



Functionalization of the Cytochrome P450cam Monooxygenase System in the Cell-like Aqueous Compartments of Water-in-Oil Emulsions

W/O型エマルジョンを利用したシトクロム P450cam モノオキシゲナーゼ系の機能構築

(J. Biosci. Bioeng., Vol.99, No.1, 12-17, 2005)

道添 純二・一瀬 博文・丸山 達生・神谷 典穂・後藤 雅宏*

著者らは、従来から非水系における酵素反応に関する研究を展開し、最近では、複合酵素系 (P450cam系) においても有機溶媒中で電荷リレー反応が起こることを報告した¹⁾。しかしながらその効率は低く、補酵素である NADH が消費されると反応はすぐに停止してしまっただ。そこで著者らは、非水系の複合酵素反応になんとか NADH の補酵素再生系を組み込むことができないだろうか? という命題のもと、本研究をスタートさせた。

Cytochrome P450 (P450) は、微生物から植物、動物まで生物界に広く分布する一群のヘムタンパク質であり²⁾、NAD(P)H と分子状酸素を用いて多種多様な化合物への酸素添加反応を触媒する。なかでも P450cam モノオキシゲナーゼシステムは、NADH、putidaredoxin reductase (PdR)、putidaredoxin (Pdx) そして P450cam へとタンパク質間で電子伝達が行われることで、初めて触媒機能を発現する複合酵素系である²⁻⁴⁾。水難溶性の環境汚染物質の分解において、水酸化反応は重要な初発反応であることから、最近、非水系における P450 モノオキシゲナーゼシステムの利用が注目されている。

これまで逆ミセル法により、有機溶媒中で初めて複合酵素系を再構築することに成功したが¹⁾、camphor の水

酸化効率は十分ではなかった。これはおそらく逆ミセルの衝突・融合によって酵素成分の失活を招いたためと推察される。そこで本研究では、このタンパク質間電子伝達系を非水系において再構築するために、water-in-oil (W/O) エマルジョンの内水相を反応場として利用することにした。W/O エマルジョンの内水相はマイクロスケールの水的環境を提供するため、ナノオーダーの内水相を提供する逆ミセルよりも多くのタンパク質成分を同時に封入することが可能である。また、P450cam モノオキシゲナーゼシステムでは、補酵素である NADH が完全に消費されると反応が停止してしまうため、反応の効率を高めるためには NADH の再生が鍵となると考えた。そこで、アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) あるいはグリセロールデヒドロゲナーゼ (GLD) を P450cam 系と共役させ、P450cam 系において消費された NADH から生じる NAD⁺ を酵素的に再生することで基質変換効率 (水酸化効率) の向上を目指した。

本研究では、W/O エマルジョンのマイクロ空間を利用することにより P450cam モノオキシゲナーゼシステムを非水媒体中で再構築することを目的とし、酵素活性に影響を与える種々の因子について詳細な検討を行った。

その結果、W/O エマルジョン中において GLD による NADH 再生系を P450cam モノオキシゲナーゼシステムと連動させることにより、camphor の水酸化率の大幅な向上が確認された。また、NADH の代わりに安価な NAD⁺ を用いても同程度の基質の変換効率が得られたことから、NAD⁺ は GLD により NADH へと再生され P450cam により camphor の水酸化のサイクルへ再利用されていることが明らかとなった。今後は、さらに実用的な酵素複合系の構築のために、whole cell 系への展開を予定している。

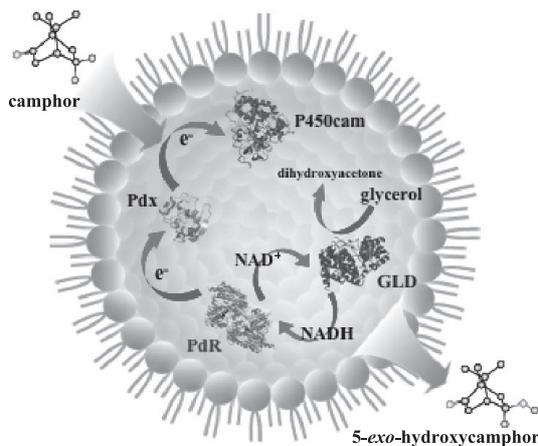


図1. エマルジョン中での P450cam 発現系の模式図

- 1) Ichinose, H. *et al.*: *Langmuir*, **20**, 5564 (2004).
- 2) Nelson, D. *et al.*: *DNA Cell Biol.*, **12**, 1 (1993).
- 3) Gunsalus, I. *et al.*: *Methods Enzymol.*, **52**, 166 (1978).
- 4) Poulos, T. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **195**, 687 (1987).

* 著者紹介 九州大学大学院工学研究院応用化学部門 (教授) E-mail: mgototcm@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp