

平成25年9月1日発行(毎月1回1日発行)通巻748号 昭和15年4月18日第3種郵便物認可 CODEN:KAKYAU ISSN 0451-1964

C H E M I S T R Y

化学

SEPTEMBER
2013
Vol.68

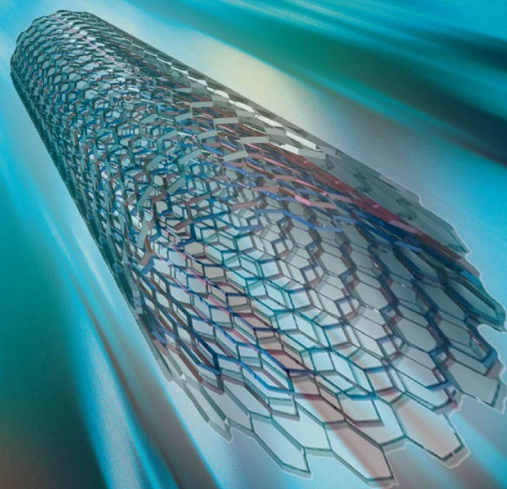
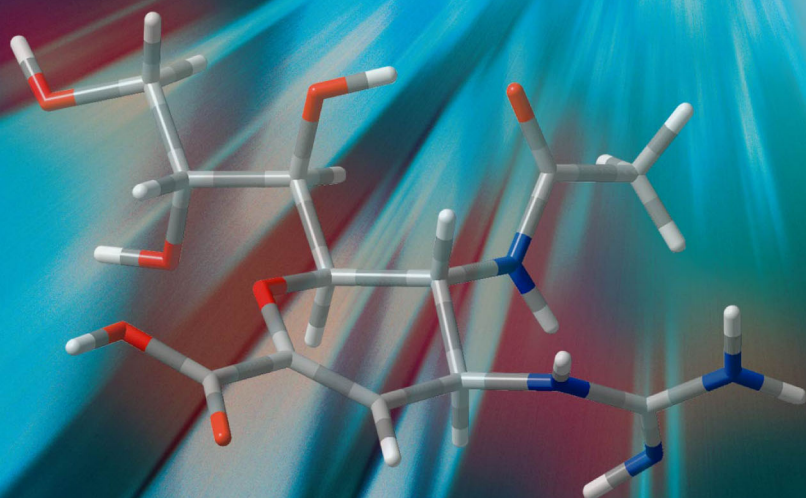
9

解説 • Research article

医薬品合成の 革新的な不斉触媒反応

研究物語 • Research story

酵素を“誤作動”させて行う有機合成



酵素を“誤作動”させて行う有機合成

—— 酵素反応を有機化学に利用するための反応制御

莊 司長三¹・渡辺 芳人²

¹名古屋大学大学院理学研究科・²同大学物質科学国際研究センター

酵素のシトクロム P450 (P450) に、本来の対基質に形状がよく似た疑似基質 (デコイ分子) を取り込ませ、意図的に誤作動を引き起こす新しいバイオ触媒系を開発した。この反応システムにより、通常は反応しない有機化合物を P450 で酸化することができた。

酵素反応を不活性化化合物へ応用する

飽和炭化水素や芳香族化合物などの不活性化有機化合物の水酸化反応は、医薬品に代表される機能性物質の合成に不可欠な重要な反応であるが、高温・高圧など過酷な条件を必要とする場合が多く、より環境に配慮した合成法が求められている。一方、生体内で活躍する多くの金属酵素は、常温・常圧の温和な条件下で、不活性化化合物の化学変換反応を行っており、これらの酵素反応を高度に制御できれば、環境負荷の低い理想的な物質生産が可能になると考えられてきた。

図 1 (a) に示すシトクロム P450 (P450) は、生物界に広範に存在する酵素群で、三角形プリズム型の構造をしており、その中心部分にヘムと呼ばれる鉄ポルフィリン錯体 (図 1b) をもっている。そして P450 は図 1 (c) の外側の経路で還元系から供給される電子とプロトンを使って酸素分子を還元的に活性化し、通常よりヘムの酸化当量が高い状態の酸化活性種であるオキソフェリルポルフィリン π -カチオンラジカル

