

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K06913

研究課題名(和文) アルカンから第一級アルコールを高選択的に生成する酵素触媒の創生

研究課題名(英文) Creation of enzymes producing primary alcohols with high selectivity from alkanes

研究代表者

宮地 輝光 (Miyaji, Akimitsu)

東京工業大学・物質理工学院・助教

研究者番号：40452023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：触媒部位近傍の官能基導入と反応場の空間サイズの制御を反応場設計指針にした酵素シトクロムP450BM-3の触媒部位近傍アミノ酸側鎖の置換を行い、直鎖アルカンから第一級アルコールを合成する酵素の創生をめざした。第一級アルコール選択性が置換するアミノ酸側鎖の分子サイズに依存することを明らかにし、この依存性に基づいて触媒部位近傍に2つのトリプトファンを導入した。その結果、直鎖アルカン酸化反応において最大51%の第一級アルコール選択性を示す酵素を創出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、直鎖アルカンから選択的に第一級アルコールを合成するバイオ触媒開発における触媒部位近傍の官能基導入と反応場の空間サイズの制御を指針とした酵素反応場設計の有効性を示したことに学術的意義がある。この酵素設計指針とノウハウは、天然ガス成分である炭素数4以下の直鎖アルカンを室温条件で第一級アルコール(1-ブタノール、1-プロパノール、エタノール、メタノール)へ変換するバイオ触媒開発にも応用可能であり、21世紀の物質社会に不可欠な省エネルギー・低環境負荷の天然ガス有効利用技術への展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to create an enzyme that produces primary alcohols from n-alkanes by substituting amino acid residues near the catalytic site of the enzyme cytochrome P450BM-3. Various enzymes introducing bulky functional groups and controlling the space size near the catalytic site of cytochrome BM-3 were synthesized and their activity for n-alkane oxidation was investigated. The selectivity for primary alcohols in the oxidation reactions depends on the molecular size of the amino acid residues introducing near the catalytic site. According to the dependency, we synthesized the enzyme introducing two tryptophan residues near the catalytic site of cytochrome BM-3. The enzyme showed primary alcohol selectivity up to 51% in n-alkane oxidation.

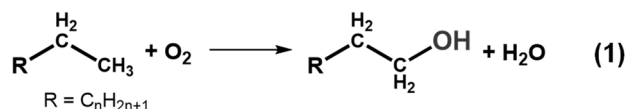
研究分野：生体触媒化学・生物物理化学

キーワード：資源有効利用 酵素 反応場設計 直鎖アルカン変換反応 第一級アルコール合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

直鎖アルカンの分子末端に位置する炭素 - 水素 (C-H) 結合へ選択的に官能基を導入する反応は、高難度な反応とされる。例えば反応式 (1) に示すような直鎖アルカンの酸化反応では、末端位置選択的にヒドロキシル基を導入することで、原理的には第一級アルコールが得られる。



しかし、実際の反応ではほとんど第一級アルコールが得られない。この理由は、メチル基 (CH₃-) の C-H 結合がメチレン鎖 (-CH₂-) の C-H 結合に比べて結合エネルギーが高く、結合の開裂が置きにくいことにある。

直鎖アルカン、なかでも炭素数 4 以下のブタン、プロパン、エタン、メタンを直接第一級アルコール (1-ブタノール、1-プロパノール、エタノール、メタノール) へ変換する反応は、天然ガス有効利用技術として重要である。

本研究では、酵素シトクロム P450BM-3 の機能を改変し、直鎖アルカンを高活性高選択的に第一級アルコールへ変換する酵素を創生することをめざす。酵素シトクロム P450BM-3 は、水中室温条件で直鎖アルカンからアルコールへの酸化反応に活性を示す省エネルギーで低環境負荷のバイオ触媒である。

酵素シトクロム P450BM-3 のタンパク質分子構造における特徴のひとつは、鉄ポルフィリン (ヘム鉄) がタンパク質に結合している点である (図 1)。このヘム鉄において、直鎖アルカンからアルコールへの酸化反応が進行する。

ただし、酵素シトクロム P450BM-3 の直鎖アルカン酸化反応で生成するアルコールは第二級アルコールである。酵素シトクロム P450BM-3 を水中室温での直鎖アルカンから第一級アルコールの合成に用いるには、酵素機能の改変が必要になる。

