

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03087

研究課題名(和文) 過酸化水素駆動型P450の分子設計

研究課題名(英文) Molecular design of hydrogen peroxide-dependent P450s

研究代表者

渡辺 芳人 (Watanabe, Yoshihito)

名古屋大学・物質科学国際研究センター・名誉教授

研究者番号：10201245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：P450BS とP450SP は、過酸化水素を利用して長鎖脂肪酸を水酸化する酵素で、長鎖脂肪酸以外の基質の酸化はできないと考えられてきた。P450BS のArg242をリジンに置換した変異体(R242K変異体)は、メトキシナフタレンを水酸化可能であることを明らかにした。R242K変異体の酸化活性は、これまでの変異体よりも高くなることを見出した。また、過酸化水素駆動型シトクロムP450であるP450SP のR241K変異体が、スチレンなどの非天然基質を酸化することができることを見出した。結晶構造解析によって、P450SP のR241K変異体の活性部位の構造を明らかにすることにも成功している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シトクロムP450は、高難度酸化反応が可能で有用な酸化酵素の一つですが、酸化反応を行うためには、高価な試薬であるNAD(P)Hが必要になります。安価な過酸化水素を利用することが可能なシトクロムP450もありますが、対象とする基質の選択性が高く、長鎖脂肪酸の水酸化しかできないと考えられてきました。本研究では、過酸化水素を利用可能なP450の一つのアミノ酸を違うアミノ酸に置換することで、様々な基質を水酸化できるように改変することに成功しました。

研究成果の概要(英文)：CYP152A1 (P450BS) and CYP152B1 (P450SP) can generate the active species utilizing H₂O₂ as an oxidant and catalyze the - or -selective hydroxylation of long-alkyl-chain fatty acids. The substrate specificity of CYP152 family enzymes is very high. The crystal structure of P450BS and P450SP indicate that the carboxylate group of palmitic acid interacting with the arginine located at the I helix (the distal side of the heme) is crucial for the generation of compound I. Owing to this unique mechanism, CYP152 family enzymes never oxidize substrate other than long-alkyl-chain fatty acid. We have demonstrated that the R242K mutant of P450BS and the P450SP with corresponding mutation can catalyze non-native substrate oxidations. We have also succeeded in crystal structure analysis of the R241K mutant of P450SP . We expect that a variety of peroxxygenases based on P450s can be constructed by one-point mutagenesis.

研究分野：生物無機化学

キーワード：酵素 シトクロムP450 ヘム 過酸化水素 水酸化反応 カタラーゼ 結晶構造解析 変異導入

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

P450_{BSP} は、例外的に過酸化水素を酸化剤として利用する P450 であるが、パルミチン酸など炭素数 11 以上の長鎖飽和脂肪酸のみを選択的に酸化する酵素であり、それ以外の基質とは全く反応しない。その理由は、ヘム近傍に存在するアルギニン(Arg242)と基質由来のカルボン酸が相互作用し、長鎖脂肪酸のカルボキシル基が酸化性種の生成を促進するためである。そこで、基質が取り込まれた状態を疑似的に再現する二つの手法を開発することにより長鎖脂肪酸以外の一般的な有機基質を酸化する反応系を作成することに成功した。一つは、Arg242 と相互作用できる位置に部位特異的変異導入によってグルタミン酸を基質のカルボン酸の代わりに配置する手法で (*Catal. Sci. Technol.* 2016, 6, 5806.), もう一つは、酢酸やプロピオン酸などのアルキルカルボン酸を反応系に添加して、Arg242 と相互作用するカルボン酸を外部添加により供給する手法 (*Dalton Trans.* 2015, 44, 15316.)である。基質が取り込まれた状態を疑似的に再現することにより、スチレンなどの長鎖脂肪酸以外の様々な有機基質を酸化することに成功し、スチレンのエポキシ化反応の酸化活性は毎分 500 回を超えた。しかしながら、アルカンの水酸化反応は決して速いものではなく改善の必要があった。