(compound I) によって、不活性化有機化合物の水酸化を行うことが知られている。なかでも、細菌由来の P450 は触媒

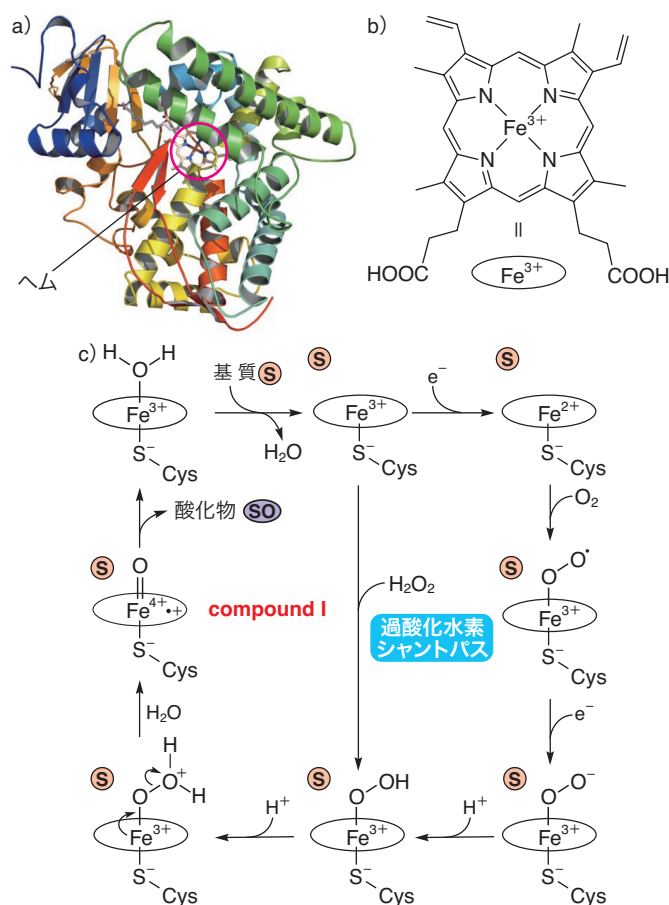


図 1 シトクロム P450

a) 後述するフェノールの合成を達成したシトクロム P450BM3 の結晶構造 (PDB ID: 1fag), b) ヘムの構造, c) シトクロム P450 の反応機構。S が長鎖脂肪酸に対応し、長鎖脂肪酸が取り込まれると、ヘムに配位していた水分子が取り除かれると反応が始まる。

しょうじ・おさみ ● 名古屋大学大学院理学研究科准教授, 2002 年千葉大学大学院自然科学研究科博士後期課程修了, <研究テーマ> バイオ触媒の開発, 細菌由来タンパク質の機能化, <趣味> コーヒー

わたなべ・よしひと ● 名古屋大学理事・副総長 (併任), 同大学物質科学国際研究センター教授, 1982 年筑波大学大学院化学研究科博士課程修了, <研究テーマ> 生物無機化学, <趣味> スキー, ドラム, エレキギター

活性が非常に高いために、バイオ触媒への利用が期待されてきたが、基質特異性(基質に対する選択性)の高さから対象の基質以外とは反応せず、汎用が困難であった。本来の基質以外の化合物を水酸化させるにはこの高い基質特異性を変える必要があり、遺伝子操作によって酵素を構成するアミノ酸を変更する変異導入を繰り返す手法を中心に多くの研究が展開されてきた。

過酸化水素駆動型 P450 との出会い

筆者(莊司)が P450 の研究を始めたのは、博士研究員として名古屋大学の渡辺芳人研究室に着任した 2005 年からであった。筆者は高分子化学で学位を取得後、博士研究員としてポルフィリン超分子組織体の研究を 3 年間行ったのち名古屋にやって来たので、タンパク質を取り扱った経験はなく、タンパク質や酵素に関してはまったくの素人であった。接点といえば、P450 が鉄ポルフィリン錯体を含むヘムタンパク質であるということだけだった。しかし、逆に素人であったことが幸いし、P450 の先行研究に縛られず、後述する少し変わった発想で研究を展開できたのだと自負している。

