

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成24年度採択分
平成27年3月18日現在

小分子アルカン類を水酸化するバイオ触媒システムの分子設計

Molecular Design of Biocatalysts for Hydroxylation of
Small Alkanes

課題番号：24225004

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



研究の概要

不活性な C-H 結合を高効率に水酸化することができるが、基質に対する選択性が非常に高い細菌由来のシトクロム P450 に、疑似基質（デコイ分子）を作用させて誤作動状態を意図的に引き起こすと、本来の対象基質とは異なる非天然基質の酸化が可能になる手法を開発し、常温・常圧でのエタンやプロパンの水酸化やベンゼンの直接的なフェノールへの変換に成功した。

研究分野：生物無機化学，生体機能関連化学

キーワード：酵素，シトクロム P450，ガス状アルカン，触媒，水酸化反応

1. 研究開始当初の背景

酵素は、常温・常圧の温和な条件下で、高効率な反応を行うことができるため、環境に配慮した物質変換が可能である。酸化酵素には、ヘムと呼ばれる鉄ポルフィリン錯体の一種を活性中心に利用するものが存在し、特にシトクロム P450（以下 P450）は、不活性な有機化合物の水酸化が可能であるため、合成反応への利用が期待されてきた。酸化活性の高い細菌由来の P450 は、基質選択性が高く、対象とする基質以外の基質との反応効率は非常に低い。一般的に、遺伝子工学的手法により酵素を構成するアミノ酸を置換することで基質特異性を変換する手法が主流であるが、我々は、疑似基質（デコイ分子）を作用させることで酵素の誤作動状態を意図的に引き起こすと、本来の対象基質ではない基質を対象とする触媒反応が可能となるまったく新しい手法を世界に先駆けて開発した (*Angew. Chem. Int. Ed.* 2007)。

2. 研究の目的

炭素資源として近年注目を集めている天然ガスの主成分であるメタンやエタンは、不活性なため、合成反応に利用可能な誘導体への変換が求められている。特に水酸化が注目されているが、現在用いられているアルコールへの変換プロセスは、高温・高圧など過酷な反応条件が必要となる。本研究では、メタンやエタンなどの小分子アルカン類の水酸化反応を温和な条件下で触媒する強力な人工金属酵素とその反応系を開発することを研究目的とする。

3. 研究の方法

研究に用いた蛋白質は、大腸菌を宿主とする組換え体として発現・精製し、酵素の活性を各種分光法、クロマトグラフィーにより評価した。X線結晶構造解析によって活性中心、反応空間を可視化し、デコイ分子の構造設計を行い、酵素反応の高活性化や生成物への高いキラリティの賦与を試みた。

4. これまでの成果

(1) デコイ分子の不斉を利用する生成物のエナンチオ選択性の制御

解熱鎮痛薬として知られるイブプロフェンが、過酸化水素駆動型 P450_{SPa} のデコイ分子として機能するとともに、イブプロフェンの不斉によって生成物のエナンチオ選択性を制御できることを明らかにした。また、(R)-イブプロフェンを結合した P450_{SPa} の結晶構造解析に成功し、イブプロフェンの不斉とエナンチオ選択性の関連を明らかにした。

(*Chem. Asian J.* 2012)

(2) P450BM3 によるエタンの水酸化

長鎖脂肪酸のアルキル鎖末端部分を水酸化する P450BM3 は、長鎖脂肪酸以外とはほとんど反応しないが、パーフルオロアルキルカルボン酸をデコイ分子として取り込ませ、P450BM3 のスイッチを強制的に「ON」の状態にするとともに、フッ素原子の特性を生かした反応場を P450BM3 内部に構築することにより、プロパン、ブタン、シクロヘキサンなどの小分子アルカンを水酸化できることを示した(図 1, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011)。エタンの水酸化は、大気圧下では全く進行し

なかったが、エタンを5気圧で供給することにより、デコイ分子存在下で P450BM3 がエタンを水酸化できることを明らかにした (Chem. Sci. 2013).

