

研究紹介

酸化酵素の誤作動を誘起する疑似基質
の開発と高難度酸化反応

～酵素だって間違える～

名古屋大学大学院理学研究科
庄司 長三

shoji.osami@a.mbox.nagoya-u.ac.jp

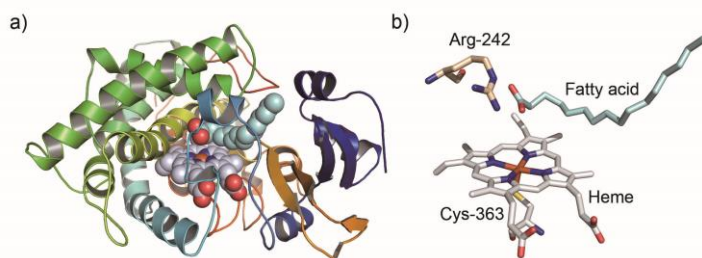


1. はじめに

酵素反応というと常に正確な反応というイメージが強いのではないかと思います。本稿で紹介させていただく我々の酵素反応システムは、酵素を誤作動させて間違った反応を進行させるという手法です。酵素を意図的に誤作動させるために我々が開発しているのは、本来の基質に形を似せた「疑似基質」というもので、阻害剤の一種に分類することができます。阻害剤は、酵素を不活性な状態にするものですが、阻害剤の中には本来の反応は阻害するけれども、それ以外の別の反応を加速させてしまうものが存在し、それが我々の開発している「疑似基質」です。本稿では、「疑似基質」を用いる少し変わった反応系がどのようにして生まれ、発展していったのかを紹介させていただきたいと思います。

2. 過酸化水素を利用するシトクロムP450の誤作動

2005年に名古屋大学に異動した筆者は、過酸化水素駆動型のP450_{BS β} に関する研究を始めました。P450はヘム(鉄ポルフィリン錯体)を活性中心として有するヘム酵素で、一般的には酸素分子を還元的に活性化して酸化活性種のオキソフェリルポルフィリン π -カチオンラジカル(Compound I)を生成し不活性な有機基質を酸化するのですが、

図1 P450_{BS β} の結晶構造 a)と活性部位の構造 b)

P450_{BS β} は、過酸化水素を利用して酸化活性種を生成することができる当時では珍しいP450でした。安価で取り扱いの容易な過酸化水素を利用できるP450_{BS β} は、バイオ触媒として利用するには魅力的ではありましたが、基質選択性が非常に高く、長鎖脂肪酸の水酸化反応以外の反応を触媒することはできないのが欠点でした。長鎖脂肪酸が結合したP450_{BS β} の結晶構造も明らかになっており(図1)、長鎖脂肪酸のカルボキシル基が活性部位のヘム近傍にあるカチオン性の側鎖をもつアルギニン(Arg242)と相互作用してヘムの上方に固定化されていることが分かっていました。また、この固定化されたカルボキシル基が過酸化水素を使って酸化活性種を生成する際に、プロトンの受け渡しに関与する一般酸塩基触媒として機能する反応機構が提唱されており(図2a)、P450_{BS β} がカルボキシル基を持たない基質を水酸化できない理由であること

が明らかにされていました。また、鎖長の短い脂肪酸は水酸化の対象とはならず、デカン酸よりも鎖長が短くなると水酸化反応が進行しないということも報告されていました。この酵素を使って何かしらの研究を進めるという非常に自由度の高い研究テーマを頂き、何をしようかとあれこれと思案しながら、まずは、鎖長の短い脂肪酸でも水酸化できるように酵素を変異導入によって改変することと、活性中心のヘムを合成金属錯体に置換して活性を強化するというようなことを当面の研究目標として研究を進めることを考えましたが、蛋白や酵素の研究に初めて取り組む筆者が文献を調べるうちに分かってきたことは、酵素や蛋白質の機能改変では、変異導入が非常に一般的で一辺倒な感じであることでした。そして、変異導入でインパクトのある研究成果を出すには、相当にクリアな結果を出す必要があると感じていました。すでにランダムに変異導入を行う分子進化工学なども含め変異導入による酵素機能改変では、多くの研究者が活躍されているという現状であり、変異導入による機能改変だけでは、自分の研究が似たような多くの研究に埋没してしまうとの危機感も覚えたのもこの頃のことです。

