

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「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」
研究課題「生体触媒の誤作動状態を利用するメ
タンの直接的メタノール変換」

研究終了報告書

研究期間 2015年12月～2021年3月

研究代表者：荘司 長三
(名古屋大学大学院理学研究科 教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

長鎖脂肪酸の末端部分を選択的に水酸化する巨大菌由来のシトクロム P450BM3 (P450BM3) は、極めて高い水酸化活性を示すことから物質変換触媒としての利用が期待されてきたが、P450BM3 の基質に対する選択性が高く、長鎖脂肪酸と構造が異なる分子では反応効率が極端に低下する。P450BM3 に基質類似分子(デコイ分子)を取り込ませることによって、本来の対象基質である長鎖脂肪酸以外の様々な基質を水酸化できることをこれまでに明らかにした。本研究課題では、デコイ分子の改良を進め、第一世代デコイ分子のパーフルオロアルキルカルボン酸から第4世代のジペプチド誘導体まで、1000を超えるデコイ分子を合成し、ガス状アルカンの水酸化活性において、これまでに報告されたすべての P450 による水酸化活性を凌駕する活性を実現した。プロパン(50 気圧)の水酸化活性は毎分 2200 回転、エタン(50 気圧)の水酸化活性は、82.7 回転(触媒回転数 827 回転)に達した。ガス状アルカンの水酸化では、反応水溶液中のガス状アルカン濃度を高めるために、新規微小高圧反応装置を開発した。P450BM3 による水酸化反応では、酸素分子の活性化のために NADPH を添加する必要があるが、加圧後に NADPH を高圧状態の反応容器に入れる工夫が必要であった。また、高価な同位体ラベルメタンを用いるため、反応容器の小型化の必要性もあった。そこで、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の送液ポンプによる加圧と HPLC の空のカラムを反応容器として用いる全く新しい微小高圧反応装置を開発し、プロパンとエタンの P450BM3 による水酸化活性を大幅に向上させることに成功した。エタンが水酸化されていることは、 ^{13}C エタンを用いて反応を行うと ^{13}C エタノールが生成されることで確認した。非常に高価な ^{13}C エタンを用いる必要があったが、微小高圧反応装置の特性をうまく生かして、少量の ^{13}C エタンを用いて反応を複数回行って再現性を確認し、エタンが確かに水酸化されていることを実証した。メタンの水酸化では、デコイ分子の改変と高圧反応装置の利用だけでなく変異導入による活性部位の改変を組み合わせることにより、 ^{13}C メタンが水酸化され、 ^{13}C メタノールが炭素元素の天然同位体比を大きく超える割合で生成させることを確認した。触媒回転数は 1.4 回転と見積もられたが、活性の改善にむけて検出や反応条件の最適化を続けている。反応溶液中の微量なメタノールの検出には、「固相マイクロ抽出(SPME)」装置を用い、抽出条件を検討することで検出感度を向上させることができた。デコイ分子の開発の過程で、膜透過性デコイ分子の開発にも成功し、P450BM3 を過剰発現させた大腸菌をそのまま用いる反応系を確立した。さらに、P450BM3 をはじめから持つ巨大菌を利用するバイオリクターの創成へと繋げ、新しい概念の菌体内反応系の領域を開拓した。X 線構造解析では、いくつかのデコイ分子結合型 P450BM3 の構造を明らかにしてきたが、デコイ分子によっては結晶化ができずに構造解析ができない場合が多くあった。メタン水酸化に向けたデコイ分子の開発を続ける課程で、反応活性は低いが、結晶化が異常に速く進むデコイ分子の存在に気づき、結晶化促進デコイ分子としての利用法を確立した。結晶化促進デコイ分子を作用させて結晶化した P450BM3 の結晶を、細かく砕いて種結晶とすることで、これまで結晶化できなかったデコイ分子結合型 P450BM3 の結晶化に成功した。種結晶を用いる手法により良質な結晶が短時間(最短で 5 分)で得られるため、活性中心のヘムを合成金属錯体に置換した P450BM3 の結晶構造解析も可能となり、酸化活性種アナログとしてオキソモリブデン($\text{Mo}=\text{O}$)を持つメゾヘムを取り込ませた場合でも、高分解能での構造解析ができることを示した。そして、X 線自由電子レーザー(XFEL)による構造解析に必須の大量の微結晶の作成が、結晶化促進デコイ分子の発見により可能となり、杉本・久保グループが開発を続けていた SACL A の SFX(シリアルフェムト秒 X 線解析法)実験施設にて、XFEL による世界初の無損傷 P450BM3 の構造解析に成功した。微結晶 P450BM3 の酸素付加型の時間分解分光測定と構造解析を進めており、これらの構造情報をもとに、メタン水酸化活性の向上への挑戦を続けている。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1.

