

平成 22年 5月 1日現在

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. 研究計画の概要

不活性なアルカン類の水酸化反応を触媒する P450 は、その高い酸化能力から、合成反応への応用を意識した研究が世界中で展開されているが、P450 による反応系の最大の問題点は、「非常に高価な NADH や NADPH を基質に対して等モル量消費する」点にある。合成反応への応用を考えると、安価な過酸化水素を酸化剤として用いる酵素系の創出が必須条件であり、上記の背景を意識して、基礎的な研究成果を基盤に、実用化に向けた酸化酵素の創成を研究目的とした。また、ミオグロビンのヘム近傍構造を設計することによって作り出した酸素添加酵素の活性は、蛋白質の分解反応によって数分で失活するなどの問題点を含んでいた。そこで、酵素活性の高い系の構築と酵素の耐久性向上をめざす新たな研究課題の提案をするに至った。

2. 研究の進捗状況

(1) P450<sub>BSP</sub> は基質であるパルミチン酸など長鎖脂肪酸のカルボキシル基をヘム近傍に存在するアルギニンとの相互作用によって固定化し、位置選択的な水酸化反応を触媒する。この作用機構のために、P450<sub>BSP</sub> は長鎖脂肪酸以外の有機基質を酸化することは出来ない。これに対して、炭素数5から7のカルボン酸(擬似基質)が酵素に取り込まれると、自分自身は水酸化されずに、外来基質が酸化を受けるといった反応系を見いだした。この反応系によって、スチレンやエチルベンゼンの酸化反応が進行する事を明らかにした。さらに、基質フリー及び擬似基質結合型 P450<sub>BSP</sub> の結晶構造を明らかにすることが出来た。両者は基

質結合型 P450<sub>BSP</sub> とほぼ同じ構造を取っていたが、擬似基質はカルボン酸部分の電子密度しか観測できず、アルキル部分は自由に動いているものと考えられる事から、「擬似基質は、ヘム上部に固定化されていないために酸化されない」というこれまでの仮定と一致することが明らかとなっている。

(2) 基質を反応場に適切に固定化することが出来れば、ミオグロビン変異体でも芳香環の水酸化反応が可能であると考え、活性部位近傍に基質固定化部位としてアルギニンを導入した変異体 H64D/T67R/V68I を作成した。そして、①カルボキシル基を有する抗炎症薬の(S)-ナプロキセンの芳香環が水酸化され、②アルギニンの導入によってその酸化活性が高くなることを明らかにした。さらに、アルギニンミュータントのみが、ナプロキセンの(R)体と(S)体の識別を行うことも見いだしている。

(3) 高度好熱菌 *T. thermophilus* 由来電子伝達タンパク質、シトクロム *c*<sub>552</sub> を利用した耐熱性ペルオキシダーゼの構築を目指し、一般酸塩基触媒部位として機能することを期待して、ヘム鉄の上方およそ 5.2 Å に位置する Val49 をアスパラギン酸に置換した。調製した変異体 (V49D/M69A) の触媒活性は、温度の上昇に伴って増大し、70°C で最高の活性を示すことが明らかとなっている。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している  
ミオグロビンやシトクロム *c*<sub>552</sub> を用いて、酵素の耐久性や選択性を向上させる研究につ

いては、「当初の目標に向けて順調に研究が進展」と自己評価している。一方、P450<sub>BSP</sub>を用いた酵素本来の基質とは異なる有機基質の酸化に関しては、下記にまとめたように当初の目標を超えて研究が展開し始めている。

1) 長鎖脂肪酸の酸化に関与する他のP450への拡張

長鎖脂肪酸を酸化するP450<sub>SPa</sub>とP450<sub>BM3</sub>でも、擬似基質が機能することを明らかにした。また、基質結合型P450<sub>SPa</sub>の結晶構造解析に成功した。

2) P450のヘムを他の金属錯体に置き換える  
P450<sub>BSP</sub>は酸性条件および有機溶媒に対して不安定であり、既報の方法ではヘムを取り除くことができなかつたが、セラチア菌や緑膿菌などが、鉄を獲得するために分泌するHasAと呼ばれる蛋白質を用いて、P450<sub>BSP</sub>からヘムを抜く条件を見つけることが出来た。現在、アポP450<sub>BSP</sub>を再構成する条件の検討に入っている。P450<sub>BSP</sub>のヘムを人工金属錯体に置換することができれば、過酸化水素を取り込むことができる蛋白骨格を利用する新たな反応系へと展開できると期待している。

#### 4. 今後の研究の推進方策

P450<sub>BSP</sub>と同様に、長鎖脂肪酸を水酸化するP450<sub>SPa</sub>に対しても「擬似基質」による反応系が構築できることと、アミノ酸の置換と擬似基質を組み合わせることで反応空間を修飾し、非常に高い活性を保ちながら酸化生成物の不斉制御が可能なことを見だし、また、P450<sub>SPa</sub>の高分解結晶構造解析に成功しており（分解能1.65Å）、得られた結晶構造に基づいて反応空間を設計することで、アルカンの水酸化に対し高い活性を示す反応系を構築し、実用化に向けたバイオ触媒系を創成する。

#### 5. 代表的な研究成果

（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9件）

① 中島洋、Ramanathan Kalaivani、川場直美、渡辺芳人、Rational engineering of *Thermus thermophilus* cytochrome *c*<sub>552</sub> to a thermally tolerant artificial peroxidase. *Dalton Transactions*, **39**, 3105-3114, (2010) 査読有り

② 中島洋、市川祐介、佐竹由宇、高谷信之、Manna Kanti Soumen、Rajbongshi Jitumani、Mazumdar Shyamalava、渡辺芳人、Engineering of *Thermus thermophilus* cytochrome *c*<sub>552</sub>: Thermally tolerant artificial peroxidase, *ChemBioChem*, **9**, 2954-2957, (2008) 査読有り

③ 荘司長三、藤城貴史、中島洋、金美沙、永野真吾、城宜嗣、渡辺芳人、Hydrogen peroxide dependent monooxygenations by tricking the substrate recognition of cytochrome P450<sub>BSP</sub>, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 3656-3659 (2007) 査読有り

〔学会発表〕（計190件）

① 渡辺芳人、荘司長三、藤城貴史、中島洋、Hydrogen peroxide-dependent monooxygenations of non-natural substrates induced by a substrate-misrecognition of cytochrome P450<sub>BSP</sub>, International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, 2008年7月6日-11日、ロシア（モスクワ）

〔図書〕（計4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（第2版）、講談社サイエンティフィク、2009年、297頁

〔その他〕

ホームページ

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