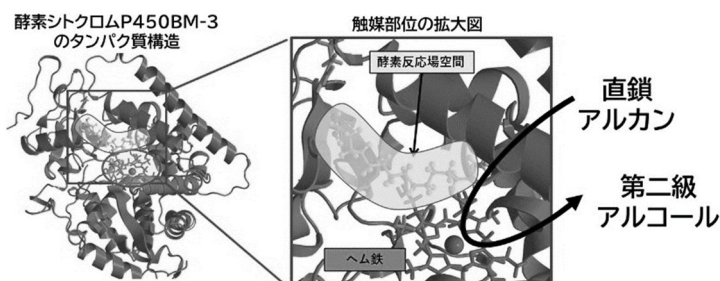


図 1 酵素シトクロム P450BM-3 のタンパク質構造と触媒部位

この酵素機能改変には 触媒部位近傍の官能基導入 と 反応場の空間サイズの制御 が重要であると着想した。

触媒部位近傍の官能基導入 が直鎖アルカン酸化反応のアルコール位置異性体への選択性に及ぼす影響は、ヘム鉄と同じポルフィリン骨格をもつマンガンポルフィリンで報告されている。マンガンポルフィリンに芳香族官能基を導入すると、第一級アルコールへの位置選択性が增大する (B. R. Cook et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 7281 (1986))。同様の触媒部位近傍の分子設計を酵素シトクロム P450BM-3 に適用できれば、室温で選択的に第一級アルコールを合成する酵素に改変できると着想した。具体的には、図 2 に示すように触媒部位のヘム鉄近傍へ、芳香族のような嵩高い官能基を複数導入することで、第一級アルコールへの選択性向上をねらえると考えた。

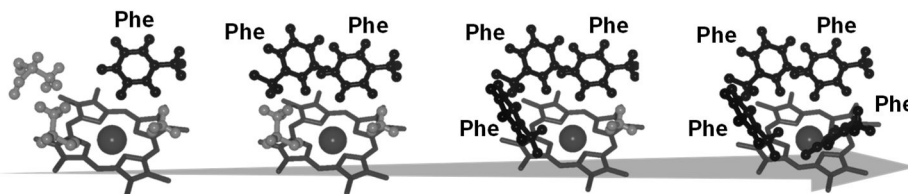


図 2 芳香族アミノ酸側鎖フェニルアラニン (Phe) の導入数を変えた酵素シトクロム P450BM-3 触媒部位近傍の模式図

反応場の空間サイズ が直鎖アルカンからアルコール異性体への選択性に及ぼす影響は、炭素数 1 のメタンを含む種々のアルカンを酸化する酵素において報告している (A. Miyaji, *J. Jpn. Petrol. Inst.*, **59**, 35 (2016))。アルカン分子体積が酵素反応場空間容積の 60-70% に相当すると、アルコール位置異性体への高い選択性を示すことを見出している。

そこで本研究では、触媒部位近傍の官能基導入 と 反応場の空間サイズの制御 をタンパク質分子設計指針として、酵素シトクロム P450BM-3 反応場を構成するアミノ酸側鎖をよりかさ高いアミノ酸側鎖に置換した酵素を合成する。これら酵素の直鎖アルカン酸化反応への活性、お

よびアルコール位置異性体への選択性を調べ、直鎖アルカンから第一級アルコールを合成する酵素反応場の構築をめざす。

2. 研究の目的

直鎖アルカンから第一級アルコールを選択的に生成する酵素反応場の構築を目的とする。そのため、触媒部位近傍において置換するアミノ酸側鎖数、位置、種類が炭素数直鎖アルカン酸化反応におけるアルコール位置異性体への選択性に及ぼす影響を明らかにする。本研究成果により、水中室温でのアルカン酸化反応における第一級アルコールの高効率で合成できる酵素触媒の創生をめざす。

3. 研究の方法

かさ高いアミノ酸側鎖を触媒部位近傍に導入したシトクロム P450BM-3 の合成には、大腸菌細胞内のタンパク質合成系を利用した。37 の LB 培養液で大腸菌を培養し、遠心分離で菌細胞を回収した。回収した菌細胞を超音波により破碎することで、細胞内のタンパク質を分離した。このタンパク質から、アフィニティーカラム Profinity IMAC (BioRad) にを用いて酵素シトクロム P450BM-3 を精製した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動および紫外可視吸収スペクトルによって酵素の純度と量を分析した。

調製したシトクロム P450BM-3 を用いて直鎖アルカン酸化反応を行った。酵素シトクロム P450BM-3 および直鎖アルカンを溶解したリン酸緩衝液を密封した反応ガラス管を、30 の温浴に設置した。シリンジを用いて反応管に NADH 水溶液を添加することで反応を開始した。生成したアルコールの量、およびアルコール位置異性体の存在比をガスクロマトグラフィーにより測定した。

