

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05271

研究課題名（和文）シトクロムP450による擬似基質誘起1級炭素選択的水酸化反応の開発

研究課題名（英文）Terminal hydroxylation by cytochrome P450s induced by dummy substrates

研究代表者

有安 真也 (Ariyasu, Shinya)

名古屋大学・理学研究科・助教

研究者番号：50586998

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、シトクロムP450に擬似基質を添加して、化学的に反応性の低い末端の1級炭素に選択的に水酸基を導入する技術の創製を目指して研究を行った。複数の長鎖脂肪酸水酸化P450に対して、様々な擬似基質を添加し、プロパンの水酸化を行ったところ、CYP153A33が約80%の選択性で1級炭素を水酸化した1-プロパノールが生成した。意外にも、これまで巨大菌由来のP450BM3では有効でなかったフッ素修飾擬似基質がCYP153A33に極めて有効であることを明らかにした。プロパンのみならず、ブタンの末端水酸化も可能であり、非天然基質の1級炭素選択的な水酸化手法として、今後の発展が期待出来る成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で達成したシトクロムP450類（特にCYP153類）でのプロパン等の非天然基質の1級炭素選択的水酸化は、反応性の高い分子内部の2級炭素ではなく、反応性の低い分子末端の1級炭素への反応であり、触媒化学的に希少な化学変換である。これはCYP153類の特徴的な細長い反応空間により、分子末端のみが酵素の反応活性種と接触可能なためであり、このような反応場の有用性は酵素以外の合成触媒系への応用が期待出来る。また、分子の末端官能基化は機能性高分子の原料分子の合成にも有用であり、環境負荷の低い酵素反応を化学工業で利用する礎となる成果と言える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop a method to selectively introduce hydroxyl groups to the primary carbon, which has low chemical reactivity, by adding decoy molecules to cytochrome P450s. Through the screening in propane hydroxylation by several long-chain fatty acid hydroxylase P450s in the presence of various decoy molecules, CYP153A33 can hydroxylate the primary carbon in propane with approximately 80% selectivity to produce 1-propanol. Surprisingly, we found that fluorine-contained decoy molecules, which had not been so effective with P450BM3 originating from *Bacillus megaterium*, were extremely effective for CYP153A33. This P450 can hydroxylate not only propane, but also butane with high selectivity at primary carbons, and these achievements are expected to be developed into a method for selective hydroxylation of primary carbons of non-native substrates in the future.

研究分野：生物無機化学

キーワード：シトクロムP450 擬似基質 末端水酸化 非天然基質 CYP153

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬剤分子や機能性分子を精密に合成するためには、位置選択的な官能基の導入が必要不可欠である。近年、酵素を含む触媒科学の進展により、化学的に極めて安定なため、これまで利用不可能と考えられていたアルカンに直接官能基導入を行う手法の開発が進んでいる。水酸基導入はその1つの例であり、自然界で同様の反応を触媒するシトクロム P450 を用いた手法や、P450 をモデルとした合成金属錯体などが数多く開発されてきている。これらの触媒反応では、アルカンの安定な炭素-水素結合から、触媒分子を高度に活性化して生じる酸化活性種で水素を引き抜くプロセスを経由するため、一般的に原料分子の炭素-水素(C-H)結合解離エネルギー(BDE)に反応速度が強く依存する。そのため、分子中に BDE が低い C-H 結合が存在する場合は、その部分への水酸化が優先して進行し、BDE が高い安定な C-H 結合への水酸基導入は極めて困難である。薬剤分子や機能性分子を精密に合成するためには、位置選択的な官能基の導入が必要不可欠である。近年、酵素を含む触媒科学の進展により、化学的に極めて安定なため、これまで利用不可能と考えられていたアルカンに直接官能基導入を行う手法の開発が進んでいる。水酸基導入はその1つの例であり、自然界で同様の反応を触媒するシトクロム P450 を用いた手法や、P450 をモデルとした合成金属錯体などが数多く開発されてきている。これらの触媒反応では、アルカンの安定な炭素-水素結合から、触媒分子を高度に活性化して生じる酸化活性種で水素を引き抜くプロセスを経由するため、一般的に原料分子の炭素-水素(C-H)結合解離エネルギー(BDE)に反応速度が強く依存する。そのため、分子中に BDE が低い C-H 結合が存在する場合は、その部分への水酸化が優先して進行し、BDE が高い安定な C-H 結合への水酸基導入は極めて困難である。例えば、プロパンは末端に2つの1級炭素(CH₃-)と中央の2級炭素(-CH₂-)を有するが、2級炭素の C-H 結合の BDE の方が低いため、2級炭素に水酸基が導入された2-プロパノールが主生成物となる。これらの混合物から目的物である1級炭素水酸化生成物を精製すると、極めて収率が低くなる。この問題は合成触媒に限らず、酵素化学においても未解決の課題であった。

