

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23760739

研究課題名(和文) 酵素活性部位の空洞構造が直鎖アルカンからの選択的アルコール異性体生成に及ぼす影響

研究課題名(英文) Influence of the cavity structure of enzymic active sites on the selectivity for alcohol isomers from n-alkane

研究代表者

宮地 輝光 (Miyaji, Akimitsu)

東京工業大学・総合理工学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40452023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：酵素活性部位のタンパク質分子空洞が示す直鎖アルカン認識機能に影響を及ぼす空洞の分子構造を明らかにするため、鉄含有メタン酸化酵素、銅含有メタン酸化酵素、アンモニア酸化酵素、シトクロムP450BM-3による直鎖アルカンからアルコール異性体への選択性を明らかにした。これら酵素の生成物選択性と活性点分子構造から、空洞容積と空洞表面を形成するアミノ酸側鎖の種類が、活性点への直鎖アルカンの分子配向認識に大きく影響を及ぼすことを示した。

研究成果の概要(英文)：Regio- and enantioselectivities for alcohol isomers from n-alkanes by soluble methane monooxygenase, particulate methane monooxygenase, ammonia monooxygenase, and cytochrome P450 BM-3 were measured for investigating the influence of cavity structure of enzymic active site on n-alkane recognition at the active site. From the selectivity, orientation of n-alkanes at the active site of enzymes was determined. According to the active site structure of the enzymes used here, we revealed that n-alkane recognition was dependent on the volume of active site cavity and the properties of amino acid residues composing the cavity.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス・化学工学 触媒・資源化学プロセス

キーワード：分子認識 生成物選択性 酵素反応 直鎖アルカン アルコール異性体

1. 研究開始当初の背景

選択的な分子変換には、分子の配向を認識する触媒反応場が必要である。分子配向の認識は、反応分子と触媒分子との間に作用する分子間力に起因する。したがって、直鎖アルカンのような弱い分子間力(ファンデルワールス力)のみが作用する反応分子を認識することは難しく、例えば、*n*-アルカンから位置・立体選択的にアルコールを生成する反応は極めて難度が高い。

弱い分子間力が有効に作用する触媒反応場は、その分子形状が反応分子の形状と相補的である場合と考えられている。生物由来の触媒である「酵素」の高い基質特異性および生成物選択性は、反応場-反応分子の間の高い相補性に起因すると考えられている。

ところが申請者は、銅含有メタン水酸化酵素(pMMO)において、活性部位と相補性の低い低級 *n*-アルカンから選択的にアルコール異性体が生成することを見出した。pMMOの活性部位はメタンへの特異性が高いため、その活性部位はメタン分子と高い相補性もつと考えられる。一方、炭素数 2-5 の直鎖アルカンは pMMO の非特異的基質であるため *n*-アルカンと pMMO 活性部位との相補性は低いと考えられる。ところが、pMMO による *n*-ブタンおよび *n*-ペンタン酸化反応では、選択的に *R* 体の 2-アルコールが生成した。この結果は、活性部位と分子形状の相補性が低い *n*-アルカンからアルコールへの位置・立体選択性の発現には、分子形状の相補性とは異なる、酵素活性部位の分子構造因子が関わることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、*n*-アルカンの分子配向認識に、アルカン酸化酵素活性部位の空洞の奥行きと容積が及ぼす影響を明らかにするため、酵素活性部位の空洞奥行きと容積とが既知のアルカン酸化酵素の低級 *n*-アルカン酸化反応におけるアルコール位置・立体異性体への選択性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

酵素活性部位の空洞奥行きと容積を算出するため、タンパク質立体構造情報が得られる、あるいはアミノ酸配列相同性からタンパク質分子モデルが構築でき、且つ炭素鎖の短い *n*-ブタン、*n*-ペンタンを基質とする天然型アルカン水酸化酵素を用いた。また、酵素のタンパク質構造の改変が可能なアルカン水酸化酵素を用いた。これら条件を満たす酵素を表 1 に示した。

表 1 本研究で用いるアルカン酸化酵素

| 酵素 | 基質となる <i>n</i> -アルカンの炭素数 | アミノ酸置換 |
|------------------|--------------------------|--------|
| 鉄含有メタン酸化酵素(sMMO) | 1~8 | 不可 |
| 銅含有メタン酸化酵素(pMMO) | 1~5 | 不可 |
| アンモニア酸化酵素(AMO) | 1~8 | 不可 |
| シトクロム P450 BM-3 | 5~12 | 可 |