シトクロム P450BM-3 触媒部位への直鎖アルカン結合状態をシミュレートするため、ドッキングシミュレーションソフト AutoDock を用いた。

4. 研究成果

(1) かさ高い芳香環やアルキル鎖を触媒部位近傍に導入した酵素シトクロム P450BM-3 の調製

触媒近傍 2 カ所のアミノ酸側鎖 (アラニン 328、アラニン 82) をかさ高い芳香環 (トリプトファン、フェニルアラニン) やアルキル鎖 (ロイシン、イソロイシン) に置換した酵素を合成した。結果、活性を保持した状態でアミノ酸側鎖 1 カ所および 2 カ所置換した種々酵素を得ることに成功した。ただし、2 カ所と共にトリプトファンに置換した酵素は得られなかった。この時、合成したタンパク質は大腸菌細胞内で凝集し、酵素機能に必要なタンパク質立体構造を形成しないことが確認された。この結果は、触媒部位近傍にかさ高さ、あるいは疎水性の高いアミノ酸側鎖を導入したことでタンパク質の立体構造が保持できなくなったと考えられる。

上記 2 カ所に加え、さらにスレオニン 268 を高い芳香環 (トリプトファン、フェニルアラニン) やアルキル鎖 (ロイシン、イソロイシン) に置換したシトクロム P450BM-3 の合成を試みた。しかし、これら酵素は得られなかった。これらタンパク質合成においても、合成したタンパク質は大腸菌細胞内で凝集し、酵素機能に必要なタンパク質立体構造を形成しないことが確認された。3 カ所以上、かさ高いアミノ酸残基に置換することでタンパク質の立体構造が保持できなくなったと考えられる。

以上の結果から、触媒近傍 1 カ所および 2 カ所のアミノ酸側鎖 (アラニン 328、アラニン 82) をかさ高い芳香環 (トリプトファン、フェニルアラニン) やアルキル鎖 (ロイシン、イソロイシン) に置換した酵素を用いて直鎖アルカン酸化反応実験を行った。

(2) 直鎖アルカン酸化反応におけるアルコール位置異性体への選択性の時間依存性

酵素シトクロム P450BM-3、およびで合成に成功したアミノ酸置換型酵素について、直鎖アルカン酸化反応を行った。合成した酵素は全て、炭素数 5 ~ 8 の直鎖アルカン酸化反応に活性を示した。

反応において生成するアルコール生成量の時間変化、およびアルコール位置異性体分布の時間変化を測定した。一例として直鎖オクタン酸化反応の結果を図 3 に示す。シト

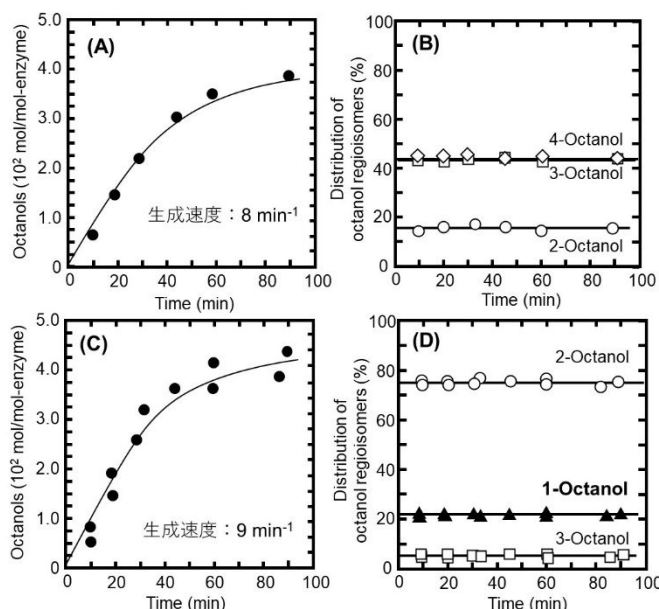


図 3 酵素シトクロム P450BM-3(A)(B)およびアミノ酸置換型酵素(C)(D)の直鎖オクタン酸化反応におけるオクタンール生成量(A)(C)およびオクタンール位置異性体分布(B)(D)の時間変化

クロム P450BM-3、および で合成に成功したアミノ酸置換型酵素ではいずれの場合も、反応時間に伴いアルコール生成量は増大した。その生成速度は反応開始後 40 分まではほぼ一定で、その後次第に低下した(図 3 (A) (C))。また、反応を通してアルコール位置異性体の分布は一定であった(図 3 (B) (D))。

