# 金属酵素の誤作動誘起と高難度物質変換

国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学大学院理学研究科 物質理学専攻

荘司 長三

## 1. 緒言

酵素は常温・常圧の温和な条件下での効率的な反応が可能であり、環境調和型の触 媒として注目されている.酵素は、様々な分子が混在する反応条件でも対象とする 基質と高選択的に反応するように進化しているため、高い基質特異性を示す場合が 多い.酵素の基質特異性を改変する手法の一つとして、変異導入を繰り返し、目的の 基質に対して高い活性を示す変異体をスクリーニングにより得る、指向性進化法

(directed evolution)による酵素機能改変が活発に展開されている.指向性進化法は, 酵素工学を躍進させた画期的な方法であるが,目的の変異体を得るまでに多段階の 変異体スクリーニングを経なければならず,必ず目的の変異体が得られるとも限ら ない.一方,我々の研究室では,変異導入法とは全く異なるアプローチの酵素反応場 の改変手法として,基質誤認識システム(デコイ法)の開発を行ってきた.ここでは, シトクロム P450の一種である P450BM3の基質特異性改変に関する研究を紹介する.

# 2. シトクロム P450BM3 と基質誤認識システム

シトクロム P450BM3(P450BM3)は,巨 大菌由来の長鎖脂肪酸水酸化酵素で あり(図1),パルミチン酸やアラキド ン酸などの長鎖脂肪酸のアルキル鎖 末端部分を水酸化する(図2上段). 酵素活性が非常に高く,酸化活性種を 最大で毎分1万5千回転で生成するた め,バイオ触媒としての利用が早くか ら期待され,触媒化学分野でも広く研 究対象とされてきた.P450BM3は,へ ムを活性中心として酸素分子を還元 的に活性化することで,電子が二つ不 足した強力な酸化活性種であるオキ



図 1 P450BM3 のヘムドメインの結晶構造

ソフェリル (Fe<sup>4+</sup>=O) ポルフィリン π-カチオンラジカル (Compound I) を生成する (図 2).酸素分子を還元的に活性化する酸化活性種生成には,還元蛋白質を介する NADPH からの電子供給が必要であり,長鎖脂肪酸の取り込みが反応を開始するスイ ッチになっている.P450BM3 は,長鎖脂肪酸が適切な位置に取り込まれた場合にの み電子が供給されて酸化活性種を生成するように設計されており,長鎖脂肪酸と構 造が大きく異なる有機分子では,P450BM3のスイッチは「ON」の状態とはならない 仕掛けで反応が制御されているため,エタンやベンゼンなどを水酸化しようとして も反応は全く進行しない.P450BM3 に長鎖脂肪酸以外の基質を水酸化させるために は,長鎖脂肪酸以外の基質が取り込まれた場合にもスイッチが「ON」の状態になる ようにする必要がある.そこで我々は,酸化活性種を強制的に生成させる「擬似基 質」(デコイ分子)をP450BM3 に取り込ませることで,長鎖脂肪酸と構造が大きく 異なる分子でも水酸化 できるシステムの構築 を目指し,長鎖脂肪酸の すべての水素原子をフ ッ素原子に置き換えた パーフルオロアルキル カルボン酸をデコイ分 子として選定した(図2) 下段). P450BM3はC-F 結合を水酸化すること ができないため, パーフ ルオロアルキルカルボ ン酸は P450BM3 に水酸 化されない. P450BM3 が 酸化の対象とする炭素 数 16 前後の長鎖脂肪酸 よりも鎖長が短いパー フルオロアルキルカル

ボン酸(炭素数8~12)



図 2 シトクロム P450BM3 による長鎖脂肪酸の水酸化反応(上) とパーフルオロアルキルカルボン酸(デコイ分子)存在下でのガス 状アルカンの水酸化反応(下) をデコイ分子として用

いることで、デコイ分子が結合した状態でも、活性部位に酸化される基質が同時に 結合できる空間を確保できる.パーフルオロアルキルカルボン酸とガス状アルカン などの第二の基質が同時に活性部位に取り込まれると P450BM3 の酸化活性種が生 成され、第二の基質が水酸化される(図2下段). パーフルオロアルキルカルボン 酸の存在下では、エタンやプロパンなどのガス状アルカンやベンゼン、トルエンな どの芳香族化合物が水酸化される <sup>1-3</sup>. デコイ分子を用いる触媒反応は、デコイ分子 の構造によりその酸化活性が大きく変化するため、新規デコイ分子を設計すること で、反応システムの更なる高活性化が可能である.