一通りの関連論文を読んだあとに、あれこれと半年ほど考えていたときに、「鎖長が短い脂肪酸は取り込まれているのかどうか？」が非常に気になりました。なぜなら、静電的な相互作用だけを考えれば、鎖長が短くても取り込まれる可能性が高かったからです。また、「そういった短い脂肪酸が取り込まれて水酸化反応が進行しなかったときに酸化活性種はどうなっているのだろうか？」ということがすごく気になりました。

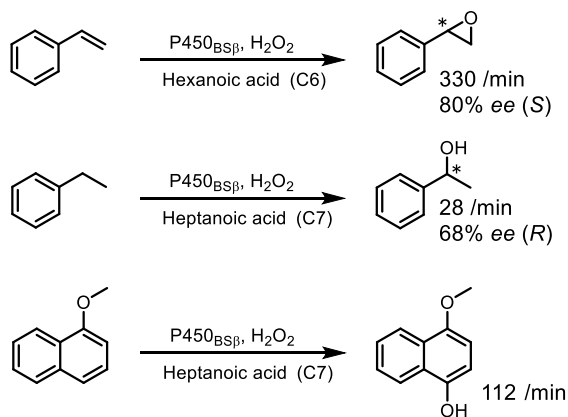


図3 デコイ分子存在下での P450_{BSB} による第二の基質の酸化

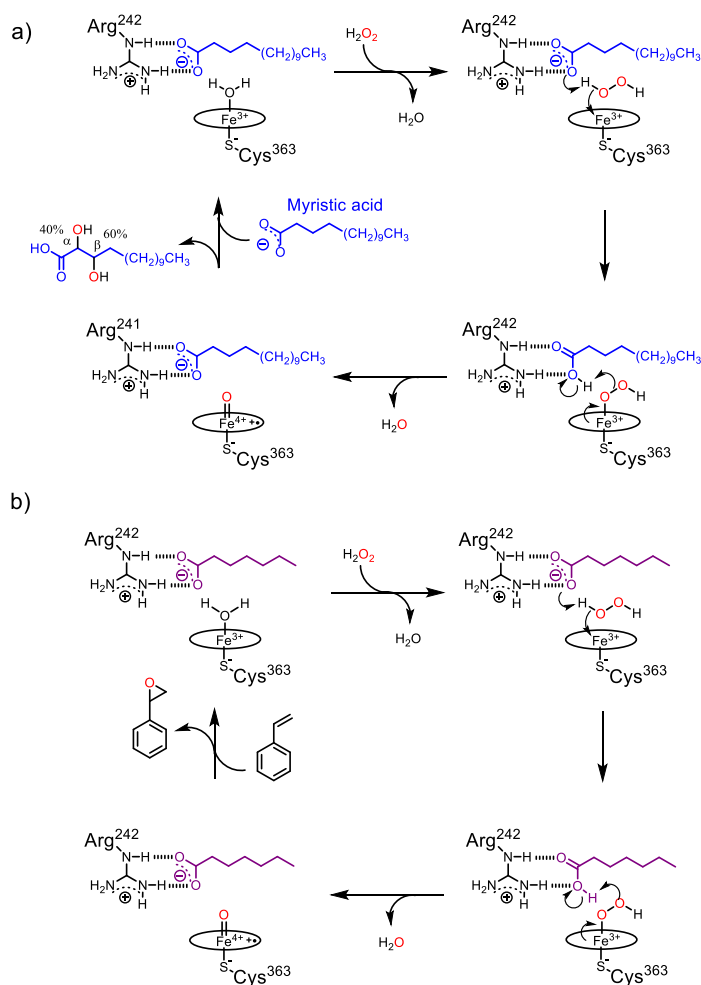


図2 P450_{BSB} による長鎖脂肪酸の水酸化 a)とデコイ分子存在下でのスチレンのエポキシ化 b) の反応機構

そこで、鎖長の短いヘキサン酸の存在下で、酸化されることで発色するグアイアコールを第二の基質として反応系に加えて反応を行ってみたところ、過酸化水素を加えてすぐに反応溶液が茶色に変色しました。ヘキサン酸の存在下で第二の基質が酸化されることを示した初めてのデータであり、これが「疑似基質」を用いる酸化酵素の基質特異性変換法の始まりです¹。我々は、「疑似基質」が第二の基質を呼び込む「おとり」のような役割をすることから、「疑似基質」を「デコイ分子」、デコイ分子を用いる酵素反応系を、「基質誤認識システム」と名付けました。デコイ分子を用いる反応では、スチレンのエポキシ化(図2b)や、エチルベンゼンのベンジル位の水酸化、そして、メキシナ

フタレンの芳香環水酸化が比較的早い速度で進行することなどを明らかにしました(図3)¹⁻²。P450_{BS_P}だけでなく、P450_{SP_a}などの他の過酸化水素駆動型P450にもデコイ分子を用いる反応系は適用できることを示すとともに³⁻⁴、様々なデコイ分子を検討する過程で、高濃度の酢酸イオンを含む緩衝溶液中で反応を行うだけで、第二の基質を酸化できるという事実に辿り着きました⁵。高濃度酢酸イオン存在下で反応を行うという発想は非常にシンプルではありますが、過酸化水素駆動型P450が報告されて20年以上も誰もそのようなことには気づかなかったというのは実に面白いことだと思っています。ヘム近傍にアルギニンやリジンなどのカルボキシル基が相互作用できるアミノ酸残基を持つ蛋白質では、高濃度の酢酸イオン存在下で同様の反応が進行すると予想していて、そういった研究も今後行っていきたいと考えています。