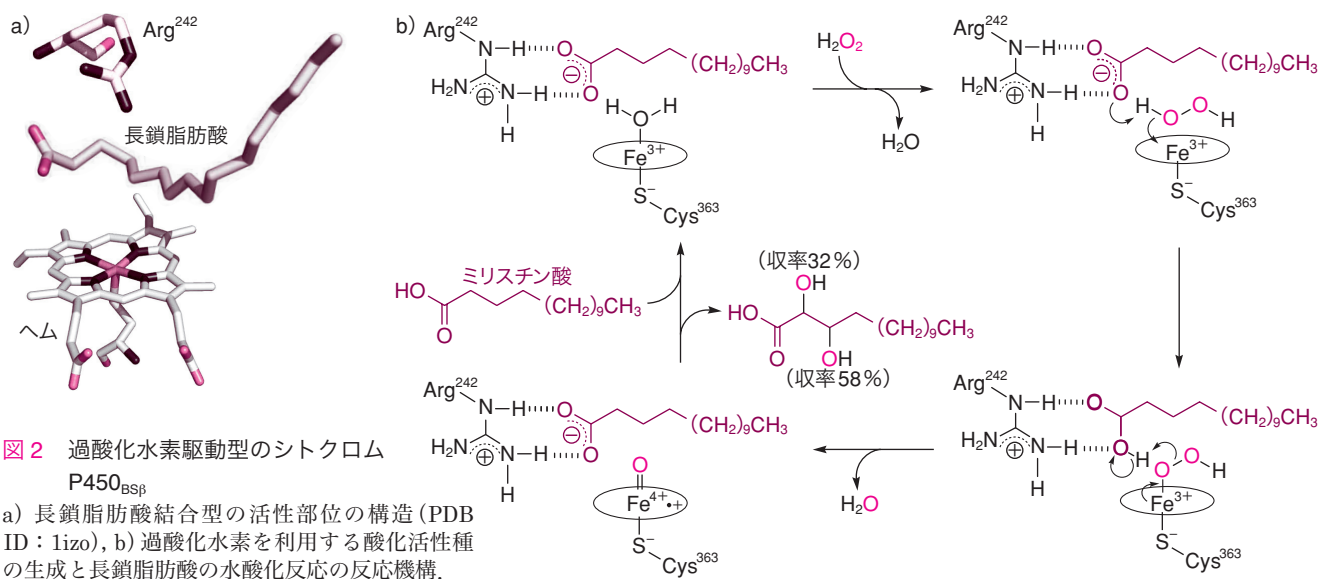
さて、過酸化水素を触媒反応に利用可能な珍しい P450 がある^{1,2)}とのことで、この P450 を使って実用的なバイオ触媒を開発しようと決め、当時学部 4 年生であった藤城貴史君とともに研究を始めたのだが、この過酸化水素駆動型 P450 の反応機構が特殊であったため、しばらくは進展もなく時間だけが過ぎていった。研究対象としたのは、枯草菌(納豆菌も枯草菌の仲間)由来の P450_{BSP} で、例外的に図 1(c)の中央を通る過酸化水素シャントパスと呼ばれる経路で酸化活性種

を生成し、長鎖脂肪酸を水酸化する³⁾。安価で取り扱いやすい過酸化水素を利用できる長所はあるが、P450_{BSP} は基質に対する選択性が非常に高く、長鎖脂肪酸以外を水酸化することはできなかった。なぜなら、基質のカルボキシ基が酸化活性種の生成に不可欠なため、長鎖脂肪酸以外を水酸化しないように精密に設計されていたからである。パルミチン酸結合型の P450_{BSP} の X 線結晶構造解析から¹⁾、長鎖脂肪酸のカルボキシ基がヘム近傍の 242 番目のアルギニン(Arg²⁴²)と静電相互作用して固定され(図 2 a)、このカルボキシ基が過酸化水素を用いた酸化活性種生成反応において、プロトンの受け渡しを行う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していた(図 2 b)。

思いついた「デコイ」分子

試行錯誤を繰り返しながら研究を続けて半年ほど経ったある日、それ自体は水酸化されないが、カルボキシ基をもつために酸化活性種は生成されてしまう疑似基質(デコイ分子と命名)を取り込ませて P450_{BSP} を強制的に「ON」の状態にしてしまおうとの発想が生まれた。デコイとは、カモ(鳥)に似せてつくられた模型で、標的をおびき寄せる仕掛けや罠を意味する。デコイ分子を取り込ませることで P450_{BSP} の酸化活性種は生成されても消費されずに残ってしまうはずなので、この活性種と目的の第二の基質を反応させればよいのでは、と単純に考えたのである(図 3)。

この発想は、実験的事実に裏付けられたものであった。P450_{BSP} は炭素数が 14 前後の長鎖脂肪酸(ミリスチン酸)を効率よく水酸化するが、鎖長が短くなるにつれて水酸化活性