これら酵素の *n*-アルカンからアルコールへの酸化反応を行い、アルコール異性体への位置・立体選択性を明らかにした。得られた酵素の選択性と、酵素基質結合空洞の奥行きと容積に基づいて、酵素活性部位の空洞奥行きと容積が及ぼす *n*-アルカンからアルコールへの位置・立体選択性への影響を明らかにした。

4. 研究成果

(1)メタン酸化酵素の *n*-アルカンからアルコール異性体への選択性

X線結晶構造解析による酵素活性部位構造が明らかであり、且つ炭素鎖の短い *n*-ブタン、*n*-ペンタンを基質とするメタン水酸化酵素(鉄含有メタンモノオキシゲナーゼ(sMMO)および銅含有メタンモノオキシゲナーゼ(pMMO))(図1)のアルカンからアルコールへの位置・立体選択性を明らかにした。

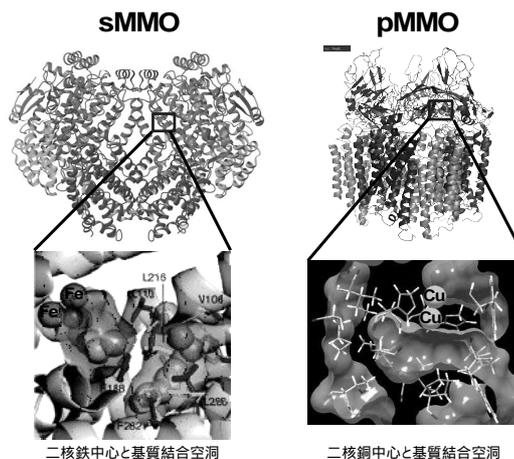
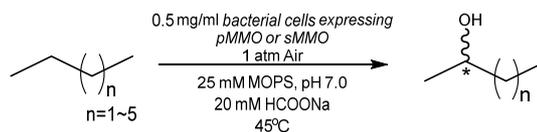


図1 sMMO および pMMO のタンパク質立体構造

sMMO を合成する微生物 1 種類および pMMO を合成する微生物 2 種類を調製し、これら菌体を用いて炭素数 4~8 の *n*-アルカンからのアルコールへの酸化反応を行った。



その結果、sMMO は *S* 体の 2-アルコールを選択的に生成した。一方、pMMO は *R* 体の 2-

アルコールを選択的に生成した。

この2つの酵素の2-アルコール立体異性体への選択性は、*n*-アルカンの炭素数に依存し、pMMOでは*n*-ペンタン、sMMOでは*n*-ヘプタンで最も高い選択性を示し、それぞれ90%、88%であった。pMMOの空洞奥行きはsMMOのそれより大きいため、空洞奥行きだけでは高い選択性の発現は説明できない。一方、最も高い立体選択性を示した*n*-アルカンが酵素の基質結合部位空洞に占める割合はほぼ同じであった。このことは、*n*-アルカンから2-アルコール立体異性体への選択性は、基質結合部位を形成するアミノ酸残基や活性点の種類に依らず、基質結合部位空洞容積に占める基質*n*-アルカンの割合に依存することを示唆している。

(2) アンモニア酸化酵素の*n*-アルカンからアルコール異性体への選択性

X線結晶構造解析による酵素活性部位構造が明らかであり、且つ炭素鎖の短い*n*-ブタン、*n*-ペンタンを基質とするアンモニア酸化酵素(AMO)のアルカンからアルコールへの位置・立体選択性を明らかにした。

AMOを合成する微生物 *Nitrosomonas europaea* を調製し、これら菌体を用いて炭素数4~8の*n*-アルカンからのアルコールへの酸化反応を行った。その結果、AMOの2-アルコール立体異性体への選択性は、*n*-アルカンの炭素数に依存し、炭素鎖数が4~7へ増えるに伴い、(*R*)-2-アルコールへの選択性が高くなることを明らかにした。

Nitrosomonas europaea のAMOは、pMMOとタンパク質全体の立体構造や活性中心金属イオンの種類や配位構造はほぼ同じで、基質結合部位の空洞形状が異なる (Fig. 2(A))。この酵素についても炭素数4~5の直鎖アルカン酸化反応を行った。その結果、pMMOとは異なり、生成する2-アルコールは主に*S*体であった (表2)。この結果は、基質結合部位の空洞形状は直鎖アルカンの活性点への配向に大きく影響をおよぼすことを示している。