3. 酸素分子を活性化するシトクロムP450の誤作動

過酸化水素駆動型のP450では、長鎖脂肪酸のカルボキシル基は蛋白の内側に取込まれます。一方で、長鎖脂肪酸が取り込まれる向きが逆で、カルボキシル基が蛋白の外側を向いた状態で取り込まれるP450も存在するので、それらにデコイ分子として鎖長の短い脂肪酸を取り込ませれば、より小さな基質が活性部位に取り込まれて水酸化されるのではないかと考えて、長鎖脂肪酸の末端を水酸化するP450BM3の研究を2009年ごろからスタートさせました(図4, 図5a)。

P450BM3は、P450の中でも最も酸化活性が高いP450としても知られていて、毎分1万5千回転で酸化活性種を生成することができますが、基質特異性が高く、長鎖脂肪酸以外の基質に対する酸化活性は著しく低くなることが報告されており、目的の基質を酸化するための変異体の作成が盛んに行われていました。デコイ分子を用いる反応系が、P450研究の中でも研究者人口の多いP450BM3で成立すればそのインパクトは高いであろうと考えました。また、P450BM3の高い酸化活性をうまく生かすことができれば、有機合成反応にも利用可能なバイオ触媒反応系を開発できるのではとも考えていました。P450BM3の蛋白質発現系を譲ってもらい、P450BM3を発現・精製し、鎖長の短いデカン酸存在下で第二の基質の酸化反応を試しましたが、反応は全く進行しませんでした。P450BM3は、炭素数が16のパルミチン酸などを高効率に水酸化できますが、鎖長の短い脂肪酸では鎖長が短くなるほどに酸化活性が低くなることが報告されていたので、デカン酸(炭素数10)を取り込ませて誤作動させれば、カルボキシル基を持たない小さな基質であっても水酸化できると期待していましたが、そうは簡単に酵素を騙すことはできませんでした。そこで、デコイ分子としてパーフルオロアルキルカルボン酸を利用することを考えました。C-F結合はC-H結合よりも強く安定であるために、P450BM3はパーフルオロア