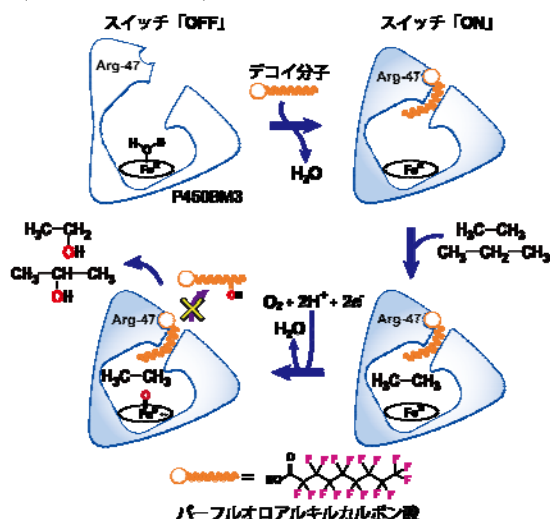


図 1. パーフルオロアルキルカルボン酸 (デコイ分子) 存在下での P450BM3 によるエタンとプロパンの水酸化反応の模式図

(3) 第二世代デコイ分子の開発

「デコイ分子-P450BM3」複合体による非天然基質の水酸化をより高効率で行うためには、デコイ分子を蛋白質内部に安定に存在させる必要があるが、デコイ分子は、本来の対象基質である長鎖脂肪酸に比べてアルキル鎖長が短いために必然的に結合が弱い。そこで、P450BM3 がパルミチン酸よりもそのカルボキシル基がグリシンで修飾されたパルミトイルグリシンを強く結合することに着目し、パーフルオロアルキルカルボン酸のカルボキシル基を(L or D)-アミノ酸で修飾した第二世代のデコイ分子を合成した。第二世代デコイ分子が P450BM3 に対してより強く結合し、プロパンの水酸化活性が大幅に改善され、その酸化活性は、ノナン酸のカルボキシル基をロイシンで修飾したデコイ分子 (PFC9-L-Leu) 存在下で、毎分 256 回転に達した。さらに、常温・常圧のエタンの水酸化が可能となり、酸化活性は毎分 45 回転に達した (ACS Catalysis 2015).

(4) P450BM3 によるベンゼンと一置換ベンゼンの選択的水酸化

ベンゼンを高選択的に(99%以上)フェノールに変換できることを明らかにした (Angew. Chem. Int. Ed. 2013). 1 分間あたりの触媒回転数は 120 回転に達した。一置換ベンゼン (トルエン, クロロベンゼン, アニソール) なども水酸化することができ、トルエンは反応性の高いベンジル位ではなく芳香環のオルト位が選択的に水酸化された。クロロベンゼンとアニソールも同様にオルト位が選択的に水酸化され、ニトロベンゼンやアセトフェノンでさえオルト位が選択的に水酸化される、オルト位選択的な触媒反応系の構築に成功した。

(5) 「P450BM3-デコイ分子」の結晶構造解析
第二世代のデコイ分子を取り込んだ P450BM3 の結晶構造解析に成功し、デコイ分子が取り込まれた P450BM3 の構造を原子レベルで明らかにした。活性部位の構造が明らかになったことで、デコイ分子を用いる反応の反応機構に関する考察が可能になるとともに、メタンの水酸化に向けた活性部位の精密な設計が可能になった (ACS Catalysis 2015).

5. 今後の計画

(1) メタンの水酸化

第二世代デコイ分子を結合した P450BM3 の結晶構造解析の結果から、ガス状アルカンが取り込まれると考えられる空間は、プロパンの分子サイズ程度の大きさであることが明らかになった。ヘム周辺への変異導入によって、この空間をメタンのサイズに合わせて最適化する。「デコイ分子の利用」と「変異導入による改変」を融合させることで、世界初となる P450 によるメタンの触媒的水酸化の実現を試みる。

(2) NADPH の再生酵素を利用できるデコイ分子の開発

NADPH を再生する酵素のグルコースデヒドロゲナーゼを利用することで NADPH を再生しながら長時間の反応を行うことができるが、フッ素原子を含むデコイ分子によって酵素が失活しやすい。そこで、フッ素原子を含まない次世代デコイ分子を開発して NADPH の再生を可能とし、長時間のガス状アルカンの水酸化反応を行う。

6. これまでの発表論文

(1) Z. Cong, O. Shoji, C. Kasai, N. Kawakami, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, "Activation of Wild-type Cytochrome P450BM3 by the Next Generation of Decoy Molecules: Enhanced Hydroxylation of Gaseous Alkanes and Crystallographic Evidence", ACS Catalysis, **5**, 150-156 (2015).

(2) O. Shoji, Y. Watanabe, "Peroxygenase reactions catalyzed by cytochromes P450", J. Biol. Inorg. Chem., **19**(4-5), 529-539 (2014).

(3) C. Shirataki, O. Shoji, M. Terada, S. Ozaki, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, "Inhibition of Heme Uptake in Pseudomonas aeruginosa by its Hemophore (HasAp) Bound to Synthetic Metal Complexes", Angew. Chem. Int. Ed., **53** (11), 2862-2866 (2014).

(4) O. Shoji, T. Kunimatsu, N. Kawakami, Y. Watanabe, "Highly Selective Hydroxylation of Benzene to Phenol by Wild-type Cytochrome P450BM3 Assisted by Decoy Molecules", Angew. Chem. Int. Ed., **52** (26), 6606-6610 (2013).

(5) N. Kawakami, O. Shoji, Y. Watanabe, "Direct Hydroxylation of Primary Carbons in Small Alkanes by Wild-type Cytochrome P450BM3 Containing Perfluorocarboxylic Acids as Decoy Molecules", Chem. Sci., **4** (6), 2344-2348 (2013).

ホームページ等

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