概要: 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した第三世代デコイ分子を合成してベンゼンの水酸化反応を検討し、フッ素原子を含まないデコイ分子であっても P450BM3 を活性化できることが明らかにした。単純なアルキルカルボン酸であっても、アルキル鎖長を短くして活性部位に中途半端に取り込ませると、本来の基質とは異なる反応が進行することを世界で初めて実証した。フェニルアラニンとプロリンを連結したジペプチドにアルキル鎖を修飾した C7-L-Pro-L-Phe が高い酸化活性を示し、ベンゼンは毎分 259 回転で水酸化され、P450BM3 一分子当たり 4 万回転を超える触媒活性を示した。O. Shoji, S. Yanagisawa, J. K. Stanfield, K. Suzuki, Z. Cong, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, "Direct Hydroxylation of Benzene to Phenol by Cytochrome P450BM3 Triggered by Amino Acid Derivatives" *Angew. Chem. Int. Ed.*, *56*, 10324-10329, 2017.

2.

概要: P450BM3 の良質な結晶を再現性良く作製する手法はこれまでになく、多くの結晶ドロップを仕込み、確率論的に当たりを見つける従来の結晶作成法が適用されてきた。1974 年に初めて P450BM3 が報告されてから 45 年以上もの間、研究者は P450BM3 の結晶化の困難に直面してきたと思われる。結晶化を促進するデコイ分子の発見によって、誰もが簡単に結晶を短時間で作成できるようになり P450BM3 の構造と機能の理解が飛躍的に進むものと期待できる。基質結合部位の空間において、低分子配位子をへムに配位結合させることで結晶の質を改善する手法は多く報告されているが、結晶化促進デコイ分子の効果は桁違いであり、シード法の適用によって、ほぼすべての P450BM3 を結晶化できるなど、圧倒的な破壊力とインパクトのある手法であるといえる。J. K. Stanfield, K. Omura, A. Matsumoto, C. Kasai, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji, "Crystals in Minutes: Instant On-Site Microcrystallisation of Various Flavours of the CYP102A1 (P450BM3) Haem Domain" *Angew. Chem. Int. Ed.*, *59*, 19, 7611-7618, 2020.

3.

概要: 蛋白質連結酵素を駆使することによって、還元ドメインを有する全長のシトクロム P450BM3 のへムをマンガンプロトポルフィリンに置換したハイブリッド金属酵素を作成することに成功した。マンガンを中心金属とする場合においても、酸素分子を還元的に活性化可能で、長鎖脂肪酸が水酸化活性されることを世界で初めて明らかにした。プロパンの水酸化反応では、1 級アルコールが通常のへムの場合に比べて多く生成されることから、マンガンを活性中心とする特徴ある反応系の開発に成功したといえる。K. Omura, Y. Aiba, H. Onoda, J. K. Stanfield, S. Ariyasu, H. Sugimoto, Y. Shiro, O. Shoji, Y. Watanabe, "Reconstitution of Full-Length P450BM3 with an Artificial Metal Complex by Utilising the Transpeptidase Sortase A", *Chem. Commun.*, *54*, 7892-7895, 2018.

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1.

