

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：若手研究(A)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21685018

研究課題名（和文）酵素の基質誤認識を利用するバイオ触媒の創成

研究課題名（英文）Construction of biocatalysts based on substrate misrecognition of enzymes

研究代表者

荘司 長三 (SHOJI OSAMI)

名古屋大学・理学研究科・助教

研究者番号：90379587

研究成果の概要（和文）：本来対象とする基質に構造がよく似たおとりの分子（デコイ分子）を酸素原子添加酵素のシトクロム P450 に取り込ませて基質誤認識を誘導することにより、アミノ酸置換を施すこと無しに、対象基質とは全く構造の異なる基質を酸化することができるバイオ触媒系を開発することに成功した。天然酵素の基質特異性が大幅に変更できるだけでなく、取り込ませるデコイ分子の構造の違いにより酸化反応の酸化活性とエナンチオ選択性が制御可能であることを示した。

研究成果の概要（英文）：We have demonstrated that the substrate specificity of cytochrome P450s can be altered by inducing their substrate misrecognition using a decoy molecule that has a structural similarity to those of natural substrates. Accordingly, we have succeeded in constructing a novel reaction system that catalyzes oxidation reactions of non-natural substrates without any mutagenesis. Notably, our reaction system can alter the enantioselectivity of products just by changing the structure of the decoy molecules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
総計	12,200,000	3,660,000	15,860,000

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：酵素化学

1. 研究開始当初の背景

常温、常圧の温和な条件下で反応を行うことが可能となる酵素を合成反応に利用できれば、環境負荷の低い理想的な反応系を構築することができる。生物界に広範に存在するシトクロム P450 (P450)は、薬物代謝や解毒、ホルモンの生合成などに関連した不活性化有機基質を水酸化する強力なヘム酵素群で、その有機合成反応への利用が期待されてきた。細菌由来 P450 の触媒活性は、動物や植

物由来の P450 に比べて非常に高く、薬剤中間体合成の触媒として有望視されてきた。しかしながら、細菌由来の P450 は、基質特異性が高く、対象とする基質以外に対する酸化活性は極端に低い。P450 が高い基質特異性を示す主な理由は、酸化反応を開始する第一段階が、対象とする基質の取り込みをトリガーとして始まることに起因する。対象とする基質と構造が大きく異なる場合には、P450 に取り込まれたとしても酵素のスイッチを ON の

状態にすることができないために酸化活性は低くなる。P450 では、「酸化される基質」と「酸化反応のスイッチを ON にする物質」（活性化因子）が同一であるために、高い基質特異性を示す設計となっている。そこで、対象とする基質が担うこの二つの役割を分離し、活性化因子としての役割だけの分子を P450 に取り込ませて、酸化反応の第一段階をスタートさせることができれば、本来の対象基質と異なる幅広い基質の酸化反応を行うことができると考えた。活性化因子として、対象とする基質に構造がよく似てはいるけれどもそれ自体は酸化の対象とはならず、P450 の活性化のみをスタートさせる疑似基質（「デコイ分子」と名付けた）を反応系に添加する新しいバイオ触媒系を発想するに至った。

2. 研究の目的

基質特異性の高い細菌由来 P450 に対してそれらが対象とする基質に構造がよく似た疑似基質（デコイ分子）を添加することで、変異導入を一切施すこと無しに酵素の基質特異性を大きく変更できる新規酵素機能改変手法を確立すると同時に、難易度の高いガス状アルカンの水酸化反応を達成することを研究の目的とした。

3. 研究の方法

大腸菌を宿主とする蛋白質発現系によりシトクロム P450 を過剰発現させ、各種クロマトグラフィーにより単離、精製した。酸化反応は反応生成物を、ガスクロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーにより定量し酵素活性を評価した。結晶構造解析は、理化学研究所の城研究室との共同研究により、大型放射光施設 SPring-8 で蛋白質結晶の X 線回折を測定し、結晶構造解析を行った。

4. 研究成果

(1) P450 の酸化活性種(オキソフェリルポルフィリン π -カチオンラジカル:Compound I)の生成には、電子伝達蛋白質を介した NAD(P)H からの電子供給とプロトンチャネルを介した外部からのプロトン供給が必須であるが、P450_{BS β} は例外的に過酸化水素によって酸化活性種を生成し、長鎖脂肪酸の水酸化反応を触媒する。P450_{BS β} の基質特異性は非常に高く、通常は長鎖脂肪酸以外の基質を水酸化することはできない。パルミチン酸結合型の結晶構造解析から、長鎖脂肪酸のカルボキシル基がヘム近傍の 242 番目のアルギニンと静電相互作用して固定され、このカルボキシル基が過酸化水素を用いた酸化活性種生成において一般酸塩基触媒として機能するために、高

い基質特異性を示すことが明らかとなっていた。デコイ分子としてアルキル鎖長の短いカルボン酸を取り込ませて反応のスイッチを強制的に常時 ON の状態にすると、エチルベンゼンやスチレンの酸化反応が進行することを明らかとした。P450_{BS β} 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、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することも見出した。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することも明らかにした。

(2) P450_{BS β} の反応溶液に対して疑似基質を添加するのみで、様々な酸化反応が進行することを見出したが、疑似基質がどのように取り込まれて P450_{BS β} を活性化しているのかは明らかではなかった。疑似基質が取り込まれた状態を明らかにするために、デコイ分子と P450_{BS β} の共結晶化を試み、炭素数 7 のヘプタン酸との共結晶化に成功した。X 線結晶構造解析の結果、ヘプタン酸は、長鎖脂肪酸と同じ位置に取り込まれ、ヘプタン酸のカルボキシル基が過酸化水素の活性化に寄与する位置に配置されていることを原子レベルで明らかにした。