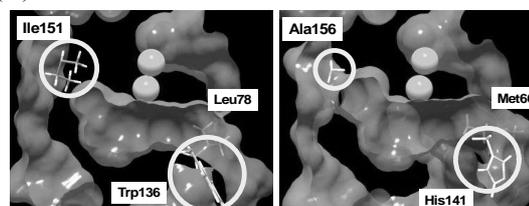
表2 pMMOおよびAMOの*n*-ブタン、*n*-ペンタンから2-アルコール立体異性体への選択性

| 酵素 | 2-アルコール量 ($\mu\text{mol g-wet cells}^{-1}$) | 立体選択率 % e.e. |
|------------------|--|-----------------|
| <i>n</i> -ブタン酸化 | | |
| AMO-Ne | 18 | 54 (<i>S</i>) |
| pMMO-Mt | 6.8 | 52 (<i>R</i>) |
| pMMO-Mc | 7.9 | 50 (<i>R</i>) |
| <i>n</i> -ペンタン酸化 | | |
| AMO-Ne | 3.1 | 24 (<i>S</i>) |
| pMMO-Mt | 3.4 | 72 (<i>R</i>) |
| pMMO-Mc | 8.1 | 72 (<i>R</i>) |

AMOの活性部位空洞はpMMOに比べて大きい。そのため、ペンタンより分子サイズの大きい炭素数6~8の直鎖アルカン酸化反応にも活性を示した。炭素数6~7の直鎖アルカン

から生成する2-アルコールは主に*R*体であった。この直鎖アルカンの活性点への配向性は、空洞形状の違いから、Fig. 2(B)に示すように説明できると考える。pMMOの空洞奥に位置するイソプロピル基 (イソロイシン(Ile151)側鎖) は、AMOではメチル基 (アラニン(Ala156)側鎖) に置き換わっている。このアミノ酸側鎖置換により、炭素数1~2のアルキル基が結合できる空間が空洞奥に広がり、その結果、Fig. 2(B)に示すようにAMOでは、直鎖アルカンが2位炭素の*pro-S*水素を活性点に配向して結合していると考えられる。このように、基質結合部位を形成するアミノ酸側鎖がたった一つだけ変わるだけで、結合する直鎖アルカンの活性点への配向が変化する。

(A)



(B)

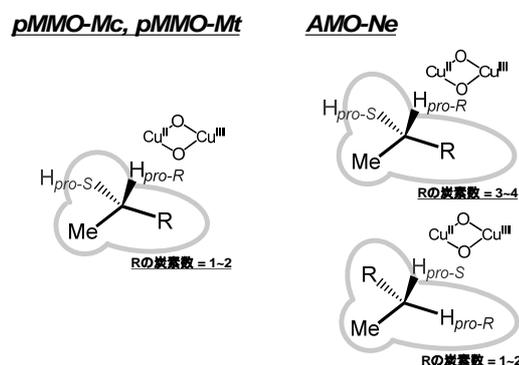


図2 (A) pMMO (右) および AMO (左) の活性部位空洞構造 (B) 選択性から推定した活性部位空洞における*n*-アルカン分子の触媒部位への配向

(3) シトクロム P450BM-3 の*n*-アルカンからアルコール立体異性体への選択性

シトクロム P450BM-3 は、炭素数5~8の*n*-アルカンに比べて大きな空洞奥行きと容積を活性部位に持つ。

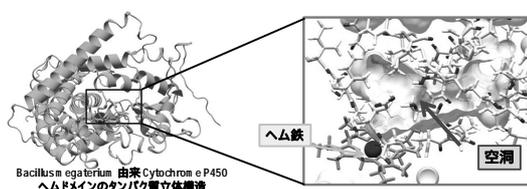
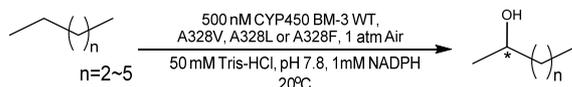


図3 シトクロム P450BM-3 のタンパク質立体構造

この酵素による炭素数5~8の*n*-アルカン酸化反応を行い、アルコール位置・立体異性体への選択性を調べた。また、アミノ酸側鎖 Ala328 へのアミノ酸側鎖置換がアルコール異性体への選択性に及ぼす影響を明らかに

するため、Ala328 をより嵩高いアミノ酸側鎖 (Leu、Val、Phe) に置換したシトクロム P450BM-3 についても、*n*-アルカンからアルコール異性体への選択性を調べた。



