

# 酵素の基質誤認識を利用する 不活性炭化水素の水酸化

飛翔する  
若手研究者

三長司 荘

名古屋大学大学院理学研究科物質理学専攻 准教授

不活性な有機化合物を高効率に水酸化することが可能な細菌由来のシトクロムP450 (P450) は、基質に対する選択性が非常に高く、対象基質と異なる形状の分子を酸化することが難しい。本来の対象基質に構造がよく似た疑似基質をP450に取り込ませるとP450が誤作動して酸化活性種を生成し、その誤って生成してしまった強力なP450の酸化活性種を利用して、ガス状アルカンやベンゼンなどの高難度な酸化反応を行うことができる新しい触媒反応システムを開発した。

## はじめに

酵素は、常温、常圧の温和な条件下での反応を可能にする優れた生体触媒であり、酵素機能を高度に制御することができれば、環境負荷の低い理想的な物質生産が可能になる。酵素反応は、鍵と鍵穴の関係で説明されるように、鍵穴に合致する化学物質以外とは通常は反応しないように設計されている。ところが、鍵穴の形状に近い疑似基質（デコイ分子と名付けた）を酵素に結合させると酵素が誤作動し、様々な物質変換ができるようになる。本稿では、筆者らが行ってきたデコイ分子を用いる細菌由来 P450 の基質特異性の変換に関して紹介したい。

## シトクロムP450

P450 は、生物界に広範に存在する金属酵素で、ヘムと呼ばれる鉄ポルフィリン錯体を利用して酸素分子を活性化することにより、不活性な有機化合物の水酸化を行うことができる。P450 の中でも細菌由来の P450 は、触媒活性が非常に高く、バイオ触媒としての利用が期待されてきた。しかしながら、細菌由来の P450 は、基質に対する選択性が高く、対象基質以外とはほとんど反応しない。細菌由来の P450 を広く物質変換に利用可能にす

るためには、高い基質特異性を変換する必要がある。

## アルキル鎖長の違いで酵素を騙す

枯草菌由来の P450<sub>BSβ</sub> は、例外的に過酸化水素によって酸化活性種を生成し、長鎖脂肪酸を水酸化する。安価な過酸化水素を利用可能であったにもかかわらず、この酵素を利用しようとする試みはほとんどされなかった。なぜなら、P450<sub>BSβ</sub> は長鎖脂肪酸以外を水酸化することができなかったからである。一般的に、過酸化水素を利用可能なヘム酵素のヘムの近傍には、酸化活性種生成に必要なヒスチジンやアスパラギン酸などの一般酸塩基触媒として働くアミノ酸が存在するが、P450<sub>BSβ</sub> ではそのようなアミノ酸はみられず、それらの代わりに、長鎖脂肪酸のカルボキシル基が酸化活性種の生成に関与する（図 1 左）<sup>1)</sup>。基質のカルボキシル基が酸化活性種の生成に不可欠な独特の反応機構のために、P450<sub>BSβ</sub> は長鎖脂肪酸

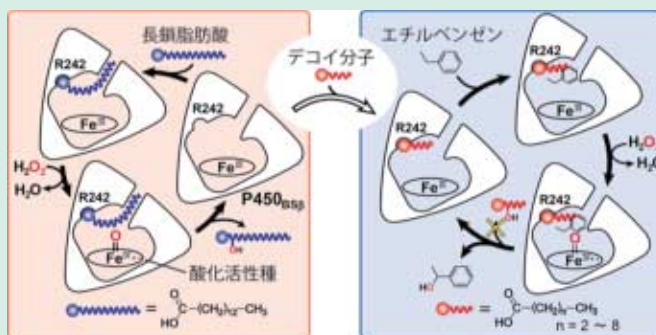


図 1 P450<sub>BSβ</sub> による長鎖脂肪酸の水酸化反応（左）とデコイ分子存在下でのエチルベンゼンの水酸化反応（右）の模式図



しょうじ・おさみ  
2002年千葉大学大学院自然科学研究科博士後期課程修了。同年科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業博士研究員(奈良先端科学技術大学院大学小夫家研究室), 05年名古屋大学物質科学国際研究センター博士研究員, 06年日本学術振興会特別研究員, 07年名古屋大学物質科学国際研究センター特任助教, 08年名古屋大学理学研究科物質学専攻化学科助教を経て, 13年より現職。その間, 12年ドルトムント工科大学(ドイツ)にて客員研究員。第27回若い世代の特別講演会(2013), 第五回バイオ関連化学シンポジウム講演賞(2011)。E-mail: shoji.osami@ambox.nagoya-u.ac.jp