2. 研究の目的

活性中心に鉄ポルフィリン錯体(ヘム)を有するシトクロム P450(P450)は、アルカンなどの不活性有機基質の水酸化反応を触媒することから、高難度水酸化反応への応用が期待されている。しかし、P450 は一般的に高価な還元剤(NAD(P)H)が必要であり物質合成への適用はコスト的に見合わないと考えられてきた。本研究課題では、安価な過酸化水素を酸化剤とする強力な酸化酵素系を開発することにより、不活性有機基質を高効率に水酸化するとともに高い位置立体選択的反応が可能なバイオ触媒システムを開発すること最終的な目的としている。具体的には、「基質結合状態を再現する新たな変異導入の開発」や「更なる変異導入と適用する P450 の変更」により反応活性を向上させるとともに、位置選択制やキラル選択性をも高度に制御した反応系の構築を目指した。

3. 研究の方法

大腸菌を宿主とする蛋白質の過剰発現系によって、過酸化水素駆動型 P450 を発現し、各種カラムクロマトグラフィーによって精製し、単離した。結晶化には、さらにイオン交換クロマトグラフィーによって高度に精製した蛋白質を用いた。酵素活性は、脂肪酸の水酸化やスチレンの酸化については、ガスクロマトグラフィーを用い、芳香族化合物の水酸化については、メトキシナフタレンやインドールが水酸化後にさらに酸化されて可視光領域に吸収を持つ二量体を形成することを利用して、UV 吸収スペクトル測定によって水酸化活性を評価した。カタラーゼ活性は、酸素発生を酸素電極を用いて電気化学的に検出して評価した。X 線結晶構造解析は、SPring-8 のビームライン BL26B1/B2 によって行った。

4. 研究成果

P450_{BSP} の Arg242 をリジンに置換した変異体(R242K 変異体)は、初期活性はほとんどないが基質と過酸化水素を反応系に添加して反応を始めると、5 分を過ぎたあたりから活性が上昇し、メトキシナフタレンの水酸化活性で評価した芳香環の水酸化活性は、これまでの変異体やアルキルカルボン酸を添加する反応系よりも高くなることを見出した。ヘム酵素の近傍にあるリジンが酸化活性種生成を促進する全く新しいタイプの過酸化水素駆動型 P450 の作成に成功した。また、過酸化水素駆動型シトクロム P450 である P450_{SPα} の R241K 変異体が、スチレンなどの非天然基質を酸化可能であることも明らかにした。結晶構造解析によって、P450_{SPα} の R241K 変異体の活性部位の構造を明らかにすることにも成功している。

さらに、過酸化水素駆動型 P450 が触媒する長鎖脂肪酸水酸化への過酸化水素濃度の影響についても精査する過程で、通常は長鎖脂肪酸が水酸化されて反応が終了するが、過酸化水素濃度を 1mM 以上まで上げることで、水酸化された脂肪酸がさらに酸化されて、脱炭酸を経て鎖長が短くなった脂肪酸が生成することを見出した。反応中間体を出発物質とする酵素反応と安定同位体標識過酸化水素を用いることで、位の脂肪酸水酸化後の過剰酸化によって生成されるケト酸が、過酸化水素と反応することで炭素数が一つ少ない脂肪酸を生成する反応機構を明らかにした。過酸化水素駆動型 P450 による脂肪酸の β -酸化的脱炭酸反応はこれまでに全く報告例のない新規反応である。さらに、同様の β -酸化的脱炭酸反応が同じファミリーに属する P450 でも進行することを示し、高濃度過酸化水素条件では、多くの過酸化水素駆動型 P450 が β -酸化的脱炭酸反応を触媒できることを明らかにした。

水酸化反応などの酸化反応の詳細を調べる課程で、過酸化水素駆動型酵素では、水酸化活性だけでなく、過酸化水素の不均化反応であるカタラーゼ反応が同時に進行し、本来の基質である長鎖の脂肪酸の場合には、カタラーゼ活性は低いが、鎖長の短いアルキルカルボン酸をデコイ分子として取り込ませることで、顕著にカタラーゼ活性が高くなることを見出した。カタラーゼ活性は、これまでに明らかにしてきたスチレンやエチルベンゼンの酸化反応と同じく、取り込ませるカルボン酸のアルキル鎖長の長さの違いによって大きく変化することを明らかにした。また、P450_{SPα} については、有機過酸を用いることで、過酸化水素の場合には観測することができなかった酸化活性種の Compound I を吸収スペクトル測定にて検出ができることを明らかにした。こ

