

荘司 長三

名古屋大学大学院理学研究科
准教授

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

§ 1. 研究実施体制

(1)「荘司」グループ

- ① 研究代表者: 荘司 長三 (名古屋大学大学院理学研究科 准教授)
- ② 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
 - ・シトクロム P450BM3 を利用する菌体内での酸化反応系の開発

(2)「杉本」グループ

- ① 主たる共同研究者: 杉本 宏 (理化学研究所放射光科学総合研究センター 専任研究員)
- ② 研究項目
 - ・X線構造解析による基質およびデオイとタンパク質の相互作用解析
 - ・シトクロム P450BM3 の動的構造解析の基盤技術開発

§ 2. 研究実施の概要

ヘム鉄を活性中心に有する P450BM3 は、長鎖脂肪酸のアルキル鎖末端部分を水酸化する P450 で、酸素分子を還元的に活性化することによって酸化活性種であるオキシフェリルポルフィリン π -カチオンラジカル(Compound I)を生成する。P450BM3 は、ヘムを有するヘムドメインと還元蛋白質が連結された融合蛋白質であるために酸化活性種が最大で毎分 1 万 5 千回転で生成される。P450BM3 では、長鎖脂肪酸の取り込みが反応を開始する「トリガー」になっていて、長鎖脂肪酸が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ために、長鎖脂肪酸以外の基質、たとえば、ガス状アルカンやベンゼンなどを酸化しようとしても、酸化活性種が生成されないために反応は全く進行しない。本研究では、メタンやエタン、ベンゼンなどの小分子アルカン類の水酸化反応を温和な条件下で触媒作用する強力な人工金属酵素を開発することを研究目的として、P450BM3 の基質特異性の変換と反応活性向上のための活性中心の合成金属錯体による置換手法の開発に取り組んだ。また、メタン水酸化に向けて、ヘム獲得蛋白質のヘム鉄を合成金属錯体に置き換え、P450 以外の蛋白質を用いる人工酸化酵素の開発にも取り組んだ。

(1) シクロム P450BM3 によるガス状アルカンおよびベンゼン水酸化: 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した第二世代のデコイ分子をさらに発展させたフッ素原子を有さない第三世代のデコイ分子を開発した。アルキルカルボン酸とは大きく構造が異なるカルボン酸であっても、カルボキシル基をアミノ酸で修飾することで、高効率な反応を行うことができるデコイ分子となることを明らかにした。

(2) シクロム P450BM3 のヘム置換法の開発: 中心にマンガン原子を有する Mn-プロトポルフィリンで置換した P450BM3 のヘムドメインに、蛋白質連結酵素を使って還元ドメインを連結することで、Mn を活性中心とする全長の P450BM3 の作製に成功した。Mn-P450BM3 は、反応速度は低下するが、通常のヘムをもつ P450BM3 と同様に C-H 結合の水酸化反応を触媒することを実証した。さらに Mn-P450BM3 によるプロパンの水酸化反応では、位置選択性が変化することを明らかにした。

(3) 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: デコイ分子を結合させた P450BM3 変異体試料の結晶構造と、キセノンガスを結晶内に導入してタンパク質構造中の疎水キャビティーの探索をおこなった結果より、基質が P450BM3 分子内の活性部位へ到達する際の経路や基質結合位置におけるタンパク質残基との立体的な相互作用の特徴を予測できた。それらの情報から、触媒機能の効率化のためのタンパク質の部位特異的変異のデザインを行った。

(4) 動的構造解析の基盤技術開発: P450BM3 の動的構造解析にむけて、溶液試料および結晶試料に対応した分光計測装置の開発を行った。動的構造解析の実現のためには、タンパク質の微小結晶(20-100 ミクロン)内の酵素反応のトリガーとしてレーザー照射によるケージド化合物の励起を行う必要があるため、励起用レーザーを用いた光学システムも微小結晶に対応させた。実験条件の最適化や酵素反応中間体の観測手法の開発のためのモデル系としてケージド NO 化合物を用いることで、気体分子がヘム酵素に結合して反応が進行することを分光法および X 線結晶構造解析で追跡できることを実証した。