

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2007 ～ 2011

課題番号：19105004

研究課題名（和文） 実用化に向けた酸素添加酵素の分子設計

研究課題名（英文） **Molecular Design of Oxygenases Applicable to Synthetic Chemistry**

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・教授

研究者番号：10201245

研究成果の概要（和文）：好熱菌由来の耐熱・耐久性に優れたシトクロム *c*、あるいは酸化基質として過酸化水素を利用できるシトクロム P450 を基盤タンパク質に用い、アミノ酸置換や本来の基質に似せた「疑似基質」を用いることよって、タンパク質の活性中心を合目的的に機能改変することに成功した。創出した人工酵素は、これまでの人工酵素にはなかった耐熱性、触媒活性を示し、実用化に向けた酸素添加酵素の本格的なプロトタイプとなり得るものとなった。

研究成果の概要（英文）：The study has achieved creation of novel artificial oxygenases founded on a heme protein deriving from a thermophile or a cytochrome P450 protein that utilizes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as the oxidant. A newly developed method, “Decoy molecule” succeeded to rationally modify the active site of the P450 protein in addition to conventional mutagenesis techniques. The artificial oxygenases exerted high catalytic activity and/or thermal tolerance which were not achieved by ever reported artificial oxygenases. Results in the study provide ideas and methodology to design artificial oxygenases aiming practical uses and might be applicable to artificial enzymes of other activities.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	29,300,000	8,790,000	38,090,000
2008 年度	13,900,000	4,170,000	18,070,000
2009 年度	14,100,000	4,230,000	18,330,000
2010 年度	14,100,000	4,230,000	18,330,000
2011 年度	14,100,000	4,230,000	18,330,000
総計	85,500,000	25,650,000	111,150,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：生物無機化学 ヘム蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

酸化酵素には、ヘムと呼ばれる鉄ポルフィリン錯体の一種を活性中心に利用するものが存在する。研究開始当時の我々は、そうしたヘム含有酸化酵素の機能を、その化学に基づいて異種のヘムタンパク質（酸素貯蔵タンパク質、ミオグロビン）で再現し、更には人工的な機能を賦与することに成功していた。しかし、反応過程で機能化ミオグロビンは容易に変性や分解を生じるという問題、また機能

化を変異導入で実現していたため、機能の精密な設計が難しいなどの問題に直面していた。そこで、「人工酵素の高活性を維持しつつ、耐久性に優れた人工酵素を実現すること」、「変異導入に寄らずに活性中心の機能改変を合目的的に実現すること」を新たな研究課題として提案するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、まず第一に広い温度領域での触媒活性の持続実現のため、耐熱性・耐久性に

優れた好熱菌由来のヘムタンパク質、シトクロム  $c_{552}$  を骨格分子に利用した人工酸化酵素の創出を目指した。続いて、上述の成果を取り入れつつ、既存の酸化酵素の反応空間を従来とは全く異なる発想で設計した分子（疑似基質）で精密に改変・制御し、天然には無い、あるいは天然を超える酸化能の賦与を目指した。具体的には、シトクロム P450（不活性アルカン分子の水酸化を触媒する酵素）の一種、シトクロム P450<sub>BSp</sub> を対象に、高キラル選択性の賦与、高難度酸化反応を目標とした。各タンパク質を選択した理由については、「3. 研究の方法」で述べる。

### 3. 研究の方法

研究に用いたタンパク質には、大腸菌を宿主とする組換え体として発現・精製したものを用いた。酸化能の解析は、各種分光法、クロマトグラフィーを利用した。X線結晶構造解析によってヘム活性中心、反応空間を可視化し、機能の鍵となるアミノ酸への効果的な変異導入、疑似基質分子の精密な構造設計を行い、タンパク質の高活性化、生成物への高いキラリティーの賦与を試みた。