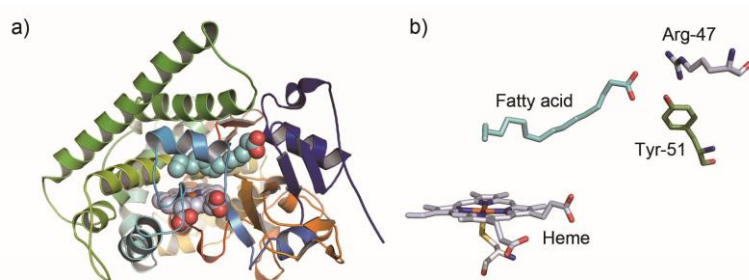


図4 P450BM3の結晶構造 a)と活性部位の構造 b)

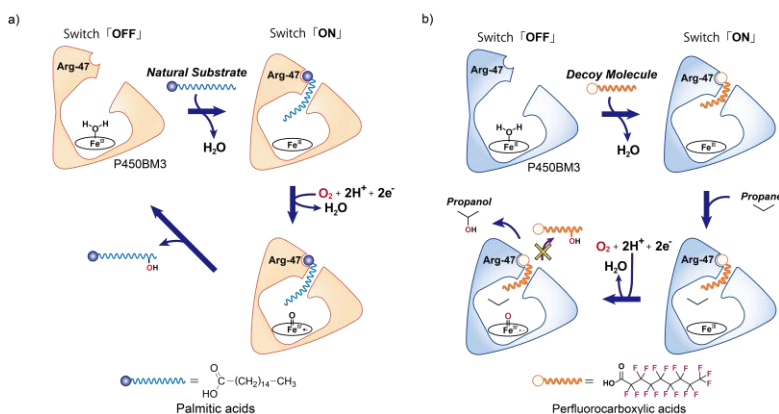


図5 P450BM3による長鎖脂肪酸の水酸化 a)とデコイ分子存在下でのプロパンの水酸化 b)の模式図

報告されており、目的の基質を酸化するための変異体の作成が盛んに行われていました。デコイ分子を用いる反応系が、P450研究の中でも研究者人口の多いP450BM3で成立すればそのインパクトは高いであろうと考えました。また、P450BM3の高い酸化活性をうまく生かすことができれば、有機合成反応にも利用可能なバイオ触媒反応系を開発できるのではとも考えていました。P450BM3の蛋白質発現系を譲ってもらい、P450BM3を発現・精製し、鎖長の短いデカン酸存在下で第二の基質の酸化反応を試しましたが、反応は全く進行しませんでした。P450BM3は、炭素数が16のパルミチン酸などを高効率に水酸化できますが、鎖長の短い脂肪酸では鎖長が短くなるほどに酸化活性が低くなることが報告されていたので、デカン酸(炭素数10)を取り込ませて誤作動させれば、カルボキシル基を持たない小さな基質であっても水酸化できると期待していましたが、そうは簡単に酵素を騙すことはできませんでした。そこで、デコイ分子としてパーフルオロアルキルカルボン酸を利用することを考えました。C-F結合はC-H結合よりも強く安定であるために、P450BM3はパーフルオロア

ルキルカルボン酸を水酸化することはできないけれども、フッ素原子と水素原子の原子半径は非常に近いパーフルオロアルキルカルボン酸の構造は、脂肪酸とほぼ同じになり、P450BM3には見分けられないのではないかと考えたからです。文献を調べてみるとP450BM3にパーフルオロアルキルカルボン酸を取り込ませた研究が報告されていましたが、第二の基質を加えて反応させるという研究は皆無でした。アルキル鎖長の異なる一連のパーフルオロアルキルカルボン酸を購入して、さっそく、プロパンの酸化を行ってみると、我々の期待したとおりにパーフルオロアルキルカルボン酸をデコイ分子として添加した場合にのみプロパンが水酸化され、パーフルオロデカン酸(PFC10)をデコイ分子として用いた場合に毎分67回転の速さでプロパノールが生成されました(図5b)⁶。ブタンやシクロヘキサンなども水酸化でき、さらに、ベンゼンを直接的にフェノールに変換する反応も進行しました⁷。ガス状アルカンの供給圧力を5気圧に上げて反応させるとエタンも僅かながら水酸化できることなども

