

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2012～2016

課題番号：24225004

研究課題名(和文)小分子アルカン類を水酸化するバイオ触媒システムの分子設計

研究課題名(英文)Molecular Design of Biocatalysts for Hydroxylation of Small Alkanes

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 171,100,000円

研究成果の概要(和文)：長鎖脂肪酸を高選択的に水酸化するシトクロムP450BM3 に、パーフルオロアルキルカルボン酸(PFC)を疑似基質として取り込ませると、ガス状アルカンやベンゼンを酸化できることを明らかにするとともに、PFCのカルボキシル基をアミノ酸で修飾した第二世代のデコイ分子がガス状アルカンの水酸化活性を大幅に向上させることを見出した。また、過酸化水素駆動型P450の活性部位に、変異導入によってグルタミン酸を配置して基質の長鎖脂肪酸が結合した状態を疑似的に再現すると、非対象基質を水酸化できることを明らかにした。酸素分子を活性化する通常のP450を過酸化水素駆動型に変換できることを合わせて見出した。

研究成果の概要(英文)：Cytochrome P450BM3 (P450BM3) isolated from *Bacillus megaterium* catalyzes the hydroxylation of long-alkyl-chain fatty acids. We have demonstrated that even wild-type P450BM3 can catalyze the hydroxylation of gaseous alkanes such as ethane and propane as well as benzene by using perfluorinated carboxylic acids (PFCs) as decoy molecules. We also have demonstrated that N-perfluoroacyl amino acids strongly activate wild-type P450BM3 for the hydroxylation of inert alkanes. Furthermore, we showed that substrate-binding-state mimics of hydrogen peroxide-dependent cytochrome P450s prepared by one-point mutagenesis are able to catalyze monooxygenation of non-native substrates. The same mutation was also effective in introducing peroxygenase activity into P450BM3 and P450cam, indicating that a variety of peroxygenases 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：ヘム酵素 シトクロムP450 ガス状アルカン ベンゼン 過酸化水素 基質特異性 酸化反応

1. 研究開始当初の背景

炭素資源として近年注目を集めている天然ガスの主成分であるメタンやエタンは、不活性なため、合成反応に利用可能な誘導体への変換が求められている。特に水酸化が注目されているが、現在用いられているアルコールへの変換プロセスは、高温・高圧など過酷な反応条件が必要となるため、より温和な条件下で反応が進行する酵素および改変酵素による物質変換法の開発が求められている。

2. 研究の目的

不活性な小分子アルカン類の水酸化反応を温和な条件下で触媒する強力な反応系を開発することを研究目的として、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有する酸化酵素のシトクロム P450 (P450) に着目した。P450 は、自然界に幅広く存在するヘム酵素で、常温・常圧の温和な条件下で不活性な有機基質の水酸化反応を触媒する。しかしながら、酸化活性が高く、触媒としての利用が期待できる細菌由来の P450 は、基質選択性が高く、それらが対象とする基質以外の基質との反応効率は非常に低く、バイオ触媒として利用するためには、高い基質特異性を変換する必要があった。本研究では、メタンやエタンなどの小分子アルカン類の水酸化反応を温和な条件下で触媒する強力な人工金属酵素とその反応系を開発することを研究目的として、P450 の基質特異性の変換や反応活性向上のための活性中心の合成金属錯体による置換を行った。

3. 研究の方法

P450 は、対象とする基質が活性部位に取り込まれることを「トリガー」として反応が進行する巧妙な仕掛けが施された酵素であるため、対象とする基質とは構造が大きく異なる有機分子では、P450 のスイッチは「ON」の状態とはならず、それらの酸化反応はほとんど進行しない。P450 のスイッチを「ON」の状態とするために、対象とする基質と構造が似た「疑似基質」を P450 に取り込ませることで、反応のスイッチを強制的に常に「ON」状態にすることができ、様々な基質を酸化可能になることを利用する反応系の開発と改良を行った。また、P450 の活性中心のヘムを簡便に合成金属錯体に置換することにも取り組み、鉄制限培地では大腸菌がヘムを生合成できないことを利用する手法と、ヘムを強く結合するミオグロビンをヘム除去剤として利用する手法を新たに開発した。