概要: 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)のポンプと空のカラムを用いる微小高圧反応装置を開発し、プロパンとエタンの P450BM3 による水酸化活性を大幅に向上させることに成功した。50 気圧の反応条件で、エタンの水酸化活性は毎分 28 回転、総触媒回転数 280 回に達した。エタン水酸化反応は、¹³C エタンを用いて ¹³C エタノールが生成されることで確認した。プロパンの水酸化活性は、毎分 2200 回転にまで加速されることを明らかにした。S. Ariyasu, Y. Kodama, C. Kasai, Z. Cong, J. K. Stanfield, Y. Aiba, Y. Watanabe, O. Shoji, "Development of a High-Pressure Reactor Based on Liquid-Flow Pressurisation to Facilitate Enzymatic Hydroxylation of Gaseous Alkanes" *ChemCatChem*, *11*, 4709-4714, 2019.

2.

概要: X 線自由電子レーザー(XFEL)を駆使する結晶構造解析によって、P450nor の無損傷結晶構造と時間分解結晶構造解析に成功した。P450nor は微結晶の作成が可能であったため XFEL を測定することができたが、P450BM3 については微結晶の作成が難しく研究はほとんど進まなかったが、結晶化促進デコイ分子の開発によって、微結晶の作成が可能となり、

P450BM3 についても X 線のダメージの無い無損傷結晶構造を世界に先駆けて明らかにすることができた。T. Tosha, et al., Capturing an initial intermediate during the P450nor enzymatic reaction using time-resolved XFEL crystallography and caged-substrate” *Nature Communications*, 8, 1585 2017.

3.

概要: デコイ分子を利用する菌体内反応が、P450BM3 (CYP102A1) の本来の持ち主である巨大菌でも可能であることを明らかにした。天然に存在する菌体である巨大菌の脂肪酸の代謝経路をデコイ分子によって変更可能であることを示した世界初の研究成果である。巨大菌は、土壌細菌として広く土壌に存在するため、デコイ分子を土壌に散布するだけでベンゼンなどの環境汚染物質を分解できる土壌洗浄の用途に利用可能であることも示した。このような取り組みは世界的にも珍しく、同様の取り組みは皆無である。菌体をそのまま用いる物質変換手法としての利用も検討している。特開 2020-092674 環境浄化剤

< 代表的な論文 >

1.

概要: アピエチン酸のカルボキシル基をトリプトファンで修飾したデコイ分子が、P450BM3 の結晶化を促進することを見出した。さらに、得られた結晶を細かく砕いたシード結晶を用いることで、これまでに結晶化ができなかった P450BM3 の結晶化が可能になった。デコイ分子の中で最も高い活性を示す C7-Pro-Phe を取り込ませた P450BM3 や、ヘムの中心金属をマンガンやコバルト、ロジウムなどに置換した P450BM3 の結晶構造解析に成功した。J. K. Stanfield, K. Omura, A. Matsumoto, C. Kasai, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe, O. Shoji, “Crystals in Minutes: Instant On-Site Microcrystallisation of Various Flavours of the CYP102A1 (P450BM3) Haem Domain” *Angew. Chem. Int. Ed.*, 59, 19, 7611-7618, 2020.

2.

概要: 活性の高いデコイ分子が、二つのアミノ酸が結合したジペプチド骨格を基本骨格に持つことに着目し、600 種を超えるジペプチドを固相合成法により合成し、ベンゼンの水酸化をさらに加速するデコイ分子のスクリーニングを行い、ベンゼンやガス状アルカンの水酸化を大幅に向上させることに成功した。ベンゼンの水酸化活性は毎分 405 回転、エタンの水酸化は毎分 82.7 回転 (50 気圧) で進行する。いずれの活性も P450 としてはこれまでの最大活性であった。K. Yonemura, S. Ariyasu, J. K. Stanfield, K. Suzuki, H. Onoda, C. Kasai, H. Sugimoto, Y. Aiba, Y. Watanabe, O. Shoji, “Systematic Evolution of Decoy Molecules for the Highly Efficient Hydroxylation of Benzene and Small Alkanes Catalyzed by Wild-Type Cytochrome P450BM3” *ACS Catal.* 2020, 10, 9136-9144.

3.