人工酸化酵素の耐久化、耐熱化には、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来のシトクロム  $c_{552}$  を基盤タンパク質に用いた。このタンパク質は、主鎖骨格と共有結合したヘムを活性中心に有し、沸騰水中でも構造を保持する高い熱安定性が特徴である。また複数のアミノ酸置換を行っても構造変化を起こしにくい。ため、設計通りの変異導入に基づく酵素活性の賦与が実現しやすいと考えた。

疑似基質分子による反応空間の精密改変・制御では、シトクロム P450<sub>BSp</sub> を利用した。シトクロム P450 はアルカンのヒドロキシル化に高活性を示すものが数多く知られており、合成化学への応用を意識した研究が数多くなされている。この酵素は基質への酸素添加に基質と等モル量の  $O_2$  および NADH あるいは NADPH を必要とする。NADH, NADPH は非常に高価であり、P450 の触媒利用にとって、最大のボトルネックである。P450<sub>BSp</sub> は、近年発見された P450 の一種であるが、 $O_2 + NADH, NADPH$  の代わりに安価な  $H_2O_2$  を利用できるため、P450 の抱える問題が存在せず、更なる高活性の賦与で有機合成触媒としての利用への道が開けると考えた。

### 4. 研究成果

(1) P450<sub>BSp</sub> に疑似基質を取り込ませる反応システムでは、疑似基質の構造の違いにより酵素活性が大きく変化するだけでなくエナンチオ選択性も変化するを見出したが、チオアニソールの酸化反応では、用いるデコイ分子により、エナンチオ選択性を反転可能であることを示した。また、疑似基質を用いる反応システムにより、1-メトキシナフタレンの芳香環を水酸化できることを明らかにす

るとともに、その酸化活性を生成する色素の吸収で簡便に評価できることも見出した。さらに、ミオグロビン変異体でも1-メトキシナフタレンの芳香環を水酸化できることを見出し、インドールを基質とすると色素のインディゴを合成できることも明らかとした。

(2) 疑似基質を取り込ませる反応システムでは、疑似基質がどのように取り込まれて P450<sub>BSp</sub> を活性化しているのかが明らかではなかったが、デコイ分子を取り込んだ P450<sub>BSp</sub> の結晶構造解析に成功し、疑似基質は、長鎖脂肪酸と同じ位置に取り込まれ、P450<sub>BSp</sub> の全体構造には大きな変化が無いことを明らかにした。

(3) 過酸化水素駆動型の P450 として初めに報告された P450<sub>SPa</sub> の結晶構造解析に成功し、P450<sub>SPa</sub> が P450<sub>BSp</sub> と同じ反応機構で酸化活性種を生成することを明らかにした。また、P450<sub>BSp</sub> と P450<sub>SPa</sub> の構造の比較により P450<sub>SPa</sub> が選択的に長鎖脂肪酸の  $\alpha$  位を水酸化する仕組みは、長鎖脂肪酸の取り込みチャンネルの違いに起因することを提案した。

(4) 酸素分子を還元的に活性化する P450BM3 に対しても疑似基質を用いる手法が適用可能で、疑似基質としてパーフルオロアルキルカルボン酸を取り込ませると、プロパンやブタンなどの小分子アルカンを水酸化できることを見出した。用いる疑似基質のアルキル鎖長と酸化されるガス状分子の大きさには相関があり、プロパンの水酸化を高効率で進行させるために添加する疑似基質は、ブタンの水酸化の場合にくらべてアルキル鎖長が炭素数で一つ長いパーフルオロアルキルカルボン酸であることを明らかにした。

