

## 「頑固な酵素」を巧みに騙す

莊司 長三<sup>1\*</sup>・渡辺 芳人<sup>2</sup>

酵素反応は、鍵と鍵穴の関係で説明されるように、酵素の鍵穴に合致する化学物質のみを対象とした物質変換を行うのが通常である。しかし、酵素は常に正常に働いているわけではなく、時として誤作動することがあり、誤作動状態では、本来の対象基質ではない基質が反応する。酵素をうまく騙して意図的に誤作動状態を作り出し、野生型の酵素をそのまま使ってさまざまな酸化反応をさせてしまう、そんな一風変わった酵素利用法を紹介したい。

## シトクロムP450 (P450)

**シトクロムP450の構造と機能** 生体内では、常温・常圧の温和な反応条件下で不活性な有機基質を酸化することが可能な多種多様な酵素が機能している。中でもシトクロムP450 (P450) は、動物、昆虫、植物、微生物など生物界に広範に存在する金属酵素で、ホルモンや色素の生合成、異物の解毒、薬剤の代謝など多岐にわたる機能を有する酵素群であり、医薬のみならず触媒化学や錯体化学など広範な分野で研究対象とされてきた<sup>1,2)</sup>。

P450は、三角形プリズム型の構造をしており、その中心にヘム（鉄ポルフィリン錯体）を補欠分子族として有するヘム酵素である（図1上）。ヘムを活性中心として強力な酸化活性種を生成し、不活性なC-H結合を水酸化することができる。P450の中でも細菌由来のP450は、触媒活性が非常に高く、バイオ触媒としての利用が期待されてきた。しかしながら、細菌由来のP450は、基質に対する選択性が高く、本来の標的基質以外の有機基質に対する酸化活性が極端に低くなるため、合成反応に利用するためには、基質特異性を変換する必要がある。

**シトクロムP450BM3** P450BM3は、巨大菌(*Bacillus megaterium*)由来の長鎖脂肪酸水酸化酵素で、炭素数が16前後の長鎖脂肪酸のアルキル鎖末端部分の水酸化する（図2）<sup>3,4)</sup>。P450BM3の触媒活性は非常に高く、毎分3000回転を超える酸化活性も報告されており、バイオ触媒としての利用が早くから期待されてきた。しかし、P450BM3の基質特異性は高く、通常、長鎖脂肪酸以外とは反応しない。長鎖脂肪酸は、そのカルボキシル基がP450BM3の外側にある47番目のアルギニン（Arg-42）および51番目のチロシン（Tyr-51）と相互作用して固定化されることが結晶構造解析から明らかになっている（図1下）。P450BM3は、還元系から供給される電子と

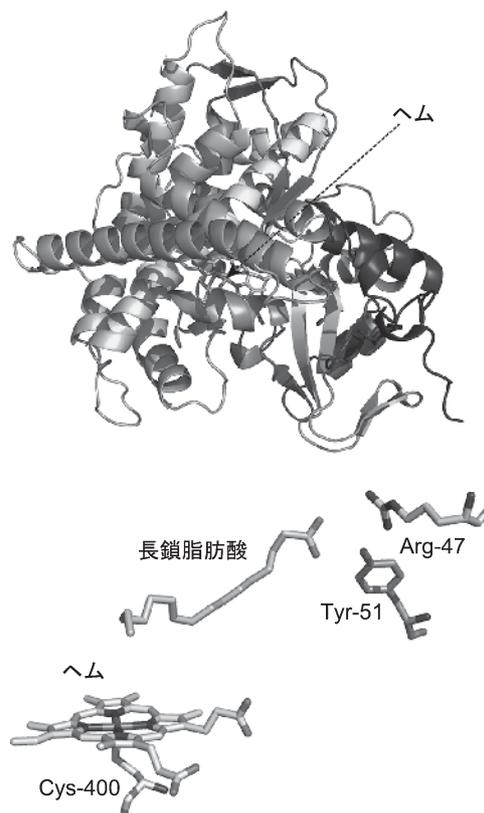


図1. 長鎖脂肪酸結合型シトクロムP450BM3の結晶構造(PDB ID: 1FAG). 全体構造(上)と活性部位の拡大図(下).