申請者グループは酵素機能改変手法として、酵素の天然基質に類似構造をもつが、分子長が短く、酵素の活性サイトを部分的に占有可能な「擬似基質」を用いた酵素の触媒特性制御法を開発を行っている。例えば、巨大菌由来の P450BM3 は長鎖脂肪酸を基質とし、その末端付近の不活性な C-H 結合間に酸素原子を挿入可能な酵素であるが、長鎖脂肪酸よりも分子長の短いカルボン酸を添加するだけで、P450BM3 内に人工的な反応空間を構築し、室温、水中でプロパンやベンゼンといった小サイズの非天然基質の水酸化に成功していた。本手法の特徴は P450BM3 の持つ反応性、立体選択性を化学合成可能な擬似基質によって調節可能な点である。しかし、本手法を持ってしても、プロパン水酸化における1級炭素水酸化生成物(1-プロパノール)の比率は約5%であり、変異導入法と同様、BDE に依存した位置選択性の打破は不可能であった。その原因として、P450BM3 の結晶構造から、酵素と擬似基質の間に構築される人工的な反応空間がプロパン分子に比べて広いことが分かり、反応空間中でプロパンが自由に動き、最も反応性の高い(BDE の低い)2級炭素の水酸化が優先的に進行していると考えられた。

2. 研究の目的

本研究計画では酵素による1級炭素選択的水酸化技術を開発することを目標とし、酵素の反応空間の構造規定を突き詰める戦略が BDE 支配の水酸化位置選択性の打破に有効かどうかを見極めることを学術的な目標とした。

3. 研究の方法

本計画ではこれまで申請者らが研究対象としていた P450BM3 の持つ広い活性サイトに見切りを付け、P450BM3 とは全く異なる活性サイト構造を有する P450 を用い、1級炭素水酸化を選択的に進行可能な酵素反応系の構築を目指した。まず、擬似基質に応答可能であり、かつ、1級炭素選択的な水酸化に適した P450 の探索として、P450BM3 と同様の長鎖脂肪酸を基質とする P450 に焦点を絞った。反応基質としては、プロパンを選択し、申請者らが以前に開発した微小高圧反応装置を用いて、これまでに開発した様々なタイプの擬似基質存在下での高圧反応を行った。酵素反応特性の評価にはガスクロマトグラフィー-質量分析装置(GCMS)を用いた。さらに1級炭素選択的な水酸化反応の効率、選択性が高かった P450 と擬似基質の組み合わせについて、ブタン水酸化を同様に行い、基質サイズの違いによる選択性の変化を検証した。

4. 研究成果

目的の1級炭素選択的水酸化に適した P450 の探索として、まず、P450BM3 の類縁酵素である CYP102 シリーズに適用したが、いずれの酵素においても、P450BM3 と同じく、1級炭素への水酸化の比率が非常に低く、化学的に反応性が高い2級炭素への水酸化が優先的に進行したため、CYP102 シリーズは1級炭素水酸化の候補としては適していないことが判明した。そこで、自然

界において長鎖脂肪酸の末端の1級炭素に対して選択的に水酸化が可能な CYP153 に着目し、その一種である CYP153A33 の遺伝子を大腸菌に形質転換し、CYP153A33 の発現、精製を行った。次に、CYP153A33 に対して、P450BM3 用の擬似基質ライブラリーを添加して、プロパンの水酸化を検討したところ、P450BM3 とは相性が悪かった擬似基質に対して、CYP153A33 は強く応答しただけでなく、プロパンの1級炭素に水酸基が導入された1-プロパノールが主生成物として得られた。1-プロパノールと2-プロパノールの比率は従来の P450BM3+擬似基質の系では 5:95 であったのに対し、CYP153A33+擬似基質では 80:20 となり、CYP153A33 が1級炭素水酸化酵素の候補として優れた性質を有していることを明らかにした。