(5) アミノ酸置換によって酸化酵素としての分子設計を施したシトクロム  $c_{552}$  変異体が  $70^\circ C$  の高温でも持続的なペルオキシダーゼ活性を示すことを見出した（2010年度の進捗状況報告書にて既報）後、活性中心であるヘムそのものを非天然分子に置換し、更なる機能化を可能にする研究に着手した。シトクロム  $c$  に属するタンパク質のヘムは、共有結合でタンパク質骨格に固定されている。このためヘムの置換、あるいは中心金属のみの置換でも煩雑な手順が必要であり、非天然活性中心を有する機能化シトクロム  $c$  創出を難しくしていた。今回、タンパク質の発現方法から改変して調製した我々のシトクロム  $c_{552}$  変異体は、精製直後の状態でヘムタンパク質間に共有結合がなく、ヘムの除去、非天然ヘムとの再構成、および共有結合形成がいずれも簡便に行えることを示した。今後この変異体を基盤分子に用い、更に優れた活性と耐久性を有する酸化酵素の実現を目指す。

### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

[雑誌論文] (計 37 件)

- 1) J. Xu, O. Shoji, T. Fujishiro, T. Ohki, T. Ueno, Y. Watanabe, "Construction of Biocatalysts Using the Myoglobin Scaffold for the Synthesis of Indigo from Indole," *Catalysis Science & Technology*, 2, 739-744 (2012). 査読有  
DOI:10.1039/C2CY00427E
- 2) Y. Tokita, Y. Goto, S. Yamada, T. Luo, H. Nakajima, Y. Watanabe, "Protein Photoconductors and Photodiodes," *Angew.Chem.Int.Ed.*, 50, 11663-11666 (2011). 査読有  
DOI: 10.1002/anie.201103341
- 3) Sk. Md. Ibrahim, H. Nakajima, K. Ramanathan, N. Takatani, T. Ohta, Y. Naruta, Y. Watanabe, "Cytochrome c552 from *Thermus Thermophilus* Engineered for Facile Substitution of Prosthetic Group," *Biochemistry*, 50 (45), 9826-9835 (2011). 査読有  
DOI: 10.1021/bi201048e
- 4) T. Fujishiro, O. Shoji, S. Nagano, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, "Crystal Structure of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent Cytochrome P450SPa with its Bound Fatty Acid Substrate: Insight into the Regioselective Hydroxylation of Fatty Acids at the  $\alpha$  Position," *J. Biol. Chem.* 286, 29941-29950 (2011). 査読有  
DOI: 10.1074/jbc.M111.245225
- 5) N. Kawakami, O. Shoji, Y. Watanabe, "Use of Perfluoro Carboxylic Acids Trick Cytochrome P450BM3 into Initiating Hydroxylation of Gaseous Alkanes," *Angew.Chem.Int.Ed.* 50, 5315-5318(2011). 査読有  
DOI: 10.1002/anie.201007975
- 6) O. Shoji, Y. Watanabe, "Design of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Dependent Oxidation Catalyzed by Hemoproteins," *Metallomics*, 3, 379-388 (2011). 査読有  
DOI: 10.1039/c0mt00090f
- 7) H. Nakajima, O. Shoji, Y. Watanabe, "Molecular Design of Heme Proteins for Future Application," *Catalysis Surveys from Asia*, 15, 134-143(2011). 査読有  
DOI: 10.1007/s10563-011-9117-9
- 8) T. Fujishiro, O. Shoji, Y. Watanabe, "Non-covalent Modification of the Active Site of Cytochrome P450 for Inverting the Stereoselectivity of Monooxygenation," *Tetrahedron Lett.*, 52, (3), 395-397 (2011). 査読有  
DOI: 10.1016/j.tetlet.2010.11.048
- 9) O. Shoji, T. Fujishiro, S. Nagano, S. Tanaka, T. Hirose, Y. Shiro, Y. Watanabe, "Understanding Substrate Misrecognition of Hydrogen Peroxide-Dependent Cytochrome P450 from *Bacillus Subtilis*," *J. Biol. Inorg. Chem.*, 15, (8), 1331-1339 (2010). 査読有  
DOI: 10.1007/s00775-010-0692-4
- 10) O. Shoji, C. Wiese, T. Fujishiro, C. Shirataki, B. Wünsch, Y. Watanabe, "Aromatic C-H bond Hydroxylation by P450 Peroxygenases: A Facile Colorimetric Assay for Monooxygenation Activities of Enzymes Based on the Russig's Blue Formation," *J. Biol. Inorg. Chem.*, 15, (7), 1109-1115 (2010). 査読有  
DOI: 10.1007/s00775-010-0671-9
- 11) H. Nakajima, K. Ramanathan, N. Kawaba, Y. Watanabe, "Rational Engineering of *Thermus Thermophilus* Cytochrome c552 to a Thermally Tolerant Artificial Peroxidase," *Dalton Trans.*, 39, 3105-3114 (2010). 査読有  
DOI:10.1039/B924365H
- 12) H. Nakajima, Y. Ichikawa, Y. Satake, N. Takatani, S. K. Manna, J. Rajbongshi, S. Mazumdar, Y. Watanabe, "Engineering of *Thermus Thermophilus* Cytochrome c552: Thermally Tolerant Artificial Peroxidase," *ChemBioChem.*, 9, 2954-2957 (2008). 査読有  
DOI: 10.1002/cbic.200800599
- 13) Y. Tokita, J. Shimura, H. Nakajima, Y. Gotoh, Y. Watanabe, "Mechanism of Intermolecular electron Transfer in the Photoexcited Zn-Substituted Cytochrome c: Theoretical and Experimental Perspective," *J. Am. Chem. Soc.* 130, 5302-5310(2008). 査読有  
DOI: 10.1021/ja711324t
- 14) Y. Watanabe, H. Nakajima, T. Ueno, "Reactivities of Oxo and Peroxo Intermediates Studied by Hemoprotein Mutants," *Acc. Chem. Res.* 40, 554-562 (2007). 査読有  
DOI: 10.1021/ar600046a
- 15) Y. Satake, S. Abe, S. Okazaki, N. Ban, T. Hikage, T. Ueno, H. Nakajima, A. Suzuki, T. Yamane, H. Nishiyama, Y. Watanabe, "Incorporation of Phebox Rhodium Complex into apo-Myoglobin Affords Stable Organometallic Protein Showing Unprecedented Arrangement of the Complex in the Cavity," *Organometallics*. 26, 4904-4908 (2007). 査読有  
DOI: 10.1021/om700471a
- 16) S. Abe, T. Ueno, P. Reddy, S. Okazaki, T.