## 3. デコイ分子の改良

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3)を用いること で,プロパンの水酸化活性が大 きく向上した 4. パーフルオロ ノナン酸をロイシンで修飾し た PFC9-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 回転で進行することを明らかにした.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 結合型 P450BM3 の結晶構造解析にも成功し、パーフル オロアルキル鎖の末端は活性部位には届いておらず、活性部位の空間には、第二の 基質を取り込む空間が存在することを確認できた.パーフルオロノナン酸(第一世



図 4 第二世代デコイ分子の PFC9-Trp を結合した P450BM3 の活性部位の構造



#### 図5 前期第三世代デコイ分子の構造

代デコイ分子)がデコイ分子として機能す るのに対して、ノナン酸(C9)などのアル キルカルボン酸はデコイ分子としては全く 機能しなかったことから、フッ素原子がデ コイ分子としての機能に不可欠と考えてし まっていたが、パーフルオロノナン酸をト リプトファンで修飾した第二世代デコイ分 子の PFC9-Trp と P450BM3 複合体の結晶構 造解析では(図 4)、アルキル鎖の末端が活 性部位のへムの鉄原子から 8.5Å 離れており、 フッ素原子による置換は不要ではないかと の発想につながった.結晶構造解析から、修

飾したアミノ酸部位が多点の水素結合 形成に寄与し、デコイ分子が結合部位 で動くことなく固定化されたため、ア ルキル鎖末端がヘムに届くことなく中 途半端な位置で固定化されることも分 かった.デコイ分子が強く結合できる ようになったことは、高分解能結晶構 造解析が可能な結晶の質の改善にも貢 献した.その後、ノナン酸(C9)などの

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三世代デコイ分子を 合成した.フッ素原子を含まない第三世代デコイ分子も P450BM3 を活性化可能であ ることが判明し,高いベンゼンの水酸化活性を示した<sup>5</sup>.パーフルオロアルキルカル ボン酸のように完全な合成化合物ではなく,アルキルカルボン酸(中鎖脂肪酸)とア ミノ酸を連結しただけの天然物に近い化合物がデコイ分子として機能することを初 めて明らかにした.これまで,デコイ分子を用いる反応は,フッ素原子を巧みに利用 する特殊な酵素反応と認知されていたが,単純な化合物がデコイ分子として機能す ると示したことにより,デコイ分子によって酵素が誤作動するということは普遍的 な現象であることも示唆した,酵素化学での大きなインパクトのある成果と考えて いる.フッ素原子が必要ではなくなったため,非常に多くのカルボン酸をデコイ分 子の骨格として利用できるようになった.たとえば,解熱鎮痛薬のイブプロフェン

のカルボキシル基をフェニ ルアラニンで修飾したデコ イ分子や(Ibuprofen-Phe,図 5),フェニルアラニンとアミ ノ基をZ基(ベンジルオキシ カルボニル基)やアルキル基 で保護したプロリンを連結 した二量体(Z-Pro-Phe,図5) などの様々な骨格のデコイ 分子を開発した.この時点で は,フェニルアラニンとプロ リンを連結した二量体にア



図 6 C7ProPhe を結合した P450BM3 の活性部位の構造 と C7ProPhe のプロリン部分の拡大図

ルキル鎖を修飾した C7-Pro-Phe (図 5) が高い酸化活性を示し、ベンゼンの場合は毎 分 259 回転で水酸化され、P450BM3 一分子当たり 4 万回転を超える触媒活性を示し た.結晶構造解析では、C7-Pro-Phe のアルキル末端がヘム鉄から十分に離れた位置 にあること、アミノ酸部位が基質結合部位入口での多点水素結合を形成しているこ と、3 級アミン部位が分子内水素結合を形成してデコイ分子の基質結合部位での構造 規定に寄与していることなどが明らかになっている(図 6). C7-Pro-Phe は、単純に ベンゼン水酸化活性が高いだけでなく、後述する菌体内反応系の構築で異彩を放つ、 高い活性を示す鍵となるデコイ分子となった.