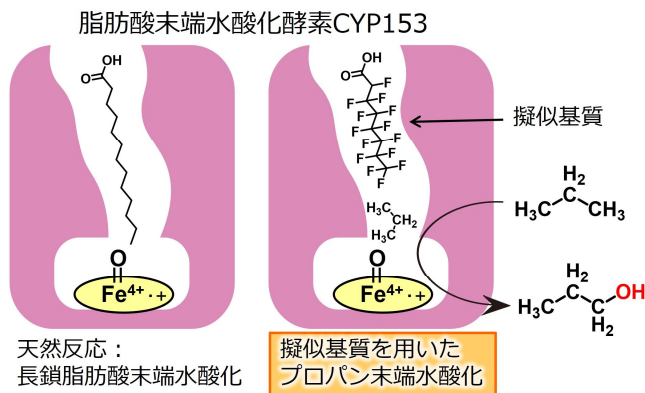


図. CYP153 と擬似基質を用いた非天然基質の1級炭素選択的水酸化

続いて、CYP153A33 に適した擬似基質の探索を行った。これまでに P450BM3 用に開発した 200 種類ほどの擬似基質のうち、末端がフッ素分子で修飾されているデコイ分子、約 30 種類を CYP153A33 に添加し、申請者が開発した微小高圧反応装置を用いたプロパン水酸化を検討した。その結果、いずれのデコイ分子においても、目的とした末端1級炭素選択的水酸化能を示し、その比率は擬似基質の構造に関わらず、80%前後であった。このことは、本反応における位置選択性が擬似基質よりも CYP153A33 が持つ、細長い基質ポケットの形状に依存していることを示している。また、P450BM3 においては、擬似基質の末端アミノ酸にフェニルアラニンやトリプトファンといったかさ高いアミノ酸が有効であったが、CYP153A33 では逆にアラニン等の側鎖のサイズが小さいアミノ酸が有効であった。報告されている CYP153A33 の結晶構造を初期構造として、擬似基質のドッキングシミュレーションを行ったところ、末端アミノ酸周辺は空間的に狭く、かさ高いアミノ酸とは立体障害が発生することが予想され、実験結果と良い一致を示した。フッ素修飾した擬似基質よりも、修飾がない一般的な炭素-水素結合で構成された擬似基質の方が、その合成の容易さ、市販のビルディングブロックの多様さから、構造最適化が行いやすいことから、CYP153A33 においても、アラニン等の相性の良いアミノ酸を持つ非フッ素修飾擬似基質の設計・合成を行い、活性評価を行ったが、ほとんどプロパン水酸化は進行せず、これまでの擬似基質とは大きく異なる適応性を示すことが明らかとなった。