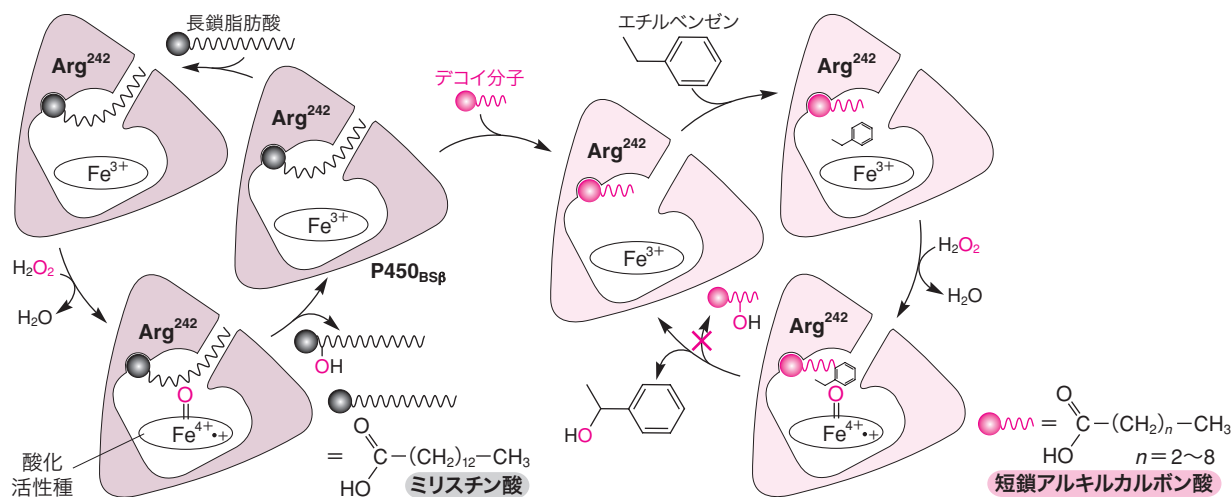


図3 シトクロム P450_{BSβ} による水酸化反応の模式図

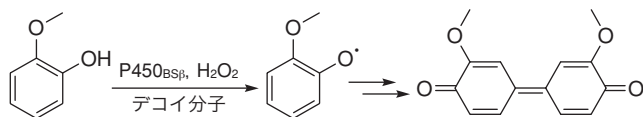
長鎖脂肪酸の水酸化反応(左)とデコイ分子(鎖長の短いアルキルカルボン酸)を用いるエチルベンゼンの水酸化反応(右)。

が減少し、炭素数10以下のアルキルカルボン酸になると水酸化することができなくなる。また、長鎖脂肪酸の水素原子を重水素で置換した重水素化長鎖脂肪酸の場合には、反応速度が遅くなることがすでに報告されていた⁴⁾。そこで、鎖長が短く、すべての水素原子が重水素化された重水素化ヘキサン酸を使おうと試薬カタログを調べてみると、非常に高価な代物であった(2013年7月現在で1g=6万円, CasNo: 95348-44-0)。「鎖長が短いヘキサン酸は、そもそも酸化されないはずなのだから重水素化する必要はない」と自分にいい聞かせ、高価な重水素化ヘキサン酸の購入を諦めて25 mLで1500円程度であったヘキサン酸を購入し、仮説を実証する実験を開始した。このときに重水素化物を使用しなかった

ことで、結果的にさまざまなデコイ分子を試すことができたのは、まさに「塞翁が馬」であった。

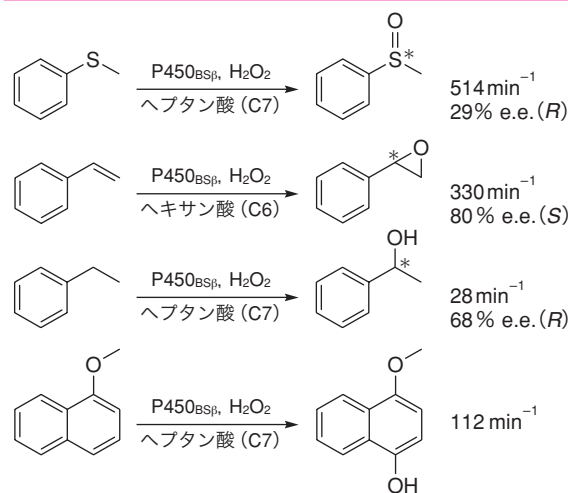
ヘキサン酸がデコイ分子として働くのかを確認するため、グアイアコールの一電子酸化反応を行った。グアイアコールは、酸化されると可視光領域に吸収をもつ二量体を形成するため(表1参照)、反応溶液が褐色に変化するので、視覚的に反応の進行を確認できる。ヘキサン酸のエタノール溶液をP450_{BSβ}とグアイアコールの混合液に加え、最後に過酸化水素を加えてみると、驚くほど早く溶液が褐色に変化した。「久しぶりに化学の神様のご褒美をいただいた」と感じた瞬間であった⁵⁾。さらに興味深かったのは、デコイ分子のアルキル鎖長により酸化活性が変化し、なかでもヘプタン酸が最大の