シトクロム P450BM-3 は、炭素数 5~8 の *n*-アルカンから 3-および 4-アルコールを生成した。また、これら反応において生成する 2-アルコールはほぼラセミ体であった。すなわちアルコール異性体への選択性が低いことがわかった。

一方、活性点近位に存在する Ala328 をより嵩高いアミノ酸側鎖 (Leu、Val、Phe) に置換し、活性部位空洞の容積を小さくした場合、2-アルコールへの選択性が増大した。それら選択率は 70 ~ 85 % であった。2-アルコールの立体異性体への選択性は、置換するアミノ酸側鎖の種類と直鎖アルカンの炭素数に依存した。例えば、Ala328 を Leu に置換した直鎖ペンタンから 2-ペンタノールへの酸化反応では *R* 体の立体異性体が選択率 77% で得られた。一方、Ala328 を Phe に置換した場合、*S* 体の立体異性体が選択率 85% で得られた。したがって、選択性は空洞容積に依存することがわかった。

(5) まとめ

本研究により以下のことが明らかになった。

- 1) アルカン酸化酵素による低級 *n*-アルカンの分子配向認識は、酵素活性部位空洞の空洞容積に依存した
- 2) 空洞表面を形成するアミノ酸側鎖は、*n*-アルカン分子の立体配座に影響を及ぼし、これらを適切に選択することで、任意の立体異性体が得られる酵素反応場を構築できる。

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 1 件)

Akimitsu Miyaji, Teppei Miyoshi, Ken Motokura, Toshihide Baba “The substrate binding cavity of particulate methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing high enantioselectivity for *n*-butane and *n*-pentane oxidation to 2-alcohol” *Biotechnology Letters*, 2012, 33, 2241-2246, 査読有

[学会発表](計 9 件)

宮地輝光、本倉健、馬場俊秀 “シトクロム P450BM-3 の活性点近傍アミノ酸側鎖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” 日本化学会第 94 春

季年会, 2014 年 3 月 27 日 ~ 30 日, 名古屋大学

宮地輝光, 馬場俊秀 “酵素による炭化水素の部分酸化反応” 高難度選択酸化反応研究会シンポジウム, 2014 年 1 月 24 日, 東京工業大学

宮地輝光 “アルカン酸化酵素の空洞内活性部位における直鎖アルカンからアルコール異性体への選択性” 第 112 回触媒討論会, 2013 年 9 月 18 日 ~ 20 日, 秋田大学
宮地輝光, 内藤薫, 中川聡矢, 本倉健, 馬場俊秀 “二核鉄含有メタン酸化酵素の *n*-アルカン認識能に及ぼす *n*-アルカン炭素数の影響” 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年 3 月 22 日 ~ 25 日, 立命館大学草津キャンパス

宮地輝光, 三好鉄平, 本倉健, 馬場俊秀 “銅含有アルカン酸化酵素のタンパク質構造が *n*-アルカン認識に及ぼす影響” 第 110 回触媒討論会, 2012 年 9 月 24 日 ~ 26 日, 九州大学伊都キャンパス

宮地輝光, 三好鉄平, 本倉健, 馬場俊秀 “銅含有アルカンモノオキシゲナーゼによる *n*-ブタンからの (*R*)-および (*S*)-2-ブタノールの選択的合成” 第 15 回生体触媒化学シンポジウム, 2011 年 12 月 22 日, 慶応義塾大学芝共立キャンパス

三好鉄平, 宮地輝光, 本倉健, 馬場俊秀 “*Nitrosomonas europaea* のアンモニア酸化酵素による *n*-ブタンからの位置・立体選択的 (*S*)-2-ブタノール合成” 第 1 回 CSJ 化学フェスタ, 2011 年 11 月 14 日, 早稲田大学

宮地輝光, 新田宗由記, 本倉健, 馬場俊秀 “膜結合型メタンモノオキシゲナーゼが示すメタンからのメタノール生成反応への活性に Cu(II) が及ぼす影響” 第 108 回触媒討論会, 2011 年 9 月 20 日, 北見工業大学

宮地輝光, 三好鉄平, 本倉健, 馬場俊秀 “*Nitrosomonas europaea* による *n*-ブタンからの位置・立体選択的 (*S*)-2-ブタノール合成” 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム, 2011 年 9 月 14 日, つくば国際会議場

[図書](計 1 件)

Akimitsu Miyaji, *Methods in Enzymology*; Particulate methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b, Academic press, 2011, 211-225

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮地輝光 (MIYAJI, Akimitsu)

研究者番号: 40452023

東京工業大学・大学院総合理工学研究科・助教