見出すことができましたが(毎分0.67回転)⁸、パーフルオロアルキルカルボン酸をデコイ分子とする反応系の限界も分かってきてしまったので、なんとかして、もっと強力なデコイ分子を開発しなくてはと考えるようになり、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より強く結合して、より高い酸化活性を与える報告に着目しました。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すれば、より強くP450BM3に結合する第二世代のデコイ分子を開発できるのではと考えたのです(図6)。アイディアは非常にシンプルですが、第二世代のデコイ分子の効果は非常に高く、例えばパーフルオロノナン酸のカルボキシル基をロイシンで修飾したPFC9-L-Leuを用いると、プロパンの水酸化が毎分256回転、エタンの水酸化が毎分45回転で進行するようになりました⁹。さらに、幾度となく失敗し続けたデコイ分子を取り込んだP450BM3の結晶構造解析にも成功し、デコイ分子が取り込まれている状態をはじめて明らかにすることもできました(図7)⁹。結晶構造解析によって、デコイ分子がどのようにP450BM3に取り込まれているのかが分かったことは非常に重要でした。特に、第二世代デコイ分子の場合には、修飾したアミノ酸の効果でデコイ分子のアルキル鎖末端が活性中心のヘムから酸化を受けない距離に位置していることが分かり、この結晶構造解析のデータから、末端が酸化されないのであれば、パーフルオロアルキルカルボン酸を利用する必要はないのでは?といった発想につながっていき

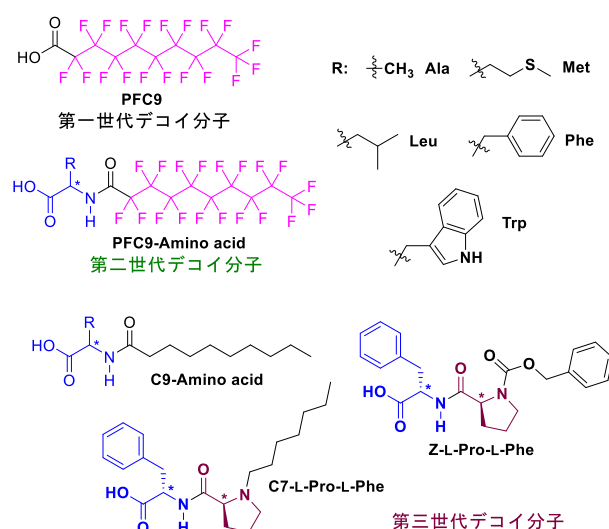


図6 P450BM3 に第二の基質を酸化させるために反応系に添加するデコイ分子

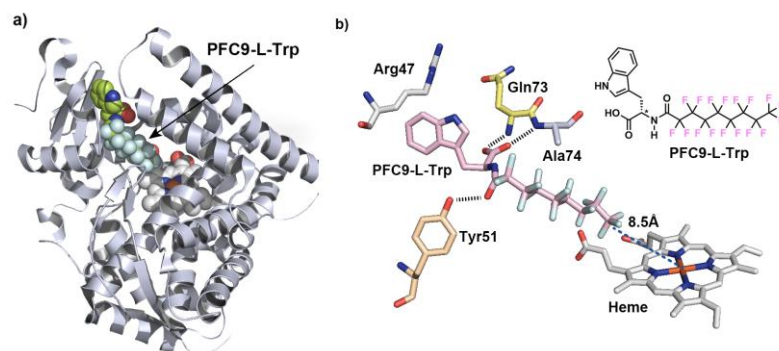


図7 PFC9-L-Trp を取り込んだ P450BM3 の結晶構造 a)と活性部位の構造 b)