4 - (1) で合成に成功したアミノ酸置換型酵素は、酵素シトクロム P450BM-3 のアルコール位置異性体への選択性と比べてアルコール異性体への選択性が多様に変化した。すなわち、標的とした 2 箇所のアミノ酸側鎖(アラニン 328、アラニン 82)は、アルコール位置異性体への選択性に強く影響を及ぼすことがわかった。

第一級アルコールへの選択性を比較した結果、アラニン 328 をロイシン、アラニン 82 をトリプトファンに置換した酵素による直鎖オクタン酸化反応において、最も高い第一級アルコールへの選択性を示した。このとき、1-オクタノールが選択率 21%であった。

一方、直鎖オクタンより炭素数の小さい直鎖アルカンの酸化反応における生成物選択性を明らかにするため、4 - (1) で調製した酵素を用いて直鎖ヘキサノール酸化反応を行った。その結果、直鎖オクタン酸化反応の場合とは異なり、直鎖ヘキサノール酸化反応では 2-ヘキサノールへの選択性が高くなることがわかった。これは、直鎖アルカンの炭素数をオクタンより小さくすることで、さらにアミノ酸側鎖の置換部位とその種類の検討を要することを示唆している。

(3) 酵素シトクロム P450BM-3 に導入したアミノ酸側鎖の分子体積が直鎖アルカン酸化反応におけるアルコール位置異性体への選択性に及ぼす影響

4 - (2) の結果に基づき、2 カ所のアミノ酸側鎖に導入するアミノ酸側鎖の分子体積がアルコール位置異性体への選択性に及ぼす影響を調べた。その結果、図 4 に示すように、1-オクタノールへの選択性は導入するアミノ酸側鎖の分子体積に依存することがわかった。この依存性から、1-オクタノールへの選択性が最も高いのは 2 カ所にトリプトファンを導入した場合であることがわかった。この結果は、アラニン 328 とアラニン 82 の両側鎖をトリプトファンに置換することで、1-オクタノールへの選択性がさらに増大する可能性があることを示唆していた。

アラニン 328 のロイシン置換とアラニン 82 のトリプトファン置換が 1-オクタノール選択性に及ぼす影響を明らかにするため、導入したトリプトファンが酵素基質結合部位への直鎖オクタンの結合状態に及ぼす影響を明らかにするため、Autodock によるドッキングシミュレーションを行った。その結果、導入したトリプトファンのインドール環およびフェニルアラニン 87 の芳香環が直鎖オクタンと相互作用することで、直鎖オクタン末端炭素がヘム鉄へ近接する結合状態を安定化できる可能性が示唆された。

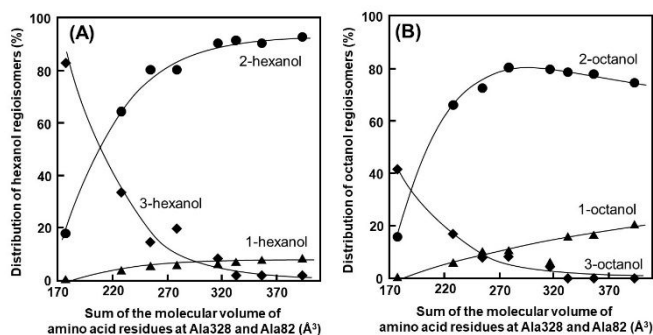


図 4 酵素シトクロム P450BM-3 の触媒部位近傍に導入するアミノ酸側鎖の体積がアルコール異性体への選択性に及ぼす影響
(A)ヘキサノール酸化反応 (B)オクタン酸化反応

(4) 2 カ所のアミノ酸側鎖をトリプトファンに置換した酵素の合成と直鎖オクタン酸化反応

4 - (3) の結果に基づけば、アラニン 328 とアラニン 82 を天然アミノ酸側鎖の中で最もかさ高い側鎖をもつトリプトファンに置換することができれば、第一級アルコールへの選択性向上が見込める。しかしこの置換酵素は 4 - (1) の結果において合成することができなかった。そこで合成条件を検討することを目的に、大腸菌培養温度や培養液成分が酵素合成に及ぼす影響を調べた。結果、2 カ所のアミノ酸側鎖をトリプトファンに置換した酵素の合成に成功した。