4. 研究成果

(1) 疑似基質による P450BM3 の誤作動誘起とガス状アルカンとベンゼンの水酸化反応：P450BM3 は、巨大菌由来のヘム酵素で、長鎖脂肪酸のアルキル鎖末端部分を水酸化する。P450BM3 の酸化活性種生成反応では、長鎖脂肪酸の取り込みが反応を開始するトリガーになっていて、長鎖脂肪酸が P450BM3 の適切な位置に取り込まれた場合のみ酸化活性種を生成するように設計されている。長鎖

脂肪酸の末端を含めたすべての水素原子がフッ素原子に置換されたパーフルオロアルキルカルボン酸を疑似基質（デコイ分子）として取り込ませると P450BM3 が誤作動し、エタンやプロパンなどのガス状アルカンやベンゼンやトルエンなどの長鎖脂肪酸とは構造が大きく異なる基質を酸化できることを明らかにした（図 1）。

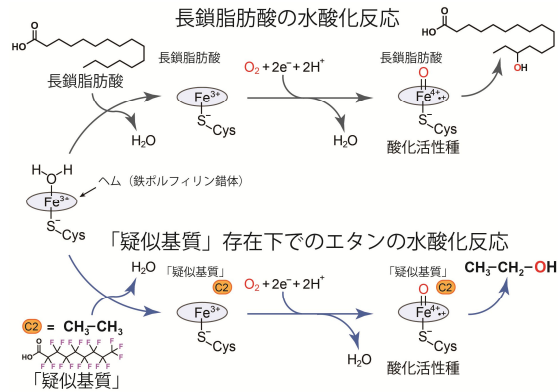


図 1 P450BM3 による長鎖脂肪酸の水酸化反応（上）と疑似基質存在下でのエタンの水酸化反応（下）

(2) 次世代疑似基質の開発と P450BM3 によるガス状アルカンの水酸化反応：疑似基質を用いる非対象基質の水酸化活性は、P450BM3 本来の長鎖脂肪酸の水酸化活性と比較すると低く、P450BM3 の高い触媒活性を十分に引き出すことはできていなかった。長鎖脂肪酸のカルボキシル基をグリシンで修飾すると P450BM3 により強く結合し、より高効率に水酸化されることが報告されていた。そこで、パーフルオロアルキルカルボン酸のカルボキシル基をアミノ酸で修飾した第二世代のデコイ分子（図 2）を設計・合成した。第二世代のデコイ分子では活性が大幅に向上し、パーフルオロノナン酸をロイシンで修飾した PFC9-L-Leu が最も高い酸化活性を示し、プロパンの水酸化は毎分 256 回転、エタンの水酸化は、毎分 45 回転で進行することを明らかにした。さらに、パーフルオロノナン酸をトリプトファンで修飾した PFC9-L-Trp を取り込んだ状態の P450BM3 の結晶構造解析にも成功し、疑似基質の末端のパーフルオロアルキル鎖は、活性部位には届いていないことなどを明らかにした。また、修飾するアミノ酸の側鎖構造の違いにより、酸化活性が大きく変化することを示した。