# 4. 菌体内反応系の開発

デコイ分子を P450BM3 に取り込ませることに よって,不活性基質を水 酸化可能となるが、精製 した P450BM3 を用いる 反応では,酸素分子の還 元的活性化に必要な電 子の供給源として極め て高価な補酵素 NADPH (1 モル当たり数千万 円)を消費してしまうと いう問題があった. 合成 反応に利用するために は、NADPH の添加が不 要な反応系を開発する 必要があった.大腸菌な どの菌体内では、 NADPH はグルコースの 代謝により再生される ため, 安価なグルコース



図7 P450BM3を過剰発現させた大腸菌を用いる菌体内 ベンゼン水酸化反応の模式図

のみで反応を行うことが可能となるため(図7),第一世代デコイ分子のパーフルオ ロアルキルカルボン酸を,P450BM3を過剰発現させた大腸菌に作用させる実験を行 っていたが,反応はほとんど進行しなかった.そこで全くフッ素原子をもたない第三 世代デコイ分子を用いることで菌体内での反応が可能となった.第三世代デコイ分 子を,P450BM3を過剰発現させた大腸菌の培養液に少量添加するのみで、ベンゼン をフェノールに高効率に変換できることを明らかにした(図7)<sup>6</sup>. 菌体濃度や反応 時間などの反応条件を最適化し、フェノールの収率は59%(5 時間の反応)に達し た.フェノールがさらに酸化されたヒドロキノンも16%の収率で得られ、ベンゼン の転換効率は75%となった.デコイ分子の毒性はほとんどなく、菌体内反応の活性 はデコイ分子の膜透過性の違いを反映している可能性を考え研究を進めた.最新の 実験結果から、C7-Pro-Phe 以外の第三世代デコイ分子も十分に菌体内に到達してお り、基質によってはC7-Pro-Phe と同等の活性を与えるため、P450BM3とデコイ分子 複合体の残った活性部位への基質の結合力が重要な要素と考え、デコイ分子の膜透 過性について実験を続けている. 菌体内でのデコイ分子濃度などは明らかではない が、C7-Pro-Phe が非常に低い濃度で機能し、5µM でも変換効率 40%を超える活性を示した. 非常に低い濃度で機能する膜透過性デコイ分子を開発できた意義は非常に大きい.

# 5. デコイ分子進化法 (後期第三世代デコイ分子)

活性の高い前期第三世代デコイ分子は、二つのアミノ酸が結合したジペプチドの N 末端をアルキル基などで修飾した基本骨格に持つことに着目し、固相合成法により 600種を超えるジペプチドデコイ分子を段階的に合成し、スクリーニングによる高活



図8 指向性進化的手法を用いたデコイ分子の構造最適化

性デコイ分子の開発を行った(図8). 天然のアミノ酸の組み合わせからはじめ、非

ンゼンだけでなくエ

タンやプロパン水酸



化にも効果的であった.また,スクリーニングの後半で得られたデコイ分子を用いてエタンとプロパンの水酸化を行ったところ,エタンとプロパンの水酸化では C7AM-Pip-Phe が高い活性を与え,エタン(50気圧<sup>8</sup>)の水酸化は毎分 82.7回転(TON =827)に達した(図 9).活性が高かったデコイ分子の場合には,ヘム近傍にデコイ 分子とヘムのプロピオン酸と水素結合ネットワークを形成する水分子が観測され, 高活性化に寄与していると考えている(図 10).



図 10 後期第三世代デコイ分子を取り込んだ P450BM3 の結晶構造. a), d) 3CPPA-Pip-Phe, b) 3CHPA-Pro-Phe, c), e) C7AM-Pip-Phe

## 6. 結晶化促進デコイ分子と微小結晶作成技術の開発

高活性デコイ分子の開発の過程で、反応活性はそれほど 高くはないが、結晶化が異常に早く進むデコイ分子の開 発に成功した. 松脂の成分であるアビエチン酸のカルボ キシル基をトリプトファンで修飾したデコイ分子(右図) を P450BM3 に取り込ませた場合には、結晶が2時間程度