概要: 新たに開発した大腸菌に取り込まれる擬似基質 (デコイ分子) を、P450BM3 を過剰発現させた大腸菌の懸濁液に加えるだけで、ベンゼンをフェノールへと変換できる反応系を開発した。常温常圧の温和な条件でベンゼンをフェノールに変換可能で、5 時間の反応でフェノールの収率は 59% に達する。フェノールがさらに酸化されたヒドロキノンも 16% の収率で得られ、ベンゼンの転換効率は 75% に達する。大腸菌は、再利用可能であることも確認した。M. Karasawa, J. K. Stanfield, S. Yanagisawa, O. Shoji, Y. Watanabe “Whole-Cell Biotransformation of Benzene to Phenol Catalysed by Intracellular Cytochrome P450BM3 Activated by External Additives”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 57, 12264-12269, 2018

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「荘司」グループ

研究代表者: 荘司長三 (名古屋大学大学院理学研究科 教授)

研究項目

- ・シトクロム P450BM3 変異体によるメタン水酸化と新規疑似基質の開発
- ・酸素活性化が可能なヘム置換シトクロム P450BM3 の開発
- ・メタン水酸化のための微小高圧反応装置の開発
- ・シトクロム P450BM3 を利用する菌体内での酸化反応系の開発
- ・シトクロム P450BM3 の動的構造解析のための蛋白質結晶化技術開発
- ・合成金属錯体を取り込ませた人工金属蛋白質の作製技術の開発

② 「杉本」グループ

主たる共同研究者: 杉本 宏 (理化学研究所放射光科学研究センター 専任研究員)

研究項目

- ・X 線結晶構造解析法による P450BM3 の基質アクセス経路の解析と反応場のデザイン
- ・X 線構造解析による基質およびデコイとタンパク質の相互作用解析
- ・X 線自由電子レーザーを利用した P450BM3 の無損傷構造解析

③ 「久保」グループ

主たる共同研究者: 久保 稔 (兵庫県立大学大学院生命理学研究科 教授)

研究項目

- ・微結晶に適用できる顕微時間分解分光の装置開発
- ・P450BM3 反応中間体の時間分解分光解析

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

計算化学: 分子動力学計算を中心に CREST の吉澤チームとの共同研究を行っている。主に、計算プログラムの初期設定やデータ解析について指導を受け、メタンの結合部位最適化の計算化学による理解に取り組んだ。

P450BM3 変異体の検討: オーストラリアの Stephen G. Bell 准教授 (University of Adelaide) とデコイ分子の変異体への効果を検証する共同研究を行い、論文としてまとめた。

菌体利用: 東京大学の葛山先生と菌体破碎液中のデコイ分子用物質探索に関する共同研究を行った。

高圧反応装置開発: HPLC のポンプを利用する高圧反応装置開発をジーエルサイエンス(株)と共同開発しているが、特許申請は名古屋大学が行った。

高圧反応装置の共同利用: 新規開発した高圧反応装置は、CREST の伊東チーム、阪井チーム、さきがけの邨次チーム、藤枝チーム、山田チーム、韓国 DGIST の Cho 教授との共同利用を展開した。また、CREST の山下チームとは装置開発についての意見交換を継続的に行っており、山下チームの高圧反応装置と HPLC による加圧装置の融合を検討した。

菌体内反応系利用: 企業との共同研究により、菌体内反応系を他の芳香族化合物やプロピレンなどのガス状アルカンにも適用するとともに、新規ターゲット化合物を検討した。デコイ分子を利用する反応の特許は、企業とライセンス契約を結んでいる。

合成金属錯体と蛋白質の複合化: North Carolina State University の Reza A. Ghiladi 准教授とマンガンを活性中心とする P450BM3 の酸化活性種観測に関する共同研究を進めた。名古屋大学の忍久保洋先生と九州大学の久枝良雄先生と合成金属錯体とタンパク質の複合化に関する共同研究を進め、論文としてまとめた。

デコイ分子の開発: 新規骨格のデコイ分子開発に関して、群馬大学の網井秀樹先生、大阪市立大

学の森内敏之先生、名古屋大学の大松亨介先生、千葉大学の橋本卓也先生との共同研究を行い、いくつかの化合物がデコイ分子として機能することを確認している。特に網井先生とフッ素原子を持つ化合物のデコイ分子としての利用を進め、プロパンの水酸化に利用可能であることなどを明らかにしており、論文としてまとめる予定である。