表1 グアイアコールの一電子酸化反応活性とアルキルカルボン酸(デコイ分子)の鎖長の関連



デコイ分子(炭素数)	回転数/分
なし	0
酢酸(C2)	0
プロピオン酸(C3)	26
ブタン酸(酪酸)(C4)	230
ペンタン酸(吉草酸)(C5)	1900
ヘキサン酸(カプロン酸)(C6)	2420
ヘプタン酸(エナント酸)(C7)	3750
オクタン酸(カプリル酸)(C8)	2490
ノナン酸(ベラルゴン酸)(C9)	2380
デカン酸(カプリン酸)(C10)	2360
ミリスチン酸(C14)	14

表2 デコイ分子存在下での P450_{BSβ} による酸化反応



活性を与えたことである。すなわち、デコイ分子の構造により酵素反応活性を制御できることを示していた(表 1)⁵⁾。

大学院入試に無事合格し、研究を再開した藤城君にこれらの実験事実を伝え、彼は表 2 のような長鎖脂肪酸とはまったく構造の異なるさまざまな基質の酸化反応が、P450_{BSβ} にデコイ分子を添加するだけで達成できることを、あっという間に明らかにしてくれた^{5~7)}。また、デコイ分子が長鎖脂肪酸と同じように P450_{BSβ} に取り込まれていることを X 線結晶構造解析により明らかにし、本反応が P450_{BSβ} が鎖長の短いアルキルカルボン酸を長鎖脂肪酸と勘違いした誤作動による反応系であることを実証した⁸⁾。

さらに藤城君は、別の過酸化水素を利用可能な P450_{SPα}⁹⁾ にもデコイ分子を利用する手法が適用できること、また P450_{SPα} ではデコイ分子にイブプロフェン(カルボキシ基をもつ解熱鎮痛剤)が利用でき、イブプロフェンの α 位の不斉によって不斉選択的な酸化反応が可能であることも発見してくれた¹⁰⁾。デコイ分子を用いて、生成物のエナンチオ選択性をも制御可能な反応系を開発することができたことになる。

フッ素で酵素を騙す

フッ素の原子半径は水素原子に近く、基質の水素をフッ素で置換したフッ素化物の構造は、本来の基質によく似たものになる。一方で、C-F 結合は C-H 結合よりも安定で、P450 は C-F 結合を水酸化することができないため、フッ素化物は水酸化されない不活性な基質となる。筆者らは、研究の早い段階でフッ素化物がデコイ分子として利用できるのではないかと考えていた。しかし、前述の過酸化水素駆動型の P450_{BSβ} では、長鎖脂肪酸の水素をフッ素に置換したパーフルオロアルキルカルボン酸(PFC)はデコイ分子としては機

能しなかった。PFC の疎水的な性質により、親水的な過酸化水素が取り込まれにくくなったためと、電気陰性度の高いフッ素の影響で PFC のカルボキシ基の酸性度が低い(すなわちより酸性である)ため、PFC のカルボキシ基は過酸化水素を利用する酸化活性種の生成反応で一般酸塩基触媒としては機能しなかったのではないかと考えている。

デコイ分子としては使えないと諦めていた PFC に再び着目したのは、P450 のなかでも最大の活性をもつことで知られる巨大菌由来の P450BM3 (図 1a) にデコイ分子を適用させようと研究を開始してすぐのことであつた。この研究は、博士研究員の川上了史博士とともに 2009 年から始めた。川上博士は、ホヤによるバナジウムの濃縮に関する研究で博士号を取得後、すぐに博士研究員として着任したので、ゼロからバイオ酵素の開発に挑戦したことになる。渡辺研は、筆者らを含め異分野からの挑戦者が多く、少し変わった研究が育つ土壌があり、P450BM3 の研究も川上博士との議論を繰り返すことで成熟されていった研究であつたと思う。

P450BM3 は、ほかの P450 と同じく酸素分子を還元的に活性化して酸化活性種を生成し(図 1c)、炭素数が 16 前後の長鎖脂肪酸のアルキル鎖末端部分を水酸化する(図 4b)^{11,12)}。P450_{BSβ} とは長鎖脂肪酸の取り込まれる向きが逆で、カルボキシ基はタンパク質の外側にある 47 番目のアルギニン(Arg⁴⁷) および 51 番目のチロシン(Tyr⁵¹) と相互作用するのだが(図 4a)¹³⁾、P450BM3 も長鎖脂肪酸の取り込みが反応開始のトリガーとなっていて、長鎖脂肪酸が適切な位置に取り込まれた場合にのみ酸化活性種を生成するように設計されている。したがって、長鎖脂肪酸と構造が大きく異なる基質の場合には酸化活性種が生成されず、酸化反応は進行しない。