以外を水酸化しないように高度に設計されていた。そこで, それ自体は水酸化されないが, カルボキシル基を有するために酸化活性種の生成はできてしまう疑似基質(デコイ分子)を取り込ませてP450<sub>BSβ</sub>を強制的に「ON」の状態にすることを考えた(図1右)。P450<sub>BSβ</sub>は炭素数が14前後の長鎖脂肪酸を効率よく水酸化するが, 炭素数10以下のアルキルカルボン酸を水酸化できない。鎖長の短いカルボン酸は, デコイ分子として機能すると予想し反応系に添加すると, 長鎖脂肪酸とは全く構造の異なるエチルベンゼンやスチレンなどの様々な基質をP450<sub>BSβ</sub>が酸化することを明らかにした<sup>2)</sup>。P450<sub>BSβ</sub>が鎖長の短いアルキルカルボン酸を, 対象基質であると間違えた誤作動を利用した反応系である。デコイ分子を利用する手法は過酸化水素を利用可能な他のP450にも利用できることを確認している<sup>3)</sup>。

### フッ素原子で酵素を騙す

巨大菌由来のP450BM3は, P450の中でも最大の活性を有する長鎖脂肪酸の水酸化酵素で, 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2上)。P450<sub>BSβ</sub>とは反応機構は異なるがP450BM3も長鎖脂肪酸の取り込みが反応を開始するトリガーとなっていて, 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。構造は似ているがP450BM3に酸化されないデコイ分子として長鎖脂肪酸のすべての水素

原子が原子半径の近いフッ素原子に置換された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た。C-F結合の結合解離エネルギー(116 kcal/mol)はC-H結合(95-99 kcal/mol)よりも大きく, P450BM3はC-F結合を水酸化することができない。鎖長が短い一連のパーフルオロアルキルカルボン酸(炭素数8-14)をデコイ分子として添加して反応を行うと, デコイ分子なしでは全く反応が進行しないプロパンやブタンなどのガス状飽和炭化水素やベンゼンの水酸化反応が進行した(図2下)<sup>4-6)</sup>。興味深いことに, プロパンのような小さなアルカンの場合には鎖長の長いデコイ分子が, ベンゼンや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デコイ分子が効果的に機能し, デコイ分子によりP450BM3の反応空間の制御が可能であった。また, ベンゼンの水酸化では, フェノールが選択的に得られ, フェノールが過剰酸化されることはなかった。疎水性のアミノ酸から構成される活性部位とパーフルオロアルキルカルボン酸の疎水的な性質のため, フェノールは直ちに活性部位から離脱していると考えられ, 生成物が過剰に酸化されない理想的な反応空間が形成されていると考えている。

### おわりに

このように, 基質特異性の高い細菌由来P450の高度に設計された反応機構を逆にとり, 疑似基質を添加してあえて誤作動を引き起すと, タンパク質のアミノ酸の置換(変異導入)を一切施すことなしに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を開発することができた。最後に, 本研究を遂行するにあたりご指導いただきました渡辺芳人教授に心から感謝いたします。また, 学生諸氏と博士研究員の努力に, そして多くの共同研究者の方々に深く感謝いたします。

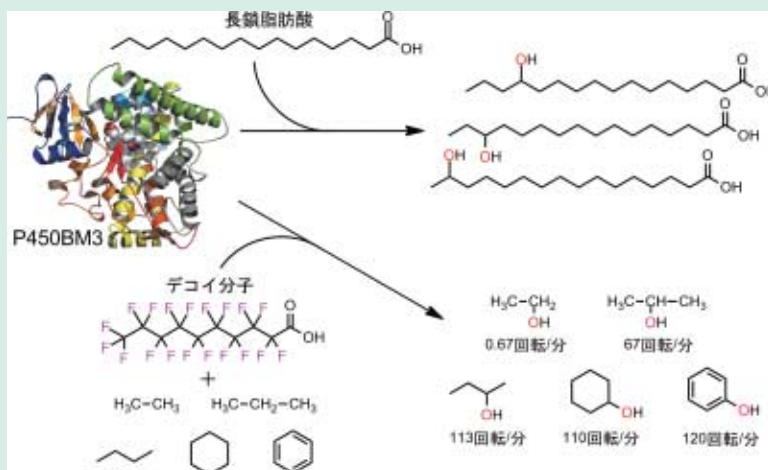


図2 P450BM3による長鎖脂肪酸の水酸化反応(上)とデコイ分子存在下でのアルカンとベンゼンの水酸化反応(下)

- 1) D. S. Lee et al., *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 9761.
- 2) O. Shoji et al., *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, 46, 3656.
- 3) O. Shoji et al., *Chem. Asian J.* **2012**, 7, 2286.
- 4) O. Shoji et al., *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, 50, 5315.
- 5) O. Shoji et al., *Chem. Sci.* **2013**, 4, 2344.
- 6) O. Shoji et al., *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, 52, 6606.