

立体分岐型マイケル付加反応を目指した人工金属酵素の創製

(阪府大院生命) ○松本隆聖・吉岡紗穂・丸毛智史・湯浅美穂・藤枝伸宇¹

Development of artificial metalloenzymes toward stereodivergent Michael addition reactions
(Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University)

○Ryusei Matsumoto, Saho Yoshioka, Tomohito Marumo, Miho Yuasa, Nobutaka Fujieda

Lately, artificial metalloenzymes have garnered significant interest as emerging hybrid catalysts, the integration of chemical catalysis and biocatalysis. TM1459 from *Thermotoga maritima* has high thermal stability and contains a metal binding site consisting of 4-histidine motif. By using this protein as metal ligands, we have recently developed the artificial metalloenzymes. In this study, we attempted to construct enzymes with high stereoselectivity by mutating four histidines at this metal binding site. We screened thus obtained library of mutants in the asymmetric Michael addition reaction, and showed high stereoselectivity when several mutants were used.

Keywords : Artificial Metalloenzymes, Macromolecular Ligands, Stereodivergent reaction

近年、タンパク質に金属錯体を結合させたハイブリッド触媒である人工金属酵素¹の構築が注目を集めている。当研究室では超好熱菌由来の TM1459 タンパク質²を用い、このタンパク質が持つ4つのヒスチジン残基からなる金属結合部位に直接金属イオンを結合させることで、より簡便に人工金属酵素を構築する手法を開発してきた。本研究では、第一配位圏にある4つのヒスチジン残基のうち2つをそれぞれ、カルボン酸を側鎖に持つアミノ酸とアラニンに変異させた変異体を構築し、硫酸銅を導入することで立体選択的なマイケル付加反応のスクリーニングを行なった。

モデル反応として、2-アザカルコンをアクセプター、ジメチルマロン酸をドナーとして用いた反応(図1)を行なった。野生型を用いた場合には選択性を示さなかった。一方で、構築した変異体をライブラリーとしてスクリーニングしたところ、銅イオンとともに H52A/H58E、H52A/H58D 変異体を添加した際に鏡像体過剰率がそれぞれ 86%, 80%を示し、立体選択性が見られた。さらに、アクセプターとしてアセト酢酸メチルを用いた場合にも立体選択性が見られた。本発表ではこれらの詳細に加え、さらなる変異導入によるライブラリーの拡充について議論する。

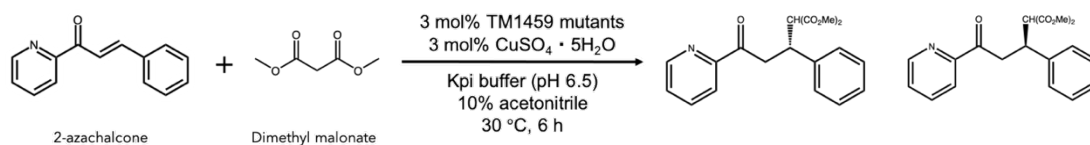


Fig 1. Model reaction employed in this study

1) (a) Schwizer, F.; Ward, T. R. et al., *Chem. Rev.* **2018**, 118 (1), 142–231. (b) Hoarau, M.; Faller, P. et al., *Coord. Chem. Rev.* **2016**, 308, 445–459. (c) Rioz-Martínez, A.; Roelfes, G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, 25, 80–87. 2) (a) Fujieda, N.; Itoh, S. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, 139, 5149. (a) Fujieda, N.; Itoh, S. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, 59, 7717.