)

【研究支援】

JSPS 学術変革(A)生合成リデザイン (to T.F.)、学術変革(A)予知生合成 (to T.F.)、埼玉大学戦略研究センター重原子利用研究グループ (to T.F.)、公益財団法人日本科学協会 笹川科学研究助成 (to S.O.)

【研究内容に関する問い合わせ先】

国立大学法人埼玉大学 大学院理工学研究科 教授 藤城貴史

【用語解説】

- (a) 金属-テトラピロール補因子群: 4つのピロールが連結して環状になり、その中央の穴に金属イオンが結合して金属錯体となった構造を持つ補因子の総称。鉄を含むヘムや、コバルトを含むビタミン B₁₂、マグネシウムを含む葉緑体の緑色色素クロロフィルなどが有名。
- (b) 補酵素 F430: 金属-テトラピロール補因子群の1つであり、ニッケルを中心金属とし、メタン生成古細菌、嫌氣的メタン酸化古細菌のメタン代謝系酵素 Methyl-coenzyme M reductase の活性部位に利用される。
- (c) II型キラターゼ: 金属-テトラピロール補因子群の生合成反応系において、テトラピロールに金属イオンを挿入することで金属-テトラピロール錯体を作る「キラターゼ」酵素のうち、ATP を用いず、キラターゼ機能のみを持つ酵素群。他にI型キラターゼ(ATP 依存型キラターゼ)、III型キラターゼ(ATP 非依存かつキラターゼ活性以外の他の触媒能も有するキラターゼ)も存在する。