

合成化学と理論計算の融合を起爆剤とする 精密設計タンパク質工学の開拓

佐藤 浩平^{*1}堀 優太^{*2}

Exploration of Precise Protein Engineering through the Fusion of Synthetic Chemistry and Theoretical Calculation

Kohei SATO^{*1} and Yuta HORI^{*2}

Using fluoroacetate dehalogenase (FACD) from *Rhodopseudomonas palustris* as a model for the activation of fluoroacetic acid, DFT calculations identified key amino acids that influence the activity. Substitution of Trp156 and Tyr141 with non-canonical amino acids reduced the activation energy and improved the enzyme activity. Towards the total chemical synthesis of FACD, a novel aspartic acid hydrazide derivative was developed to improve the peptide fragment synthesis. This research establishes a foundation for designing proteins with non-canonical structures, advancing precision protein engineering for environmental and industrial applications. Future work will focus on the synthesis and evaluation of high-activity FACD variants.

1. 研究背景と目的

タンパク質工学は有用なタンパク質を設計し創り出そうとする学問分野であり、医薬分野、工業分野などで広く応用されている。タンパク質は20種類のアミノ酸をモノマーとする生体高分子であり、従来のタンパク質工学はこれらモノマーの種類と配列を変更することで望む機能をもつ人工タンパク質を創り出してきた。もし、20種類以外のモノマーを構成素子として利用できれば、未踏の機能を有する人工タンパク質の創出が期待できる。しかし、タンパク質調製法の主流である遺伝子工学的手法では天然アミノ酸以外を組み込むことは困難である。また、どこにどのような官能基を導入すれば望む機能を実現できるかを予測することは容易ではない。そこで、これらの課題を克服し、人工タンパク質を精密に設計・合成するための新戦略確立を最終目標に研究に取り組んだ(図1)。

本研究では、*Rhodopseudomonas palustris*から単離されたフルオロ酢酸デハロゲナーゼ (FACD)^{1,2)}の機能改変をモデルケースとして扱った。FACDは極めて安定なC-F結合を生理的条件下で切断可能な酵素であることから、環境・産業分野における有機フッ素化合物分解への応用が期待されている。しかし、フッ素置換数が増えたジフルオロ酢酸 (DFA) あるいはトリフルオロ酢酸 (TFA) に対する分解活性は低く、報道でも頻繁に取り上げられている有機フッ素化合物 (PFAS) の分解に直接適用することは困難である。そのため、FACDの酵素活性を向上させフッ素置換数が増えた基質に対しても酵素分解可能になれば、環境に優しい脱フッ素化酵素の設計に貢献できると考えた。そこで、①非天然アミノ酸構造も含む多様な構造セットから加水分解反応の量子化学計算を実施することで高活性酵素を設計し、②設計した酵素を合成した後、③合成品の加水分解活性を評価して、必要に応じて①の設計に評価結果をフィードバックすることを計画した。この①～③のサイクルを回すことで未踏タンパク質機能の創出を実現するために、本研究課題では、量子化学計算による酵素反応機構解析と高活性酵素中心のデザイン、および酵素化学合成について検討した。