(3) P450_{BS β} と同じく過酸化水素を利用することができる P450_{SP α} は、過酸化水素駆動型の P450 として初めに報告された P450 であったが、これまでにその結晶構造は報告されていなかった。P450_{SP α} の高分解能 X 線結晶構造解析に成功し、P450_{SP α} が P450_{BS β} 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_{BS β} と P450_{SP α} の構造の比較により P450_{SP α} が選択的に長鎖脂肪酸の α 位を水酸化する仕組みは、長鎖脂肪酸の取り込みチャネルの違いに起因することを提案した。そして、カルボキシル基を有するデコイ分子存在下で、P450_{SP α} によるスチレンのエポキシ化反応が可能となることを見出した。また、生成物のキラリ選択性とデコイ分子の構造の関連を調べ、イブプロフェンなどの α 位の不斉が生成物のキラリティーに大きな影響を及ぼすことを明らかにした。さらに、

(R)-イブプロフェン結合型の結晶構造解析により、(R)-イブプロフェンが P450_{SPa} に取り込まれている状態を明らかにした。

(4) 酸素分子を還元的に活性化する通常の P450 も、基質の取り込みが反応を開始するトリガーとなっている。そこで、デコイ分子を利用する手法を P450 の中でも最大の活性を示す P450BM3 に適用した。P450BM3 は、長鎖脂肪酸の末端を水酸化する酵素で、結晶構造解析から長鎖脂肪酸は、その末端がヘムの上方に配置されるように取り込まれる。P450BM3 に対するデコイ分子として、それ自身が酸化されない条件を満たすために、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利用することを考えた。また、活性部位に酸化される基質が結合できる空間を確保するために、P450BM3 が酸化の対象とする炭素数 16 のパルミチン酸よりも鎖長が短い一連のパーフルオロアルキルカルボン酸を添加して、ガス状飽和炭化水素の水酸化を検討した。野生型 P450BM3 は、通常、プロパンやブタンなどのガス状アルカンを水酸化することはできないが、パーフルオロアルキルカルボン酸をデコイ分子として添加すると、野生型 P450BM3 でも、プロパンやブタンを水酸化できることを明らかにした。また、アルカンの分子サイズに依存して、最大活性を与えるパーフルオロアルキルカルボン酸のアルキル鎖長が変化し、プロパンの水酸化では炭素数 10、ブタンとシクロヘキサンでは炭素数 9 のパーフルオロカルボン酸を添加したときに最大の活性を示し、プロパンのような小さなアルカン分子の場合には鎖長の長いデコイ分子、シクロヘキサンのような比較的大きなアルカンの場合には鎖長の短いデコイ分子が効果的に機能することを見出し、デコイ分子により P450BM3 の反応空間を制御できることを示した。

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 9 件)

- 1) T. Fujishiro, O. Shoji, N. Kawakami, T. Watanabe, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, "Chiral-Substrate-Assisted Stereoselective Epoxidation Catalyzed by H₂O₂-Dependent Cytochrome P450_{SPa}"

Chem. Asian J. (2012), *in press*. 査読有
DOI:10.1002/asia.201200250

- 2) 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," *Catal. Sci. & Tech.*, 2, 739-744 (2012). 査読有 DOI:10.1039/C2CY00427E
- 3) T. Fujishiro, O. Shoji, S. Nagano, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, "Crystal Structure of H₂O₂-dependent Cytochrome P450_{SPa} with its Bound Fatty Acid Substrate: Insight into the Regioselective Hydroxylation of Fatty Acids at the α Position," *J. Biol. Chem.* 286, 29941-29950 (2011). 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M111.245225
- 4) 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
- 5) O. Shoji, Y. Watanabe, "Design of H₂O₂-Dependent Oxidation Catalyzed by Hemoproteins," *Metallomics*, 3, 379-388 (2011). 査読有
DOI: 10.1039/c0mt00090f
- 6) 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
- 7) 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

- 8) 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

- 9) 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

[学会発表] (計 19 件)

- 1) 莊司長三 「長鎖脂肪酸水酸化酵素の基質誤認識誘導によるガス状アルカンの水酸化反応」, 日本化学会第 92 春季年会 (2012), 平成 24 年 3 月 25–28 日, 横浜. (依頼講演)
- 2) 莊司長三, 渡辺 芳人 「疑似基質による酸化酵素の誤作動とガス状アルカンの水酸化反応」, 平成23年度 高難度選択酸化反応研究会シンポジウム, 平成24年1月28日, 東京. (依頼講演)
- 3) 莊司長三 「水分子の排除をトリガーとするシトクロム P450 の水酸化反応と疑似基質による基質多様性付加」, 中性子産業利用促進協議会 生体構造研究会, 平成 23 年 12 月 19 日-20 日, 茨城県那珂郡東海村. (依頼講演)
- 4) O. Shoji, "Creating Semi-Artificial Enzymes by Tricking the Substrate Recognition of Cytochrome P450BS β ", 7th joint IRTG Symposium University of Münster and Nagoya University, May 1-2, 2009, Münster, Germany. (Invited lecture)

[図書] (計 2 件)

- 1) 渡辺 芳人, 莊司長三 「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ク, 第2版 60–77 (2009).
- 2) 渡辺 芳人, 莊司長三 「ヘム酵素の創成」 酵素工学ニュース, 酵素工学研究会誌 第 61号, 6–12 (2009).

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: ヘム蛋白質のヘム置換法
発明者: 渡辺 芳人, 莊司長三, 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, 莊司長三, 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
莊司 長三 (SHOJI OSAMI)
名古屋大学・理学研究科・助教
研究者番号: 90379587

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 連携研究者
該当なし