そこで、鎖長の短いアルキルカルボン酸を P450BM3 に取り込ませれば、長鎖脂肪酸以外の基質を水酸化できるだろうと考えた。しかし、そうは問屋が卸さなかった。P450BM3 では、酸化活性は低いものの、鎖長が短いカルボン酸が水酸化される反応が進行してしまい、筆者の思い描いた第二の基質が優先的に酸化される反応系にはならなかった。

デコイ分子の水酸化を防ごうと議論しているうちに、デコイ分子として忘れ去られていた PFC の存在を思いだした。過酸化水素駆動型の P450_{BSβ} とは異なり、P450BM3 では、長鎖脂肪酸のカルボキ

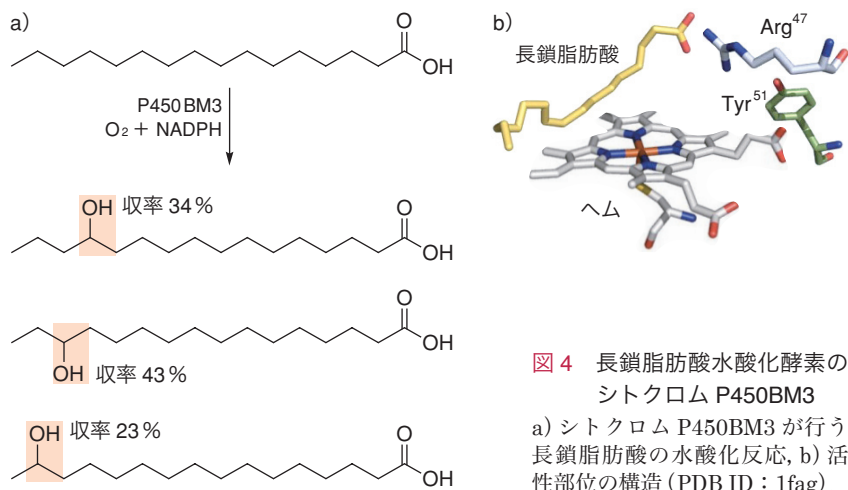


図 4 長鎖脂肪酸水酸化酵素のシトクロム P450BM3
a) シトクロム P450BM3 が行う長鎖脂肪酸の水酸化反応、b) 活性部位の構造 (PDB ID: 1fag)。

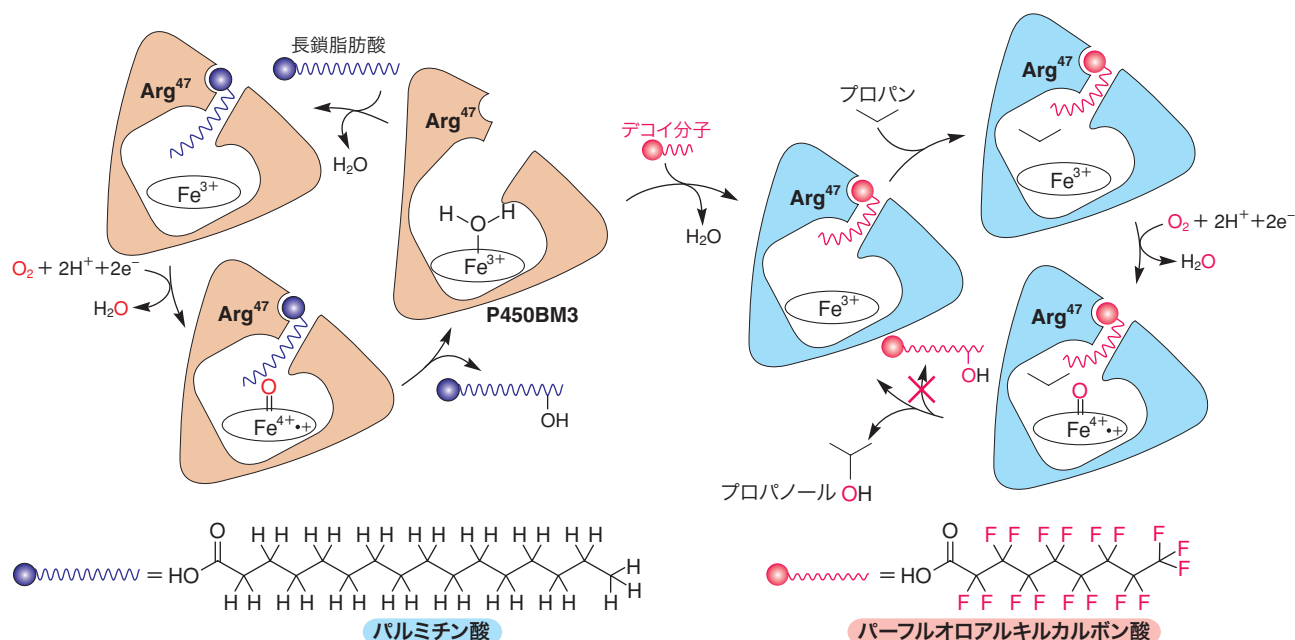


図5 シトクロム P450BM3 による水酸化反応の模式図

長鎖脂肪酸の水酸化反応(左), デコイ分子(パーフルオロアルキルカルボン酸)を用いるプロパンの水酸化反応(右).