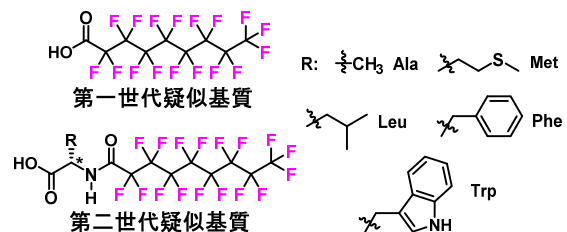


図 2 第一世代疑似基質と第二世代疑似基質の構造

(3) 高濃度酢酸存在下での過酸化水素駆動型 P450 による非対象基質の酸化反応：酸素分子を活性化する通常の P450 の反応では、高価な還元剤である NAD(P)H が消費されてしまうのとは対照的に、P450_{SPa} と P450_{BSβ} は、過酸化水素を利用して長鎖脂肪酸を水酸化する。基質のカルボキシル基が酸化活性種の生成に不可欠であるため、カルボキシル基を持たない基質に対する酸化活性はほとんどない。非対象基質（メトキシナフタレン）の酸化反応活性を酢酸濃度を变化させて調べたところ、高濃度酢酸条件下で反応が進行することを明らかにした（図 3）。酢酸を添加しない場合には、まったく反応が進行しないのに対し、酢酸濃度を上げていくと反応が進行する。スチレンのエポキシド化反応は、1 mol/L の酢酸溶液中で毎分 590 回転で進行した。活性部位に存在するカチオン性のアルギニン残基と酢酸が相互作用し、酸化活性種が生成されていると考えられる。酢酸をデコイ分子として用いる手法は、ほとんどの過酸化水素駆動型 P450 に対して有効な汎用性の高い手法と考えられる。

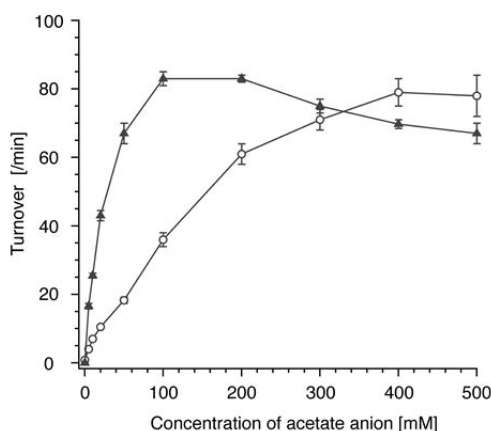


図 3 P450_{SPa} (▲) と P450_{BSβ} (○) によるメトキシナフタレンの水酸化活性と酢酸濃度の関係

(4) 過酸化水素駆動型 P450 への変換法の開発：高濃度の酢酸存在下や鎖長の短いアルキルカルボン酸などの疑似基質存在下では、長鎖脂肪酸以外の基質を酸化できることを明らかにしたが、さらに、酵素単体でも長鎖脂肪酸以外の基質を酸化できる変異体の作製に成功した。カルボキシル基を側鎖に有するグルタミン酸やアスパラギン酸を、部位特異的アミノ酸置換によりヘム近傍に導入した過酸化水素駆動型 P450 の変異体が、スチレンやインドールを酸化できることを明らかにした。さらに、同じ変異導入が酸素分子を利用する一般的な P450 に対しても有効で、たとえば、P450BM3 と P450cam が過酸化水素駆動型の触媒活性をまったく示さないのに対して、これらの対応する変異体が、過酸化水素を酸化剤とする非対象基質の酸化反応を触媒できることを明らかにした。ランダムミューテーションを繰り返す分子進化工学的手法により、いくつかの過酸化水素駆動

型の P450 が作成されているが、変異導入されたアミノ酸には規則性はみられないため、目的の P450 を過酸化水素駆動に変換するためには膨大な時間をかけて毎回ランダムミューテーションを繰り返す必要がある。一方で、今回報告した手法では、ヘム近傍の僅か一残基のアミノ酸を置換するだけで過酸化水素を利用可能な P450 を創り出すことができる。ほとんど全ての P450 に適用可能な汎用性の高い手法として確立できると考えている。