れまでも、CYP119などで酸化活性種が観測できることが報告されてきたが、高度好熱菌由来のP450で酸化活性種が観測されたのはこれが初めての例である。過酸を用いて生成させた酸化活性種を基質と反応させることにより、より詳細な反応機構解析が可能となった。上述の脱炭酸反応などへの適用も可能であり、過酸化水素駆動型のP450についての理解がさらに深まると予想する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 H. Onoda, O. Shoji, K. Suzuki, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe	4. 巻 8
2. 論文標題 -Oxidative decarboxylation of fatty acids catalysed by cytochrome P450 peroxygenases yielding shorter-alkyl-chain fatty acids	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Catalysis Science & Technology	6. 最初と最後の頁 434-442
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C7CY02263H	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Dezvarei Shaghayegh, Shoji Osami, Watanabe Yoshihito, Bell Stephen G.	4. 巻 124
2. 論文標題 The effect of decoy molecules on the activity of the P450Bm3 holoenzyme and a heme domain peroxygenase variant	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Catalysis Communications	6. 最初と最後の頁 97 ~ 102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.catcom.2019.03.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Shoji Osami, Aiba Yuichiro, Watanabe Yoshihito	4. 巻 52
2. 論文標題 Hoodwinking Cytochrome P450BM3 into Hydroxylating Non-Native Substrates by Exploiting Its Substrate Misrecognition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Accounts of Chemical Research	6. 最初と最後の頁 925 ~ 934
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.accounts.8b00651	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Yoshihito, Aiba Yuichiro, Ariyasu Shinya, Abe Satoshi	4. 巻 93
2. 論文標題 Molecular Design and Regulation of Metalloenzyme Activities through Two Novel Approaches: Ferritin and P450s	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 379 ~ 392
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1246/bcsj.20190305	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 渡辺芳人
2. 発表標題 生体で活躍する金属イオン
3. 学会等名 立命館大学「生物無機化学フロンティア講義」
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 渡辺芳人
2. 発表標題 金属酵素の分子設計と機能制御
3. 学会等名 慶應義塾大学理工学部化学科講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 渡辺芳人
2. 発表標題 蛋白質を反応場とする金属触媒設計
3. 学会等名 近畿大学「サイエンスシンポジウム 躍動する物質科学・脳科学の最前線」（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 渡辺芳人
2. 発表標題 Molecular Design and Regulation of Metalloenzyme Activities
3. 学会等名 分子研シンポジウム（IMS Symposium）（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Y. Watanabe
2. 発表標題 Molecular Design of Metalloenzymes
3. 学会等名 KAIST 7th Kim Yong Hae Lecture (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 渡辺芳人
2. 発表標題 大学の現状・将来と科研費
3. 学会等名 日本化学会 第99春季年会 (2019) (招待講演)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 H. Onoda, O. Shoji, K. Suzuki, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe
2. 発表標題 -Oxidative Decarboxylation Reaction of Fatty Acid Catalyzed by Fatty Acid Specific Peroxygenase
3. 学会等名 9th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 小野田浩宜、荘司長三、杉本宏、城直嗣、渡辺芳人
2. 発表標題 脂肪酸特異的ペルオキシゲナーゼの反応場解析に基づいた基質寛容性の拡張
3. 学会等名 第31回生物無機化学夏季セミナー
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 小野田 浩宜、荘司 長三、杉本 宏、渡辺 芳人、城 宜嗣
2. 発表標題 脂肪酸特異的ペルオキシゲナーゼの基質結合状態を模した非特異的ペルオキシゲナーゼの開発
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 小野田浩宜、荘司長三、杉本宏、城宜嗣、渡辺芳人
2. 発表標題 シトクロムP450と過酸化水素を用いた脂肪酸 炭素減炭反応機構の解析
3. 学会等名 第18回蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 渡辺芳人
2. 発表標題 Molecular Design and Regulation of metalloenzymes
3. 学会等名 日本化学会 第98春季年会 (2018) (招待講演)
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 渡辺芳人
2. 発表標題 蛋白質反応場の活用
3. 学会等名 日本化学会 第98春季年会 (2018) (招待講演)
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 渡辺 芳人
2. 発表標題 化学の視点で金属酵素を設計する
3. 学会等名 第120回触媒討論会（招待講演）
4. 発表年 2017年～2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	莊司 長三 (Shoji Osami) (90379587)	名古屋大学・理学研究科・教授 (13901)	