シ基は酸化活性種生成には直接に関与していないので, PFC は単純に水酸化されないデコイ分子として利用できるはずと予想したのだ(図5).

「PFC でやってみよう」との結論に達してほどなくして, 川上博士がガス状アルカンであるプロパンの水酸化実験を行ったところ, PFC の効果は絶大であった. 筆者らの狙いどおり, P450BM3 は長鎖脂肪酸と構造の似た PFC を対象基質と勘違いして取り込み, P450BM3 のスイッチは強制的に「ON」の状態になった. フッ素を使って P450BM3 を騙すことができたのだ. 表3に P450BM3 によるさまざまな基質の水酸化反応を示す^{14~16}. プロパンの水酸化反応では, 毎分 68 回転とガス状アルカンの水酸化としては比較的高い触媒活性を示した¹⁴. さらに興味深いことに, 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 PFC (炭素数 10) が, 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 PFC (炭素数 9 と 8) が効果的に機能し,

PFC のアルキル鎖長により P450BM3 の反応空間サイズの制御が可能であった¹⁴. ほかに, 加圧下 (5 気圧) ではあるが, 不活性なエタンの水酸化に成功し, エタンを直接的にエタノールに変換することができた¹⁵.

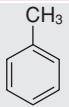
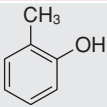
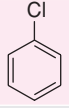
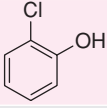
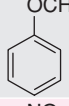
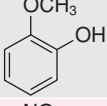
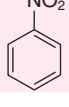
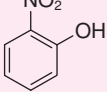
ベンゼンの水酸化によるフェノールの合成

ベンゼンは非常に安定な芳香族化合物であり, ベンゼンをフェノールに変換する工業的手法は, ベンゼンを 250 °C, 30 気圧でプロピレンと反応させてクメンに変換し, クメンを酸化してフェノールを合成するクメン法が主流である. クメン法はベンゼンを高温・高圧で反応させる必要があるだけでなく, 副生成物として多量のアセトンが生成してしまうため, ベンゼンを出発物質とする新たなフェノール合成法の開発が求められてきた. また, ベンゼンを水酸化して得られるフェノールは, ベンゼンよりも酸化されやすく, 過剰酸化物を形成してしまうことが多いため, ベンゼンの直接酸化反応

表3 PFC (デコイ分子) 存在下での P450BM3 の活性^{14~16}

基 質	生 成 物	最大活性を与える デコイ分子(炭素数)	回転数 / 分
エタン (5 気圧)	エタノール	パーフルオロデカン酸 (PFC10)	0.67
プロパン	2-プロパノール	パーフルオロデカン酸 (PFC10)	67
ブタン	2-ブタノール	パーフルオロノナン酸 (PFC9)	113
シクロヘキサン	シクロヘキサノール	パーフルオロノナン酸 (PFC9)	110
ベンゼン	フェノール	パーフルオロノナン酸 (PFC9)	120

表4 PFC(デコイ分子)存在下でのP450BM3による一置換ベンゼンの水酸化反応

基 質	主 生 成 物	回転数/分
		220
		120
		260
		0.9

によるフェノールの合成では、このフェノールの過剰酸化反応をいかにして抑制するかも重要であった。

ガス状アルカンの水酸化が一段落ついたころ、「デコイ分子を利用するシステムで、ベンゼンを水酸化できたらインパクトありますね」と何気なく話していたところ、川上博士からベンゼンの水酸化反応が進行するデータを見せられた。「室温でベンゼンが水酸化できるの？これすごくない？」と驚いたのを覚えている。そして当時、修士1年生であった國松辰弥君がこの反応を丹念に調べて、ベンゼンからフェノールが選択的に得られることを明らかにしてくれた(表3)¹⁶⁾。

フェノールが過剰に酸化されることがなかったのは、疎水性のアミノ酸から構成されるP450BM3の活性部位とPFCの疎水的な性質のため、親水的なフェノールはただちに活性部位から放出されたからと考えられる。期せずして、ベンゼンの水酸化に理想的な反応空間が形成されていたのだ。さらに國松君は、一置換ベンゼン(トルエン、クロロベンゼン、アニソール)などをオルト選択的に水酸化できることを発見してくれた。メタ配向性のニトロベンゼンやアセチルベンゼンでさえもオルト位が選択的に水酸化されるのは驚愕である(表4)¹⁶⁾。筆者らはこれを位置選択的な芳香環の水酸化の第一歩と考えており、今後はデコイ分子の構造を変えることで、この位置選択制を制御できる反応システムへと展開しようとしている。

