

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
2015年度採択研究代表者

2019年度 実績報告書

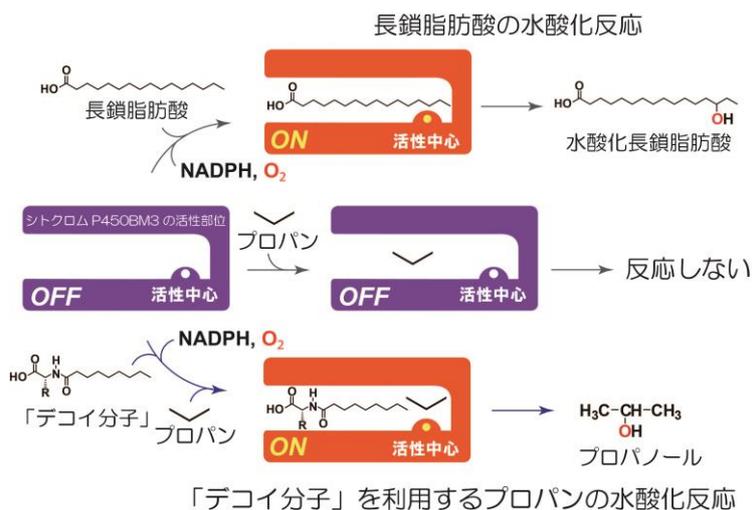
莊司長三

名古屋大学大学院理学研究科
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

巨大菌由来のシトクロム 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 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。デコイ分子存在下ではプロパンやエタンなどのガス状アルカンが水酸化されることを明らかにしているが、水酸化活性は長鎖脂肪酸の水酸化活性と比べると低く、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手法による活性の改善に取り組んできた。これらの取り組みと並行して、反応水溶液中のガス状アルカン濃度を高めるために、新規高压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 を高压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压反応装置を開発し、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。プロパン (50 気圧) 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。エタンの水酸化活性は 50 気圧の反応条件で、毎分 28 回転、総触媒回転数は 280 回に達した。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、微小高压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。

これまで、X 線構造解析によって、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スクリーニングを続ける過程で、反応活性は低い、結晶化が異常に早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。アビ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結晶化促進デコイ分子として機能し、分解能 1.6 Å で構造解析が可能な良質の結晶が再現性良く得ら

れた。得られた結晶を細かく砕いて結晶化の種結晶とすることで、これまでに結晶化ができなかった P450BM3 の結晶化に成功した。最も高い活性を示すデコイ分子は、これまで全く結晶が得られなかったが、種結晶を用いる

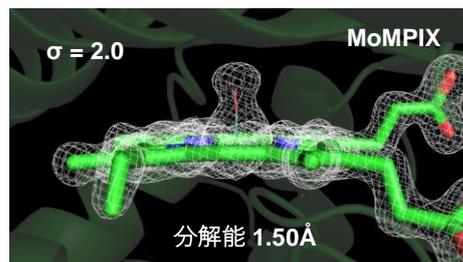
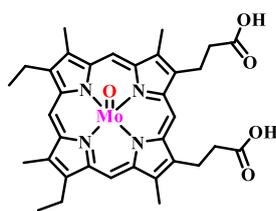


図 オキシモリブデン錯体に置換した P450BM3 の結晶構造。錯体の構造（左）と活性部位の構造（右）

る手法により結晶が短時間で得られ、結晶構造解析の結果、基質結合部位にデコイ分子が取り込まれていることが確認できた。また、活性中心のヘムを合成金属錯体に置換した P450BM3 を作成することに成功していたが、結晶化は非常に難易度が高く、高分解能の結晶構造解析は難しかった。種結晶を用いる手法により、ほとんどのヘム置換 P450BM3 の結晶構造解析に成功した。酸化活性種アナログとしてオキシモリブデン (Mo=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。種結晶を用いる手法は、変異体も含めてほとんどの P450BM3 の結晶化に有効であると考えられ、汎用性の高い新規結晶化手法を開発したと言える。

【代表的な原著論文】

1. Joshua Kyle Stanfield, Keita Omura, Ayaka Matsumoto, Chie Kasai, Hiroshi Sugimoto, Yoshitsugu Shiro, Yoshihito Watanabe, Osami Shoji, "Crystals in Minutes: Instant On-Site Microcrystallisation of Various Flavours of the CYP102A1 (P450BM3) Haem Domain" *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 59, No. 19, 7611-7618, **2020**.
2. Shinya Ariyasu, Yusaku Kodama, Chie Kasai, Zhiqi Cong, Joshua Kyle Stanfield, Yuichiro Aiba, Yoshihito Watanabe, Osami Shoji, "Development of a High-Pressure Reactor Based on Liquid-Flow Pressurisation to Facilitate Enzymatic Hydroxylation of Gaseous Alkanes" *ChemCatChem*, vol. 11, No. 19, 4709-4714, **2019**.

§ 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、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
- ・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

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

(3)「久保」グループ

① 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)

② 研究項目

- ・メタン水酸化反応中間体の時間分解分光解析