

三長司 荘

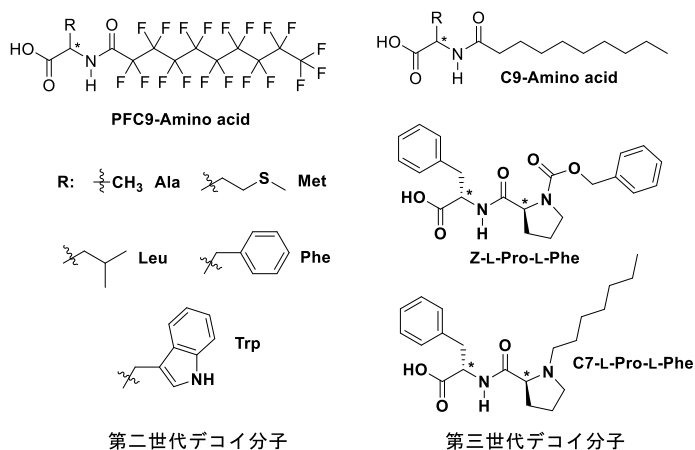
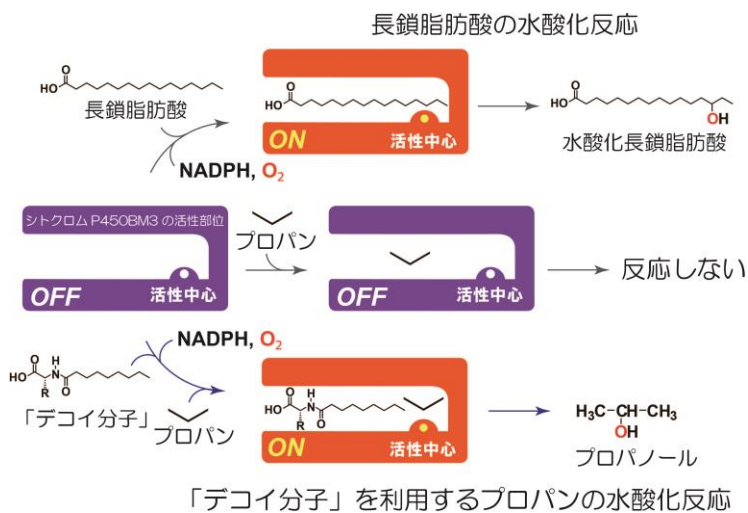
名古屋大学大学院理学研究科
准教授

「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. 研究成果の概要

シトクロム P450 (P450) はヘム (鉄ポルフィリン錯体) を活性中心に持ち、薬物代謝やホルモンの生合成に関連する酸化反応を担う重要な金属酵素群です。巨大菌から単離されたシトクロム P450BM3 (P450BM3) は、長鎖脂肪酸の末端部分を選択的に水酸化する酵素で、極めて高い水酸化活性を示すことから合成反応での利用が期待されてきた。しかしなが

ら、P450BM3 は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 の反応空間は長鎖脂肪酸の水酸化に最適化されており、脂肪酸が酵素内部の基質認識部位に固定化されると酵素のスイッチが「ON」となるように設計されている。したがって、長鎖脂肪酸以外の基質の場合に



は、酵素のスイッチは「OFF」のままであるため、酵素として機能しない。我々は、長鎖脂肪酸に形を似せた偽の基質(デコイ分子)を P450BM3 に取り込ませると、長鎖脂肪酸が取り込まれたと勘違いして誤作動し、酵素のスイッチが「ON」の状態になることを見出した。さらに、この誤作動状態ではプロパンなどの有機小分子が水酸化されることを明らかにしている(上図)。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、新規デコイ分子の開発と変異導入による P450BM3 の改変を組み合わせることで P450BM3 の基質選択性の変換と反応活性の向上に取り組んだ。デコイ分子としての機能が最初に明らかとなったのは、単純なパーフルオロアルキルカルボン酸であったが、近年、フッ素原子を含まない次世代のデコイ分子(右図)を開発し、小分子アルカン類の高効率な水酸化に成功している。また、X 線構造解析によって、デコイ分子結合型 P450BM3 および金属置換型 P450BM3 の構造を明らかにしてきた。基質の活性部位への到達経路の情報と合わせて、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も明らかにした。さらに、動的結晶構造解析に取り組み、動的結晶構造解析に必要な結晶試料の調製や微小結晶内の反応を時間分解分光法によって追跡するための計測装置の整備を進めた。凍結トラップ法によっても反応中間体構造を捕捉して結晶構造解析に用いることができるように、結晶マウントや反応励起および瞬間凍結のための装置開発を行い、従来の方法では取得できなかった遅い時間帯で生成する反応中間体の構造決定のための技術基盤を構築した。

【代表的な原著論文】

1. 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, pp.12264-12269, **2018**
2. 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, pp.7892-7895, **2018**

§ 2. 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
 - ・ 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

- 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