原子を持たない第三世代デコイ分子開発がスタートしました。デコイ分子を構成する骨格にパーフルオロアルキルカルボン酸を用いている限りは、利用できるカルボン酸の数が少なくデコイ分子の構造に大きな制限がありましたが、フッ素化する必要がなくなったことで、ほとんどすべてのカルボン酸が利用可能となり、様々な構造のデコイ分子を作製できるようになりました。ベンゼンの水酸化反応では、Z-L-Pro-L-Phe (図6) が高い活性を示すとともに、結晶構造解析にも成功し、第三世代デコイ分子でも末端が活性中心から離れていることを明

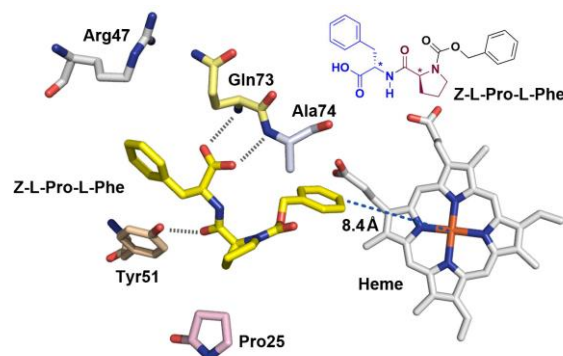


図8 Z-L-Pro-L-Phe を取り込んだ P450BM3 の活性部位の構造

らかにしています (図8)¹⁰。最終的に、長鎖脂肪酸とは大きく構造の異なるC7-L-Pro-L-Phe (図6) がベンゼンの高効率な水酸化 (毎分259回転, P450BM3一分子当たりの総回転数4万回転) を可能とするデコイ分子として機能することを報告することができました¹⁰。第三世代デコイ分子の開発に成功したことでデコイ分子を利用する反応の潜在的可能性が大きく広がりました。デコイ分子の構造の違いによって生成物のキラリティーを制御し、一つの酵素を用いながら、両方のエナンチオマーを作り分けられる反応系の開発にも成功しています¹¹。現在も、第三世代デコイ分子を中心に様々なデコイ分子を開発していますが、同時に第四世代デコイ分子はどのようなものになるのかが研究室でも活発に議論されていて、今後の研究展開を私自身が非常に楽しみにしています。

4. おわりに

筆者が研究テーマを考えるときには、まずは他の研究との差別化を図ることを第一に考えています。多くの論文を読んだり、学会発表を聞いたりして多くの情報をインプットすることも非常に重要なことではありますが、インプットした他の研究者の考え方が知らずのうちに影響して、似たような研究をしてしまいそうになることあり気を付けるようにしています。特に自身が主戦場としている学会での華麗な研究成果には憧れを抱くことも多く、所属する学会の先生方となんとなく似たようなテーマを設定してしまう可能性が高くなるため注意が必要だと思っています。こういったことを言ってしまうと多くの諸先輩方にお叱りを受けてしまうかもしれませんが、ある程度、自分の中に眠っている感性と直感を信じてテーマ設定をするように心がけています。私の考えた一風変わった研究の方向性と学生さんの試行錯誤とがうまく混ざり合わさると、これまでにない独特な研究として育っていくのだと思っています。前例のない変わったテーマを軌道修正しながら進めていく過程で多くの人材が育っていくのではないかとというのが私の考えで、皆で議論しながらテーマを熟成していくような研究を続けて、唯一無二の研究成果を多く報告できる体制になっていった欲しいと思っています。そして、独特な研究テーマを自らに立案できる人材が多く育つことを願っています。

謝辞

ここで紹介した研究成果は、2005年に筆者が名古屋大学の渡辺研究室に異動してからの研究成果の一部です。非常に恵まれた環境で自由に研究をさせていただき、渡辺芳人先生に深く感謝致します。また、強力に研究を進めてくれた博士研究員と学生諸氏に心から感謝いたします。本稿では、