で得られ,結晶の質も非常によく分解能 1.22Å で構造解析が可能であった.結晶構 造解析から, P450BM3 の基質結合部位の大部分が嵩高いアビエチン酸部位によって 占有されることで, P450BM3 の構造が安定化したために,結晶化が著しく早くなっ たと考えられる.得られた結晶を細かく砕いで結晶化のシードを作成し,結晶化を 試みたところ,シードと蛋白質溶液の混合の順番を一般的な手法とは逆にすると, 微小結晶が 5 分以内に沈殿として得られることが分かった(図 11 と 12)<sup>9</sup>.微小結 晶は X 線自由電子レーザー(XFEL)の測定に十分な質であることを確認し,XFEL の測定では,X 線のダメージの全くない無損傷結晶構造解析に成功している(未発 表).結晶化促進デコイ分子を用いる手法は,これまでに結晶化ができなかった,も しくは,結晶化できたとしても低分解能であった場合の結晶化にも効果的であるこ とを確認している.第三世代デコイ分子のC7-Pro-Phe は,結晶化を試みても全く結 晶が得られなかったが,シードを用いる手法により結晶が短時間で得られ,結晶構 造解析の結果,基質結合部位にデコイ分子が取り込まれていることが確認できた(図 6).シードを用いる手法は,取り込ませるデコイ分子に因らずに結晶化が可能であ るだけでなく,ヒスチジンタグなどの蛋白質精製で用いるアフィニティータグを除 去することなしに結晶化が可能であることも確認している. P450BM3 のヘムをマン ガンやコバルトを有する合成金属錯体に置換したヘム置換体<sup>10</sup>についても,高分解 能結晶構造解析が可能となった. ヘムの中心金属を変えた人工 P450BM3 の結晶構造 解析にも成功した(図 13). P450BM3 および P450 全般的に適用可能な結晶化手法に なると期待しており,継続して手法を発展させる予定である.



図 11 シード結晶を用いる微結晶の 作成の様子 左上の時間は,シード結晶 と P450BM3 の溶液を混合してからの

図 12 シード結晶を用いてプラスチックチュ ーブ中で作成した微結晶と微結晶の顕微鏡象



図 13 P450BM3 のヘム置換体の調製と結晶構造解析

参考文献

Kawakami, N.; Shoji, O.; Watanabe, Y., Angew. Chem. Int. Ed. 2011, 50 (23), 5315-5318.
Kawakami, N.; Shoji, O.; Watanabe, Y., Chem. Sci. 2013, 4 (6), 2344-2348.
Shoji, O.; Kunimatsu, T.; Kawakami, N.; Watanabe, Y., Angew. Chem. Int. Ed. 2013, 52 (26), 6606-6610.
Cong, Z.; Shoji, O.; Kasai, C.; Kawakami, N.; Sugimoto, H.; Shiro, Y.; Watanabe, Y., ACS Catal. 2015, 5 (1), 150-156.
Shoji, O.; Yanagisawa, S.; Stanfield, J. K.; Suzuki, K.; Cong, Z.; Sugimoto, H.; Shiro, Y.; Watanabe, Y., Angew. Chem. Int. Ed. 2017, 56 (35), 10324-10329.
Karasawa, M.; Stanfield, J. K.; Yanagisawa, S.; Shoji, O.; Watanabe, Y., Angew. Chem. Int. Ed. 2018, 57 (38), 12264-12269.
Yonemura, K.; Ariyasu, S.; Stanfield, J. K.; Suzuki, K.; Onoda, H.; Kasai, C.; Sugimoto, H.; Aiba, Y.; Watanabe, Y.; Shoji, O., ACS Catal. 2020, 10 (16), 9136-9144.
Ariyasu, S.; Kodama, Y.; Kasai, C.; Cong, Z.; Stanfield, J. K.; Aiba, Y.; Watanabe, Y.; Shoji, O., ChemCatChem 2019, 11 (19), 4709-4714.
Stanfield, J. K.; Omura, K.; Aiba, Y.; Onoda, H.; Stanfield, J. K.; Omura, K.; Matsumoto, A.; Kasai, C.; Sugimoto, H.; Shiro, Y.; Watanabe, Y.; Shoji, O., Angew. Chem. Int. Ed. 2020, 59 (19), 7611-7618.
Omura, K.; Aiba, Y.; Onoda, H.; Stanfield, J. K.; Ariyasu, S.; Sugimoto, H.; Shiro, Y.; Shoji, O., Angew. Chem. Int. Ed. 2020, 59 (19), 7611-7618.