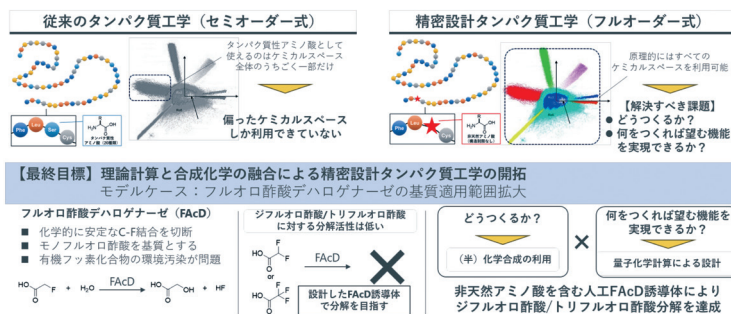


図1 研究目的。

2025年2月27日 受理

^{*1} 静岡大学大学院総合科学技術研究科工学専攻^{*2} 筑波大学計算科学研究センター

2. フルオロ酢酸加水分解反応の量子化学計算と高活性酵素中心のデザイン

まず, FAcDによるフルオロ酢酸加水分解の量子化学計算を実施した. FAcDの結晶構造から酵素活性中心を切り出しモデル化した(図2). 先行研究で提案されているいくつかの反応経路をもとにフルオロ酢酸の加水分解反応経路を探索した³⁾. 量子化学計算は, 密度汎関数理論(DFT)を用い, B3LYP-D3/6-31G(d,p)の計算レベルで行った. また, 活性中心まわりのタンパク質環境が電子状態に与える影響を考慮するために, 誘電率($\epsilon=4$)を持つ連続誘電体モデルによる溶媒効果を取り入れた.

計算により得られたポテンシャルエネルギーダイアグラムを図3に示す. 計算によりこの反応は, 「C-F結合開裂」, 「求核攻撃」, 「C-O結合開裂」の過程に分けられることがわかった. 第一段階のC-F結合開裂では, Asp110のカルボキシル基が基質であるフルオロ酢酸の炭素を攻撃することにより, C-F結合が開裂し, Asp110と基質が結合を形成する. そのエネルギー障壁は21.1 kcal/molとなった. 次に, 水によるAsp110のカルボキシル基への求核攻撃に伴い, C-O結合の開裂が生じることにより, 最終的にグリコール酸が得られる. 各ステップのエネルギー障壁はそれぞれ, 14.8 kcal/molと14.7 kcal/molであった.

第一段階のC-F結合開裂反応の活性化エネルギーが大きいことから(21.1 kcal/mol), この反応の活性化エネルギーを低下させることができれば反応全体を加速できるのではないかと考えられる. そこで, フルオロ酢酸の加水分解を行う新規の触媒をデザインするために, C-F結合開裂反応の活性化エネルギーを指標として酵素活性中心の設計へと展開した. 上述の反応機構解析の結果から, C-F結合開裂反応の中でTrp156とTyr141の側鎖官能基による水素結合が系の安定化に大きく寄与する可能性が示唆された. そこで, Trp156およびTyr141を水素結合能に影響しうる非天然型アミノ酸に置換した際の活性化エネルギーをDFT計算により求めることで, 非天然アミノ酸を含む高活性酵素誘導体の設計に取り組んだ.

非天然アミノ酸の構造セットを選択するうえで, 実際に設計した誘導体を合成することを考慮して, 固相合成に適用可能な保護体として市販されている化合物の中からTrp誘導体3種類(Trp(5-Cl), Trp(6-Cl), Trp(7-Cl)), Tyr誘導体2種類(Tyr(3-NO₂), Tyr(4-NH₂))の計5種類を選定した. 当該アミノ酸の側鎖構造をそれぞれの非天然型誘導体に置換したモデルを作成し, 各モデルによるC-F結合開裂反応の活性化エネルギーを求めた(図4). その結果, 野生型と比較してTrp156をTrp(5-Cl)に置換した際に活性化エネルギーが低下することが明らかとなった. また, Tyr141に対しては, Tyr(3-NO₂)に置換した際に活性化エネルギーが減少し, 野生型と比較して有利に反応が進行する可能性が示唆された. 以上のように, 非天然型側鎖を有する酵素活性中心モデルにおいて, 野生型を上回る反応性を示す可能性のある候補構造を特定するに至った.

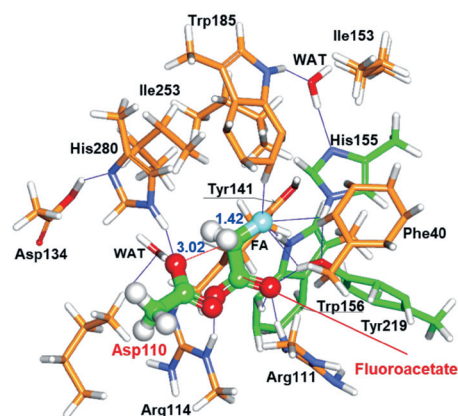


図2 計算モデル.
FAcDの活性中心として, Phe40, Asp110, Arg111, Arg114, Asp134, Tyr141, Ile153, His155, Trp156, Lys181, Trp185, Tyr219, Ile253, His280を採用.