以上、基質特異性の高い細菌由来のP450にデコイ分子を添加し、意図的に誤作動を引き起こすと、酵素の基質特異性を大きく変換することができる新規手法の発見経緯とこれま

での展開を紹介した。酵素の機能改変というと、遺伝子操作によるアミノ酸置換を繰り返す「人工進化法」に代表される変異導入が一般的で効果も大きいですが、本手法は、天然に存在する酵素をそのまま利用でき、遺伝子操作によってタンパク質自体の改変をする必要がない。変異導入と組み合わせる利用することも可能であるので、本手法を酵素の機能改変法のもう一つの柱として確立することを目指して、第二世代のデコイ分子の合成と機能評価を行っている。

筆者は研究を進めるにあたり、遊び心をもって研究を楽しむことを大切にしている。現在の研究は、天然に存在するタンパク質が自然界では滅多に接することがない化学物質と出会うと、通常とは異なるタンパク質のリアクションがあると信じて、「タンパク質を相手にした悪戯」を繰り返しているといったところだろうか。科学の研究というと、どうしても堅苦しく考えがちであるが、遊び心をもつことを忘れなければ、人とは違う独創的な研究を発想できるのではないかなと思って

謝辞：本稿で紹介した研究は、博士研究員と学生諸氏の努力の賜物であり、心から感謝いたします。また、国内外の多くの共同研究者の方がたおよび研究を支援いただいた研究室のみなさまに深く感謝いたします。本稿で紹介した研究成果は、文部科学省科学研究費補助金基盤研究S、若手研究A、新学術領域研究「直截的物質変換をめざした分子活性化法の開発」の研究助成により行われました。この場を借りて感謝申し上げます。

参考文献

- 1) D.-S. Lee, A. Yamada, H. Sugimoto, I. Matsunaga, H. Ogura, K. Ichihara, S.-I. Adachi, S.-Y. Park, Y. Shiro, *J. Biol. Chem.*, **278**, 9761 (2003).
- 2) I. Matsunaga, A. Ueda, T. Sumimoto, K. Ichihara, M. Ayata, H. Ogura, *Arch. Biochem. Biophys.*, **394**, 45 (2001).
- 3) I. Matsunaga, A. Ueda, N. Fujiwara, T. Sumimoto, K. Ichihara, *Lipids*, **34**, 841 (1999).
- 4) I. Matsunaga, A. Yamada, D.-S. Lee, E. Obayashi, N. Fujiwara, K. Kobayashi, H. Ogura, Y. Shiro, *Biochemistry*, **41**, 1886 (2002).
- 5) O. Shoji, T. Fujishiro, H. Nakajima, M. Kim, S. Nagano, Y. Shiro, Y. Watanabe, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **46**, 3656 (2007).
- 6) O. Shoji, C. Wiese, T. Fujishiro, C. Shirataki, B. Wünsch, Y. Watanabe, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **15**, 1109 (2010).
- 7) T. Fujishiro, O. Shoji, Y. Watanabe, *Tetrahedron Lett.*, **52**, 395 (2010).
- 8) O. Shoji, T. Fujishiro, S. Nagano, S. Tanaka, T. Hirose, Y. Shiro, Y. Watanabe, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **15**, 1331 (2010).
- 9) T. Fujishiro, O. Shoji, S. Nagano, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, *J. Biol. Chem.*, **286**, 29941 (2011).
- 10) T. Fujishiro, O. Shoji, N. Kawakami, T. Watanabe, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, *Chem. Asian J.*, **7**, 2286 (2012).
- 11) L. O. Narhi, A. J. Fulco, *J. Biol. Chem.*, **261**, 7160 (1986).
- 12) S. S. Boddupalli, B. C. Pramanik, C. A. Slaughter, R. W. Estabrook, J. A. Peterson, *Arch. Biochem. Biophys.*, **292**, 20 (1992).
- 13) H. Y. Li, T. L. Poulos, *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 140 (1997).
- 14) N. Kawakami, O. Shoji, Y. Watanabe, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **50**, 5315 (2011).
- 15) N. Kawakami, O. Shoji, Y. Watanabe, *Chem. Sci.*, **4**, 2344 (2013).
- 16) O. Shoji, T. Kunimatsu, N. Kawakami, Y. Watanabe, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **52**, 6606 (2013).