計画当初は擬似基質末端に末端水酸化生成物の水酸基と相互作用可能な官能基を導入し、水酸化生成物を酵素内で捕捉し、分子の反対側の末端に対する2回目の水酸化により、ジオール化合物の生成も目指していたが、ここまでの検討で擬似基質末端には化学修飾が不可能なフッ素が必須であることを明らかにしたため、計画を変更し、CYP153A33 と擬似基質の反応系の基質適用範囲を検討したところ、プロパンよりも炭素数が1つ多い、n-ブタンにおいても、1級選択的な水酸化が、ほぼ同等の選択性で進行し、本系の1級炭素選択的水酸化が特定の基質に限定されないことを明らかとした。さらに、1級炭素選択的水酸化ではないが、ガス状アルカン水酸化として、反応性の低さから難易度が高いエタンとメタンの直接水酸化に CYP153A33 と擬似基質の系を適用したところ、従来の P450BM3 よりは反応速度は劣るものの、擬似基質存在下でのエタン、メタンの直接水酸化が進行し、CYP153 類の新たな応用方法を開拓することに成功した (Y. Kodama, S. Ariyasu et al. *Catal. Sci. Technol.*, 2023, 13, 6146-6152)。先行研究の P450BM3 が還元酵素と一体化した融合タンパク質であるのに対し、CYP153 類は分子内に還元酵素を持たない。そのため、適切な還元酵素の外部添加が必要であるが、これにより、CYP153 への電子供給効率が P450BM3 よりも低い可能性がある。P450BM3 のような還元酵素との融合タンパク質として CYP153 を遺伝子工学的に発現することで、CYP153 類の持つ特徴的な狭い反応空間を活かした化学変換系がさらに発達する事が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kodama Yusaku, Ariyasu Shinya, Karasawa Masayuki, Aiba Yuichiro, Shoji Osami	4. 巻 13
2. 論文標題 Highly selective hydroxylation of gaseous alkanes at the terminal position by wild-type CYP153A33	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Catalysis Science & Technology	6. 最初と最後の頁 6146 ~ 6152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D3CY00752A	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 Ariyasu Shinya, Yonemura Kai, Kasai Chie, Aiba Yuichiro, Onoda Hiroki, Shisaka Yuma, Sugimoto Hiroshi, Toshi Takehiko, Kubo Minoru, Kamachi Takashi, Yoshizawa Kazunari, Shoji Osami	4. 巻 13
2. 論文標題 Catalytic Oxidation of Methane by Wild-Type Cytochrome P450BM3 with Chemically Evolved Decoy Molecules	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Catalysis	6. 最初と最後の頁 8613 ~ 8623
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscatal.3c01158	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 Stanfield Joshua Kyle, Onoda Hiroki, Ariyasu Shinya, Kasai Chie, Burfoot Eleanor Mary, Sugimoto Hiroshi, Shoji Osami	4. 巻 245
2. 論文標題 Investigating the applicability of the CYP102A1-decoy-molecule system to other members of the CYP102A subfamily	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Inorganic Biochemistry	6. 最初と最後の頁 112235 ~ 112235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jinorgbio.2023.112235	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 Suzuki Kazuto, Stanfield Joshua Kyle, Omura Keita, Shisaka Yuma, Ariyasu Shinya, Kasai Chie, Aiba Yuichiro, Sugimoto Hiroshi, Shoji Osami	4. 巻 62
2. 論文標題 A Compound I Mimic Reveals the Transient Active Species of a Cytochrome P450 Enzyme: Insight into the Stereoselectivity of P450 Catalysed Oxidations	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 e202215706
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202215706	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 Omura Keita, Aiba Yuichiro, Suzuki Kazuto, Ariyasu Shinya, Sugimoto Hiroshi, Shoji Osami	4. 巻 12
2. 論文標題 A P450 Harboring Manganese Protoporphyrin IX Generates a Manganese Analogue of Compound I by Activating Dioxygen	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Catalysis	6. 最初と最後の頁 11108 ~ 11117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscatal.2c01345	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7件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 有安 真也、児玉 侑朔、愛場 雄一郎、荘司 長三
2. 発表標題 脂肪酸末端水酸化酵素CYP153の基質誤認識を利用した1級選択的ガス状アルカン水酸化
3. 学会等名 第31回金属の関与する生体関連反応シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinya Ariyasu, Kai Yonemura, Chie Kasai, Yuichiro Aiba, Hiroshi Sugimoto, Osami Shoji
2. 発表標題 Catalytic Oxidation of Methane by Wild-type Cytochrome P450BM3 with Chemically Evolved Decoy Molecules
3. 学会等名 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 有安真也、児玉侑朔、米村開、笠井千枝、愛場雄一郎、久保稔、當舎武彦、杉本宏、荘司長三
2. 発表標題 シトクロムP450を用いた高圧条件下ガス状アルカンの直接水酸化
3. 学会等名 第47回生体分子科学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shinya Ariyasu, Kai Yonemura, Chie Kasai, Yuichiro Aiba, Hiroshi Sugimoto, Osami Shoji
2. 発表標題 Enzymatic Methane Hydroxylation by Cytochrome P450BM3 with Chemically Evolved Decoy Molecules
3. 学会等名 第71回錯体化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shinya Ariyasu, Kai Yonemura, Chie Kasai, Yuichiro Aiba, Hiroshi Sugimoto, Osami Shoji
2. 発表標題 Catalytic Oxidation of Gaseous Alkanes by Wild-type Cytochrome P450BM3 with Chemically Evolved Decoy Molecules
3. 学会等名 23rd International Conference on Cytochrome P450 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 有安真也
2. 発表標題 合成分子で酵素の能力を引き出す技術の最前線
3. 学会等名 第17回バイオ関連化学シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 有安真也, 児玉侑朔, 米村開, 愛場雄一郎, 莊司長三
2. 発表標題 擬似基質を用いたシトクロムP450の特性を活かしたガス状アルカンの直接水酸化
3. 学会等名 生物無機化学シンポジウム2024
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Osami Shoji, Yuichiro Aiba, Shinya Ariyasu, Hiroki Onoda	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 11
3. 書名 Heme-containing proteins: Structures, functions, and engineering. In Bioinorganic Chemistry and Homogeneous Biomimetic Inorganic Catalysis	

1. 著者名 莊司長三, 有安真也, 愛場雄一郎	4. 発行年 2022年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 11
3. 書名 水中有機化学反応プロセスの開発動向第22章	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------