(5) ミオグロビンをヘム除去剤とする過酸化水素駆動型 P450 のヘム置換：過酸化水素駆動型 P450 のさらなる酸化活性の向上を目指し、活性中心のヘムを合成金属錯体に置換する新規手法を開発した。ヘム蛋白質の合成金属錯体による再構成は、ヘム蛋白質を酸性条件で変性させ、有機溶媒によってヘムを抽出したのち、変性蛋白をリフォールディングして合成金属錯体を挿入するのが一般的な手法であるが、酸性条件で有機溶媒を使用するヘム除去過程で、不可逆的な変性体を形成するヘム蛋白質にはこの手法が適用できないため、過酸化水素駆動型 P450 のヘムの合成金属錯体への置換は不可能であると考えられていた。ヘムを取り除いたアポミオグロビンをヘム除去剤として利用すると、温和な条件下で過酸化水素駆動型 P450 ヘムを取り除くことができることを明らかにした。アポミオグロビンをを用いる手法では、蛋白の二次構造を保った状態でヘムを取り除くことができ、さらに、合成金属錯体を取り込ませることで、合成金属錯体を活性中心とする人工金属酵素を作製可能であることを明らかにした。

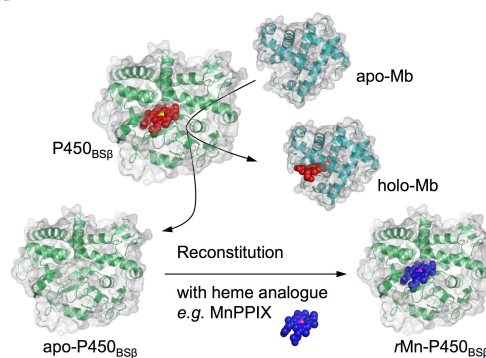


図 4 アポミオグロビン(apo-Mb)による過酸化水素駆動型 P450 (P450_{BSβ})のヘムの除去とマンガン有する合成金属錯体(MnPPIX)による P450_{BSβ}の再構成

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 22 件)

- 1) O. Shoji, Y. Watanabe, "Monooxygenation of Nonnative Substrates Catalyzed by Bacterial Cytochrome P450s Facilitated by Decoy Molecules", *Chem. Lett.*, 46, 278-288 (2017). 査読有
DOI: 10.1246/cl.160963
- 2) O. Shoji, T. Fujishiro, K. Nishio, Y. Kano, H.

- Kimoto, S. Chien, H. Onoda, A. Muramatsu, S. Tanaka, A. Hori, H. Sugimoto, Y. Shiro and Y. Watanabe, "A Substrate-Binding-State Mimic of H₂O₂-Dependent Cytochrome P450 Produced by One-point Mutagenesis and Peroxygenation of Non-native Substrates", *Catal. Sci. Tech.*, 6, 5806-5811 (2016). 査読有
DOI: 10.1039/C6CY00630B
- 3) Z. Cong, O. Shoji, C. Kasai, N. Kawakami, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, "Activation of Wild-type Cytochrome P450BM3 by the Next Generation of Decoy Molecules: Enhanced Hydroxylation of Gaseous Alkanes and Crystallographic Evidence", *ACS Catalysis*, 5, 150-156 (2015). 査読有
DOI: 10.1021/cs501592f
- 4) O. Shoji, T. Kunimatsu, N. Kawakami, Y. Watanabe, "Highly Selective Hydroxylation of Benzene to Phenol by Wild-type Cytochrome P450BM3 Assisted by Decoy Molecules," *Angew. Chem. Int. Ed.*, 52 (26), 6606-6610 (2013). 査読有
DOI: 10.1002/anie.201300282
- 5) N. Kawakami, O. Shoji, Y. Watanabe, "Direct Hydroxylation of Primary Carbons in Small Alkanes by Wild-type Cytochrome P450BM3 Containing Perfluorocarboxylic Acids as Decoy Molecules," *Chem. Sci.*, 4 (6), 2344-2348 (2013). 査読有
DOI: 10.1039/C3SC50378J
- 6) Y. Watanabe, O. Shoji, "Hydroxylation of Inert Organic Molecules by Cytochrome P450/Decoy Systems", AsBIC7, Nov. 30-Dec. 5, 2014, Gold Coast, Queensland, Australia. (Keynote lecture)
- 7) Y. Watanabe, "Molecular Design of Proteins for Future Application", The Symposium on Modern Trends In Inorganic Chemistry-XV (MTIC- XV), December 13-16, 2013, Roorkee, India. (Plenary lecture)
- 8) Y. Watanabe, O. Shoji, "Hydroxylation of Inert Organic Molecules by Cytochrome P450s Assisted by Decoy Molecules," The 2nd Japan-France Coordination Chemistry Symposium, Nov. 24-28, 2013, Nara, Japan. (Invited lecture)
- 9) Y. Watanabe, "Hydroxylation of Inert Organic Molecules by Cytochrome P450s Assisted by Decoy Molecules," The 15th Asian Chemical Congress, August 19-23, 2013, Sentosa Island, Singapore. (Invited lecture)
- 10) Y. Watanabe, "Construction of Metalloenzymes: Catalysts Embedded in Proteins," the 4th Research Symposium on Petrochemical and Materials Technology and the 18th PPC Symposium on Petroleum, Petrochemicals, and Polymers, April 23, 2013, Bangkok, Thailand. (Keynote lecture)