この酵素の直鎖オクタン酸化反応を行い、オクタノール位置異性体への選択性を調べた結果、1-オクタノール選択率は 51%に達した。すなわち、本研究において最も高い 1-オクタノール選択性を示す酵素を得ることに成功した。同様に、直鎖ヘキサノール酸化反応における 1-ヘキサノール選択率も最高値の 18%に達した。

本研究成果により、触媒部位近傍の官能基導入 と 反応場の空間サイズの制御 を指標とした酵素反応場の分子設計により、第一級アルコール選択的な直鎖アルカン変換反応を実現する酵素を構築できることを示した。この酵素設計指針に基づき、省エネルギーで低環境負荷のバイオ触媒開発への発展が期待できる。

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 2件）

1. 著者名 Miyaji Akimitsu, Furuya Daiki, Orita Izumi, Baba Toshihide	4. 巻 11
2. 論文標題 Growth-promoting effect of cyanocobalamin on Methylosinus trichosporium OB3b culture under high copper concentration for methanol synthesis from methane	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioresource Technology Reports	6. 最初と最後の頁 100473 ~ 100473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biteb.2020.100473	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 Miyaji Akimitsu, Satou Keita, Baba Toshihide	4. 巻 323
2. 論文標題 Influence of tryptic hydrolysis on the enzymatic function of the membrane-bound form of particulate methane monooxygenase from Methylosinus trichosporium OB3b	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biotechnology	6. 最初と最後の頁 98 ~ 106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiotec.2020.08.006	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 MIYAJI Akimitsu	4. 巻 64
2. 論文標題 Methanol Biosynthesis from Methane Using Methylosinus trichosporium OB3b Grown in Medium Containing High Copper Concentration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the Japan Petroleum Institute	6. 最初と最後の頁 29 ~ 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1627/jpi.64.29	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Miyaji Akimitsu, Nitta Muneyuki, Baba Toshihide	4. 巻 1
2. 論文標題 Influence of copper ions removal from membrane-bound form of particulate methane monooxygenase from Methylosinus trichosporium OB3b on its activity for methane hydroxylation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biotechnology: X	6. 最初と最後の頁 100001 ~ 100001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.btecx.2018.100001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyaji Akimitsu, Baba Toshihide	4. 巻 1878
2. 論文標題 Influence of amino acid residues near the active site of cytochrome P450 from <i>Bacillus megaterium</i> on the selectivity of n-octane oxidation to octanol regioisomers	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 AIP Conference Proceedings	6. 最初と最後の頁 20001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5000169	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 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 宮地輝光・古谷大稀・馬場俊秀
2. 発表標題 高濃度銅イオン共存下でのメタン変換生体触媒の調製
3. 学会等名 第126回 触媒討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮地輝光・古谷大稀・折田和泉・馬場俊秀
2. 発表標題 ビタミン B12 によるメタン資化性菌 <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b の増殖促進
3. 学会等名 第50回 石油・石油化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮地 輝光
2. 発表標題 メタンあるいは低級アルカン有効利用への生体触媒利用
3. 学会等名 第124回 触媒討論会 「水素 + 天然ガス + 燃料電池 + コンピュータ」研究会横断若手シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮地 輝光・テキ プンカ・ガンスフ ゲレル・馬場 俊秀
2. 発表標題 シトクロムP450BM-3変異体の直鎖アルカンからアルコール異性体への選択性にパーフルオロアルカン酸が及ぼす影響
3. 学会等名 第122回 触媒討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮地 輝光・テキ プンカ・馬場 俊秀
2. 発表標題 アミノ酸側鎖を置換したシトクロムP450 BM-3による直鎖オクタンから1-オクタノールへの酸化反応
3. 学会等名 第120回 触媒討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akimitsu Miyaji, Toshihide Baba
2. 発表標題 Influence of amino acid residues near the active site of cytochrome P450 from <i>Bacillus megaterium</i> on the selectivity of n-octane oxidation to octanol regioisomers
3. 学会等名 The 3rd International Conference on Chemical Engineering, Food and Biotechnology (ICCFB2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akimitsu Miyaji
2. 発表標題 Lower alkane oxidation in bacterial cells
3. 学会等名 47th Petroleum-Petrochemicals Symposium of JPI 4th KSIEC-JPI Joint Presentation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Toshihide Baba, Akimitsu Miyaji	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer, Singapore	5. 総ページ数 220
3. 書名 Catalysis and the mechanism of methane conversion to chemicals: C-C and C-O bonds formation using heterogeneous, homogenous, and biological catalysts	

〔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
---------	---------