Hikage, A. Suzuki, T. Yamane, H. Nakajima, Y. Watanabe, " *Design and Structure Analysis of Artificial Metalloproteins: Selective Coordination of His64 to Copper Complexes with Square-Planar Structure in the Apo-Myoglobin Scaffold*," *Inorg. Chem.* 46, 5137 - 5139 (2007). 査読有  
DOI: 10.1021/ic070289m

[学会発表] (計 48 件)

**Plenary lectures:**

- 1) Y. Watanabe, "Hydrogen Peroxide-Dependent Cytochrome P450", The 5th Asian Bioinorganic Chemistry Conference (AsBIC-V), November 1-5, 2010, Kaohsiung, Taiwan.
- 2) Y. Watanabe, "Molecular Design of Catalytic reactions in Proteins," 6th Tokyo Conference and Advanced Catalytic Science and Technology & 5th Asai Pacific Congress on Catalysis (TOCAT6/APCAT5), July 18-23, 2010, Sapporo, Japan.
- 3) Y. Watanabe, "Construction of Organometalloenzymes," 5th International Symposium on Bioorganometallic Chemistry (ISBOMC5), July 5-9, 2010, Bochum, Germany.
- 4) Y. Watanabe, "Inorganic Chemistry in Proteins," Symposium on Modern Trends in Inorganic Chemistry: (MTIC XIII), Dec. 7-10, 2009, Bangalore, India
- 5) Y. Watanabe, "Hydrogen Peroxide-Dependent Cytochrome P450 from *Bacillus Subtilis* (P450<sub>BSP</sub>)," Symposium on Advanced Biological Inorganic Chemistry (SABIC-2009), Nov. 4-7, 2009, Mumbai, India.