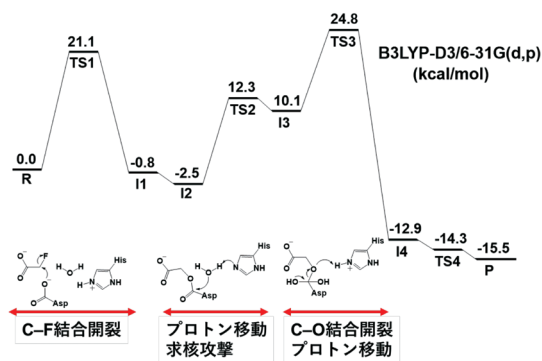


図3 FAcDによるフルオロ酢酸加水分解反応のポテンシャルエネルギーダイアグラム.

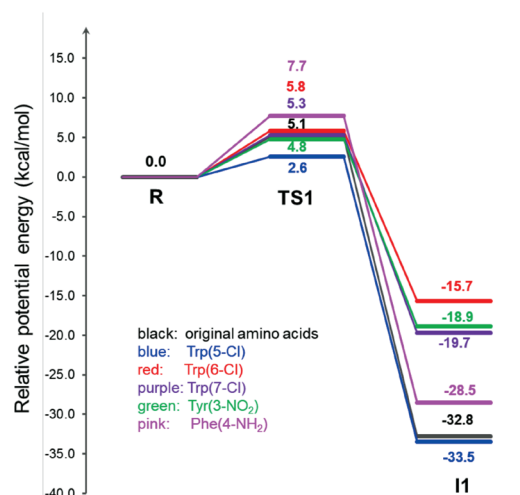


図4 FAcDの活性中心に含まれるTrp156とTyr141を非天然アミノ酸に置換した際のフルオロ酢酸のC-F結合開裂のエネルギーダイアグラム.

3. FAcD化学合成の検討

タンパク質の化学合成は、固相担体上でのアミノ酸のステップワイズな縮合により調製したペプチド鎖を液相にて化学選択的に縮合することで達成される。固相合成で調製可能なペプチド鎖は50残基程度が限界とされていることと、今回標的とする*R. palustris*由来のFAcDが302残基のアミノ酸からなることから、6つのペプチド鎖の連結により合成する経路を立案した(図5A)。連結法として、ペプチドチオエステルとN末端システイン含有ペプチドを中性水溶液中で連結可能なnative chemical ligation (NCL) 法を利用することとし⁴⁾、ペプチドチオエステルは安定前駆体であるヒドラジドとして合成した。

まず、各ペプチド鎖の合成に取り組んだ。マイクロ波加熱条件下で各ペプチドの固相合成を実施し、縮合条件と最終脱保護条件を精査した結果、FAcD₅₅₋₁₁₂を除く5つのペプチドについて合成条件を最適化することに成功した(図5B)。FAcD₅₅₋₁₁₂については、アスパラギン酸側鎖と主鎖ペプチド結合窒素原子間で環化したアスパルチミドが副生して収率が低下することが明らかとなった。アスパルチミド抑制法として、固相合成時のピペリジン処理時にOxymaPureを添加する条件が知られている。この条件をFAcD₅₅₋₁₁₂合成に適用したが、ピペリジンによるFmoc基除去効率が低下して収率向上には至らなかった。そこで、アスパルチミド形成を抑制するための新規手法確立に着手した。

アスパラギン酸側鎖は一般的にエステル誘導体として保護され、最終脱保護条件で容易に脱保護されカルボン酸を与える。エステルでは保護基としての安定性が不十分なためにアスパルチミド体が副生することから、より安定なアミド誘導体が有望な候補となりうる。しかし、アミド誘導体は高い安定性のために、合成後にカルボン酸に変換する際に厳しい反応条件を必要とする。ヒドラジドはアミド誘導体の一種であり高い安定性を示す一方で、銅(II)イオン存在下水中で処理すると容易に酸化的加水分解が進行し対応するカルボン酸を与える。そこで、アスパラギン酸側鎖保護基としてヒドラジドを利用する新規誘導体開発に取り組んだ(図6A)⁵⁾。アスパラギン酸ヒドラジド誘導体をアスパラギン酸から3ステップ

