助成番号　210869	５－２

研 究 成 果 報 告 書

研究テーマ（和文）	立体分岐型合成を実現するタンパク質配位子ライブラリーの創製		
研究テーマ（英文）	Protein ligand library toward stereodivergent synthesis		
研究期間	2021年 ～ 2022年	研究機関名　大阪府立大学	
研究代表者	氏名（漢字）	藤枝 伸宇	
	氏名（カタカナ）	フジエダ ノブタカ	
	氏名（英文）	Nobutaka Fujieda	
	所属機関・職名	大阪府立大学大学院生命環境科学研究科	
共同研究者（１名をこえる場合は、別紙追加用紙へ）	氏名（漢字）		
	氏名（カタカナ）		
	氏名（英文）		
	所属機関・職名		

概要　（600 字～800 字程度にまとめてください。）

我々は金属イオンをタンパク質に直接配位させることで、簡便に人工金属酵素を構築する手法を開発した。超好熱菌由来のクピンタンパク質に着目し、様々な遷移金属イオンを導入することで多様な触媒活性を見出してきている。本研究では、C-C 結合形成反応の一つであるマイケル付加反応をモデル反応とし、ステップワイズな変異導入による反応場の精密制御と高立体選択的な生成物の作り分けを目指した。第１段階として、ヒスチジン２つとカルボン酸を側鎖に持つアミノ酸１つから構成される金属結合部位を導入した。この結合部位は天然の非ヘム金属酵素における鉄配位モチーフとして知られる。ドナーとしてアセト酢酸メチル、アクセプターとして 2-アザカルコンを用いることで４つの立体異性体が生じるマイケル付加反応においてスクリーニングを行った。その結果、グルタミン酸導入変異体において *anti* 体におけるエナンチオマー過剰率が 96 %を達成した。3-His モチーフである変異体を用いた場合では 80 %であり、16 %選択性が向上した。また、X 線結晶構造解析により、銅イオンには導入したグルタミン酸が配位しており 2-His-1-Carboxylate Facial Triad 構造をとっていることも確認できた。第２段階として、第二配位圏への変異導入を試みた。この変異体ではアザカルコンの Si 面側への求核攻撃による生成物が優勢であったため、フェニルアラニンをトリプトファンに変異させることで、90 %と高いエナンチオマー過剰率を維持しながら、ジアステレオ選択性を 71 %まで向上させることに成功した。この変異体についても X 線結晶構造解析を行った結果、2-アザカルコンが銅イオンに配位するだけでなく、導入されたリプトファンが立体障害となり、高い立体選択性を生み出していると考えられる。

発表文献 （この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）

雑誌	論文課題	An Artificial Metallolyase with Pliable 2-His-1-Carboxylate Facial Triad for Stereoselective Michael Addition				
	著者名	Ryusei Matsumoto, Saho Yoshioka,	雑誌名	*Chemcal Science*		
	ページ	3932～3937	発行年	２　０　２　３	巻号	14
雑誌	論文課題					
	著者名		雑誌名			
	ページ	～	発行年		巻号	
雑誌	論文課題					
	著者名		雑誌名			
	ページ	～	発行年		巻号	
図書	書名					
	著者名					
	出版社		発行年		総ﾍﾟｰｼﾞ	
図書	書名					
	著者名					
	出版社		発行年		総ﾍﾟｰｼﾞ	

英文抄録 （100 語～200 語程度にまとめてください。）

The metal-binding cupin superfamily protein was converted into easy-to-use macromolecular ligands with the aim to create of the promising methods for constructing artificial metalloenzymes. This protein can bind various transition metals including the heavy and precious metals. To develop diastereo- and enantio-selective reactions, we have attempted to use the library-like mutant-series of a cupin type protein as one of the useful screening strategies. By using this method, we have created efficient biocatalysts by harnessing the copper-containing protein for diastereo- and enantio-selective Michael addition reaction of nitroalkanes to an α,β-unsaturated ketone. In this project, we repurposed the metal-binding site of a cupin superfamily protein into the 2-his-1-carboxylate facial triad, which is one of the common motifs in natural non-heme enzymes, to construct artificial metalloenzymes that can catalyze new-to-nature reactions. H52A/H58E mutant that catalyzes the stereoselective Michael addition reaction was found to contain a flexible metal-binding site in the high-resolution crystal structure. Moreover, the H52A/H58E/F104W variant accommodated one water molecule between nitrogen atom of Trp104 indole moiety and a carboxylic oxygen atom of Glu58, possibly leading to high stereoselectivity.