そのほかの多くの研究成果に言及することができませんでしたが、それらの研究で頑張ってくれた学生諸子にも心から感謝しています。さらに、国内外の多くの共同研究者の方々および研究を支援いただいた渡辺研関係者の方々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「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」「高難度物質変換反応の開発を指向した精密制御反応場の創出」、科学技術振興機構CREST「多様な天然炭素資源の活用に資する革新的触媒と創出技術」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。

5. 参考文献

1. Shoji, O.; Fujishiro, T.; Nakajima, H.; Kim, M.; Nagano, S.; Shiro, Y.; Watanabe, Y., Hydrogen peroxide dependent monooxygenations by tricking the substrate recognition of cytochrome P450_{BSβ}. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46 (20), 3656-3659.
2. Shoji, O.; Wiese, C.; Fujishiro, T.; Shirataki, C.; Wünsch, B.; Watanabe, Y., Aromatic C–H bond hydroxylation by P450 peroxygenases: a facile colorimetric assay for monooxygenation activities of enzymes based on Russig's blue formation. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, 15 (7), 1109-1115.
3. Fujishiro, T.; Shoji, O.; Nagano, S.; Sugimoto, H.; Shiro, Y.; Watanabe, Y., Crystal structure of H₂O₂-dependent cytochrome P450_{SPα} with its bound fatty acid substrate: insight into the regioselective hydroxylation of fatty acids at the alpha position. *J. Biol. Chem.* **2011**, 286 (34), 29941-29950.
4. Fujishiro, T.; Shoji, O.; Kawakami, N.; Watanabe, T.; Sugimoto, H.; Shiro, Y.; Watanabe, Y., Chiral-substrate-assisted stereoselective epoxidation catalyzed by H₂O₂-dependent cytochrome P450_{SPα}. *Chem Asian J* **2012**, 7 (10), 2286-2293.
5. Onoda, H.; Shoji, O.; Watanabe, Y., Acetate anion-triggered peroxygenation of non-native substrates by wild-type cytochrome P450s. *Dalton Trans.* **2015**, 44 (34), 15316-15323.
6. Kawakami, N.; Shoji, O.; Watanabe, Y., Use of perfluorocarboxylic acids to trick cytochrome P450BM3 into initiating the hydroxylation of gaseous alkanes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50 (23), 5315-5318.
7. Shoji, O.; Kunitatsu, T.; Kawakami, N.; Watanabe, Y., Highly selective hydroxylation of benzene to phenol by wild-type cytochrome P450BM3 assisted by decoy molecules. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52 (26), 6606-6610.
8. Kawakami, N.; Shoji, O.; Watanabe, Y., Direct hydroxylation of primary carbons in small alkanes by wild-type cytochrome P450BM3 containing perfluorocarboxylic acids as decoy molecules. *Chem. Sci.* **2013**, 4 (6), 2344-2348.
9. Cong, Z.; Shoji, O.; Kasai, C.; Kawakami, N.; Sugimoto, H.; Shiro, Y.; Watanabe, Y., Activation of Wild-Type Cytochrome P450BM3 by the Next Generation of Decoy Molecules: Enhanced Hydroxylation of Gaseous Alkanes and Crystallographic Evidence. *ACS Catal.* **2015**, 5 (1), 150-156.
10. Shoji, O.; Yanagisawa, S.; Stanfield, J. K.; Suzuki, K.; Cong, Z.; Sugimoto, H.; Shiro, Y.; Watanabe, Y., Direct Hydroxylation of Benzene to Phenol by Cytochrome P450BM3 Triggered by Amino Acid Derivatives. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56 (35), 10324-10329.
11. Suzuki, K.; Stanfield, J. K.; Shoji, O.; Yanagisawa, S.; Sugimoto, H.; Shiro, Y.; Watanabe, Y., Control of stereoselectivity of benzylic hydroxylation catalysed by wild-type cytochrome P450BM3 using decoy molecules. *Catal. Sci. Technol.* **2017**, 7 (15), 3332-3338.