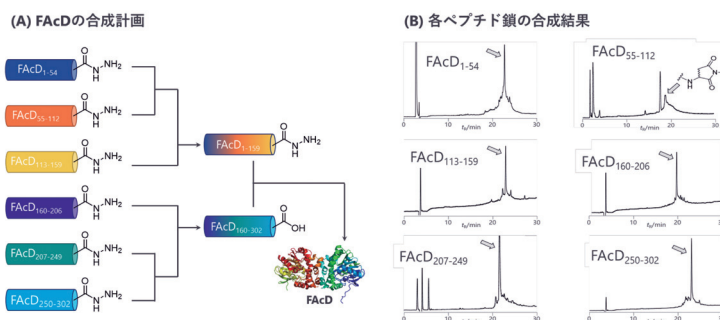


図5 FAcDの合成計画と各ペプチド鎖の合成結果。

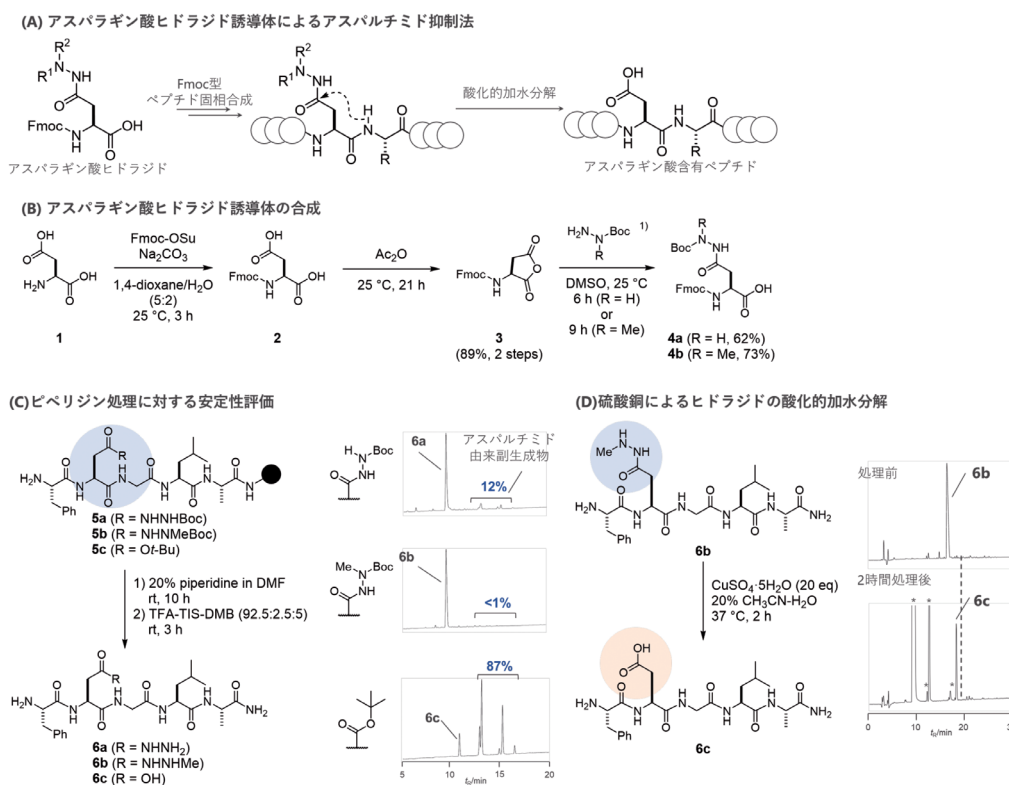


図6 アスパラギン酸ヒドラジドを利用するアスパルチミド抑制法。

総収率55–65%で合成した(図6B)。この誘導体を導入したモデルペプチド合成し、ピペリジン処理に対する安定性を評価したところ、従来の*tert*-Buエステル誘導体では87%がアスパルチミド由来の副生成物に変換されるにもかかわらず、メチルヒドラジド誘導体を用いることで99%以上が残存することが明らかとなった(図6C)。また、アスパラギン酸ヒドラジド含有ペプチドをCuSO₄を含む水溶液中で処理すると、ヒドラジドの加水分解が進行し対応するアスパラギン酸含有ペプチドが高収率で得られた(図6D)。さらにこの反応は、C末端ヒドラジド共存下においても1当量の硫酸銅を用いることで側鎖選択的に進行することが明らかとなった。以上の結果を踏まえて、FAcD₅₅₋₁₁₂の合成にアスパラギン酸ヒドラジド誘導体を適用したところ、固相合成後のペプチド粗生成物の純度が大幅に向上し、所望のペプチド鎖を得ることに成功した(図7A)。

続いてペプチド連結反応の検討を実施した。合成効率を最大化するために収束的な連結スキームを採用した。まず、C末端側3フラグメントの連結反応を検討し、連結する順序を最適化することでC末端側フラグメントFAcD₁₆₀₋₃₀₂の合成を達成した(図6B右)。N末端側フラグメントの合成では、ヒドラジドからチオエステルへの変換反応時に副反応が確認されたが、反応時のpHを最適化することで副反応の回避に成功した。この条件を用いて3成分の連結を試みたところ、所望のN末端側フラグメントFAcD₁₋₁₅₉の生成が確認された(図6B左)。現在最後の連結反応について検討を加えているところである。

4. まとめ

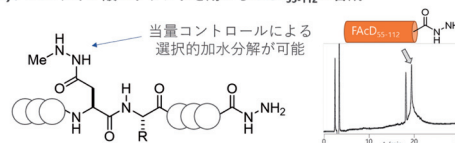