**Keynote lectures:**

- 6) Y. Watanabe, "Construction of Metalloenzymes: Catalysts Embedded in Proteins," Green & Sustainable Chemistry for Next Generation-The 5th GCOE International Symposium- "Catalysis as the Basis for the Innovation in Materials Science" The 1st International Symposium of Graduate School of Chemical Sciences and Engineering, Feb. 21-22, 2012, Sapporo, Japan.
- 7) Y. Watanabe, O. Shoji, N. Kawakami, T. Fujishiro, "Peroxide Dependent Monooxygenation Catalyzed by Cytochromes P450," 3rd Asian Conference on Coordination Chemistry, Oct. 17-20, 2011, New Delhi, India.
- 8) Y. Watanabe, "Four Approaches for the Construction of Metalloenzymes", ICBIC15,

Aug. 7-12, 2011, Vancouver, Canada.

- 9) Y. Watanabe, "Coordination Chemistry in Protein Cages", The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem), Dec. 15-20, 2010, Honolulu, Hawaii, USA.
- 10) Y. Watanabe, "Coordination Chemistry in Protein Cages," 10th European Biological Inorganic Chemistry Conference (Eurobic10), June 22-26, 2010, Thessaloniki, Greece.
- 11) Y. Watanabe, "Coordination Chemistry in Protein Cages: Construction of Metalloproteins," 2nd Asian Conference on Coordination Chemistry (2<sup>nd</sup> ACCC 2009), November 1-4, 2009, Nanjing, China.
- 12) Y. Watanabe, "Construction of Organometalloproteins: A New Approach for Bioinorganic Chemistry," 13th International Conference on Inorganic Biological Chemistry (ICBIC 13), July 15-20, 2007, Vienna, Austria.

[図書] (計 7 件)

- 1) 渡辺芳人、荘司長三「P450による酸素活性化機構と基質の酸素化機構」、P450の分子生物学、講談社サイエンティフィック、第2版 60-77 (2009)。
- 2) 渡辺芳人、荘司長三「へム酵素の創成」酵素工学ニュース、酵素工学研究会誌 第61号、6-12 (2009)。
- 3) 渡辺芳人、安部聡、上野隆史 "蛋白質が提供するナノ空間" ナノ空間材料の創製と応用、フロンティア出版、72-79 (2009)。
- 4) 渡辺芳人、上野隆史 "蛋白質空間錯体 hybrid." 配位空間の化学、シーエムシー出版、301-311 (2009)。
- 5) 渡辺芳人、中島洋「酵素反応の速度と反応機構」、触媒便覧第 4 章、講談社サイエンティフィック、47-52 (2008)。
- 6) 中島 洋、渡辺芳人「好熱菌由来タンパク質を化学の視点で利用する」、学術月報、61、43-49 (2008)。
- 7) 渡辺芳人 "有機金属酵素創製の試み." Organo Metallic NEWS, 158-164 (2008)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: へム蛋白質のへム置換法  
発明者: 渡辺芳人、荘司長三、川上了史  
権利者: 名古屋大学  
種類: 特許  
番号: 61/610,112  
出願年月日: 平成 24 年 3 月 13 日  
国内外の別: 国外

名称：不活性炭化水素の水酸化方法およびダ  
ミー分子

発明者：渡辺芳人、荘司長三、川上了史

権利者：名古屋大学

種類：特許

番号：特願 2010-164828

出願年月日：平成 22 年 7 月 22 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://bioinorg.chem.nagoya-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 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・  
教授

研究者番号：10201245

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

中島 洋 (NAKAGIMA HIROSHI)

名古屋大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：00283151

永野 真吾 (NAGANO SHINGO)

鳥取大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：60286440