

## 実用化に向けた酸素添加酵素の分子設計

### Molecular Design of Oxygenases Applicable to Synthetic Chemistry

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

アミノ酸置換や本来の基質に似せた「擬似基質」によりヘム蛋白質の活性中心を改変し、合成反応に利用可能な人工酸素添加酵素を創成する

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. 研究開始当初の背景・動機

ミオグロビンのヘム近傍のアミノ酸を置き換えたミュータントの作成、すなわち、ヘム近傍構造を設計することによって、本来ミオグロビンが持っていない様々な酸素添加酵素活性の賦与に成功している。しかしながら、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. 研究の目的

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。

#### 3. 研究の方法

大腸菌を用いて発現させた蛋白質を、蛋白質精製システムにて精製し、その触媒活性をガスクロマトグラフィーや液体クロマトグラフィーにより評

価した。蛋白質の結晶構造解析により、活性部位であるヘム近傍のアミノ酸の配置と触媒活性やキラル選択性の関連を調べ、部位特異的なアミノ酸置換法により鍵となるアミノ酸を置換して、さらなる高活性化や高キラル選択性の実現を試みた。P450を対象とした場合には、アミノ酸を置き換えるミューテーションに加えて、本来の基質に似せた擬似基質を反応系に添加して蛋白質に取り込ませることで反応空間を修飾し、擬似基質による酵素反応制御を行った。

#### 4. これまでの成果

(1) P450<sub>BSβ</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>BSβ</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う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>BSβ</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>BSβ</sub>とほぼ同じ構造を取っていたが、擬

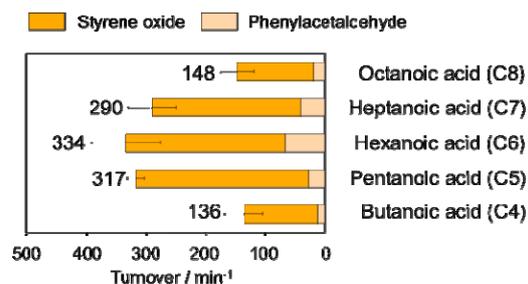
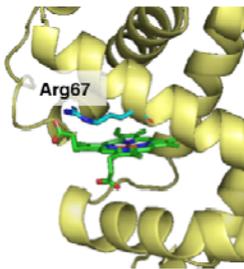


図 1 P450<sub>BSp</sub>によるスチレンの酸化活性と添加する擬似基質のアルキル鎖長の関連

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、へ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。さらに、得られた結晶構造に基づき様々な擬似基質を設計し、パラ位に置換基を持つフェニル酢酸が酸化生成物の不斉を反転させることを見いだしている。

(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を見いだしている。

(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、軸配位子の一つである Met69 をアラニンに置換してへム鉄上に基質反応部位を設けた。また、  

 図 2 H64D/T67R/V68I ミュータントの結晶構造  
 ことを期待して、へム鉄の上方およそ 5.2 Å に位置する Val149 をアスパラギン酸に置換した。調製した変異体

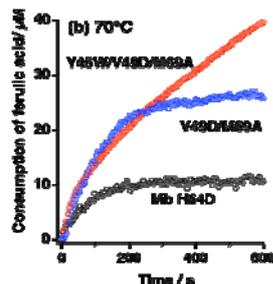


図 3 シトクロム *c*<sub>552</sub> とミオグロビン変異体によるフェルラ酸の酸化活性

(V49D/M69A) の触媒活性は、温度の上昇に伴って増大し、70°C では、天然に匹敵する高いペルオキシダーゼ活性を示すミオグロビンの H64D 変異体よりも高い活性を示すことが明らかとな

っている。

## 5. 今後の計画

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ることを見だし、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 1.65 Å)、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。

## 6. これまでの発表論文等

- (1) H. Nakajima, K. Ramanathan, N. Kawaba, and Y. Watanabe, "Rational engineering of *Thermus thermophilus* cytochrome *c*<sub>552</sub> to a thermally tolerant artificial peroxidase." *Dalton Transactions*, **39**, 3105-3114 (2010).
- (2) H. Nakajima, Y. Ichikawa, Y. Satake, N. Takatani, S. K. Manna, J. Rajbongshi, S. Mazumdar, and Y. Watanabe, "Engineering of *Thermus Thermophilus* Cytochrome *c*<sub>552</sub>: Thermally Tolerant Artificial Peroxidase," *ChemBioChem.*, **9**, 2954-2957 (2008).
- (3) O. Shoji, T. Fujishiro, H. Nakajima, M. Kim, S. Nagano, Y. Shiro, and Y. Watanabe, "Hydrogen Peroxide Dependent Mono-oxygenations by Tricking the Substrate Recognition of Cytochrome P450<sub>BSp</sub>." *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 3656-3659 (2007).

ホームページ

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