本研究では、理論計算と合成化学の融合による精密設計タンパク質工学の開拓を目指して、FAcDの酵素反応機構解析、高活性酵素中心の設計、酵素完全化学合成について検討した。DFT計算によりフルオロ酢酸加水分解反応をトレースした結果、反応エネルギーダイアグラムの作成と各反応で重要な役割を果たすアミノ酸官能基の特定が可能となった。また、C-F結合開裂反応の活性化エネルギーを指標として、Trp156とTyr141の非天然構造モデルを対象に計算することで、野生型よりも有利に反応が進行する可能性のある誘導体候補を提案した。さらに、これら誘導体合成を進めるための基盤として野生型酵素の完全化学合成に取り組み、N末端側およびC末端側フラグメントの合成まで達成した。

今後FAcDの化学合成経路が確立されれば、理論計算により活性向上が示唆された誘導体を実際に合成して酵素活性評価へと展開する。本成果は、非天然構造を含むタンパク質の設計・合成を可能とする精密設計タンパク質工学開拓のための基盤技術となるものである。

REFERENCES

- 1) T. H. Kim, P. Mehrabi, Z. Ren, A. Sljoka, C. Ing, A. Bezginov, L. Ye, R. Pomès, R. S. Prosser and E. F. Pai, *Science*, **355** (2017) eaag2355.
- 2) P. W. Y. Chan, A. F. Yakunin, E. A. Edwards and E. F. Pai, *J. Am. Chem. Soc.*, **133** (2011) 7461-7468.
- 3) Y. Yue, J. Fan, G. Xin, Q. Huang, J. Wang, Y. Li, Q. Zhang and W. Wang, *Environ. Sci. Technol.*, **55** (2021) 9817-9825.
- 4) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis and S. B. H. Kent, *Science*, **266** (1994) 776-779.
- 5) K. Sato, H. Uemura, T. Narumi and N. Mase, *Org. Lett.*, **26** (2024) 4497-4501.

(A) アスパラギン酸ヒドラジドを用いるFAcD₅₅₋₁₁₂の合成



(B) N末端側およびC末端側フラグメントの合成

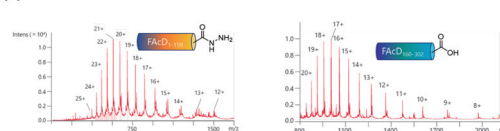


図7 FAcD N/C末端側フラグメントの合成。