〔図書〕(計 5 件)

〔学会発表〕(計 10 件)

- 1) Y. Watanabe, "Decoy Systems for Small Organic Molecule Oxygenation by P450s", AsBIC8, Dec. 4-9, 2016, Auckland, New Zealand. (Invited lecture)
- 2) 渡辺芳人「金属酵素を設計する」, 生体機能関連化学部会若手の会 第 28 回サマースクール, 平成 28 年 7 月 15 日-16 日, 西浦温泉ホテルたつき, 愛知県蒲郡市. (招待講演)
- 3) Y. Watanabe, "Hydroxylation of inert organic molecules by cytochrome P450/decoy system", 250th ACS National Meeting & Exposition, Aug. 16-20, 2015, Boston, Massachusetts, USA. (Invited lecture)
- 4) Y. Watanabe, O. Shoji, "Fine Tuning of Cytochrome P450 Activities", ICBIC17, Jul. 20-24, 2015, Beijing, China. (Invited lecture)
- 5) Y. Watanabe, "Design of P450s for Artificial Substrate Oxidation", KMB 2015. 42nd Annual Meeting & International Symposium, June 23-25, 2015, Gyeongju, South Korea. (Invited lecture)
- 1) Y. Watanabe, H. Nakajima, "Creation of a Thermally Tolerant Peroxidase. In Vincent L. Pecoraro", editor: Peptide, Protein and Enzyme Design, Vol 580, MIE, UK: Academic Press, 2016, pp. 455-470.
- 2) O. Shoji, Y. Watanabe, "Oxygenation of Nonnative Substrates Using a Malfunction State of Cytochrome P450s", *Fifty Years of Cytochrome P450 Research*, Springer, 107-124 (2014).
- 3) 荘司長三, 渡辺芳人「ベンゼンをフェノールに一段階で変換する新規バイオ触媒の開発」配管技術, 日本工業出版, 2013 年 12 月号, 第 55 巻 14 号, 1-5.
- 4) 渡辺芳人, 荘司長三「酵素を“誤作動”させて行う有機合成——酵素反応を有機化学に利用するための反応制御」月刊「化学」, (株)化学同人, 2013 年 9 月号 Vol.68, 39-44 (2013).
- 5) T. Ueno and Y. Watanabe (Eds), "Coordination Chemistry in Protein Cages: Principles, Design, and Applications," Wiley, John & Sons, Incorporated,

Pages:1- 416 (2013).

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：炭化水素系基質の水酸化のための材料
およびその利用
発明者：渡辺 芳人，莊司 長三
権利者：名古屋大学
種類：特許
番号：特願 2 0 1 5 - 2 0 1 4 3 1
出願年月日：平成 2 7 年 1 0 月 9 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
名古屋大学大学院理学研究科生物無機化学
研究室
<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：1 0 2 0 1 2 4 5

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

莊司 長三 (SHOJI , Osami)
名古屋大学・理学研究科・准教授
研究者番号：9 0 3 7 9 5 8 7

(4) 研究協力者

該当なし