プロトンを使って酸素分子を還元的に活性化し、酸化活性種であるオキソフェリル ( $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ ) ポルフィリン $\pi$ -カチオンラジカル (Compound I) を生成することによって、長鎖脂肪酸を水酸化する（図2）。P450BM3の酸化活性種生成反応では、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おり、長鎖脂肪酸が適切な位置に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。もう少し詳しく述べると、長鎖脂肪酸が取り込まれることにより、ヘムに配位している水分子が取り除かれて、ヘムの酸化還元電位が正側にシフトし、還元系からの電子供給によりヘムが還元されることで反応が始まる仕掛けになっている。このスイッチング機構は、高酸化活性種を不用意に生成しないためと、酸化活性種の生成に必要な還元剤のNADPHを無駄に消費しないようにするための工夫であると考えられる。このような巧妙な仕掛けで反応が制御されているため、長鎖脂肪

\* 著者紹介 <sup>1</sup>名古屋大学大学院理学研究科物質理学専攻(准教授) E-mail: shoji.osami@a.mbox.nagoya-u.ac.jp  
<sup>2</sup>名古屋大学物質科学国際研究センター(教授)

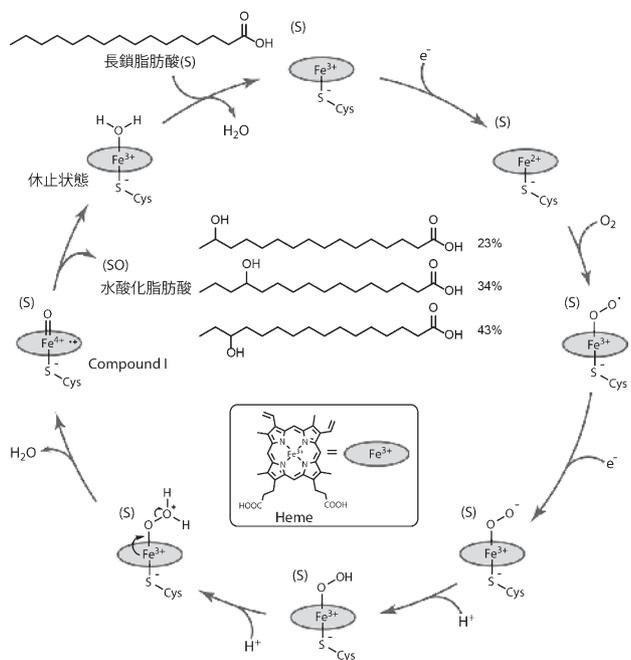


図2. シトクロム P450BM3 の酸化活性種生成と長鎖脂肪酸の水酸化反応。

酸と構造が大きく異なる有機分子では、P450BM3のスイッチは「ON」の状態とはならず反応は進行しない。P450BM3に長鎖脂肪酸以外の基質を水酸化させるためには、長鎖脂肪酸が取り込まれる結合部位をアミノ酸置換によって改変して、長鎖脂肪酸以外の基質が取り込まれた場合にもスイッチが「ON」の状態になるようにしなければならない。部位特異的の変異導入や進化分子工学的手法(ランダム変異導入)によって、基質結合部位を構成するアミノ酸を変更し、基質特異性を変換することは可能であり、実際、変異導入が、酵素機能改変法のもっとも効果的な手法として広く受け入れられている。P450BM3では、基質特異性の変換、酸化活性の向上、反応機構の検証などを目的として、これまでに161か所(ヘムドメイン)に対してアミノ酸置換を施した319種類もの変異体が作成されている<sup>5)</sup>。変異導入法が効果的であることは疑う余地はないが、必ずしも目的の機能を持った変異体が得られるわけではなく、変異導入に頼らない手法も開発する必要があると考えた。そして、野生型P450BM3をそのまま用いて長鎖脂肪酸以外の基質を水酸化することができないかと考え続けて、「偽の基質」を使う新しい概念の反応系を考案するに至った。

### 「偽の基質」でP450BM3を騙す

**疑似基質(デコイ分子)** P450BM3に対して、それ自体は水酸化されないけれども、長鎖脂肪酸と構造が非常によく似ているためにP450BM3が基質であると勘

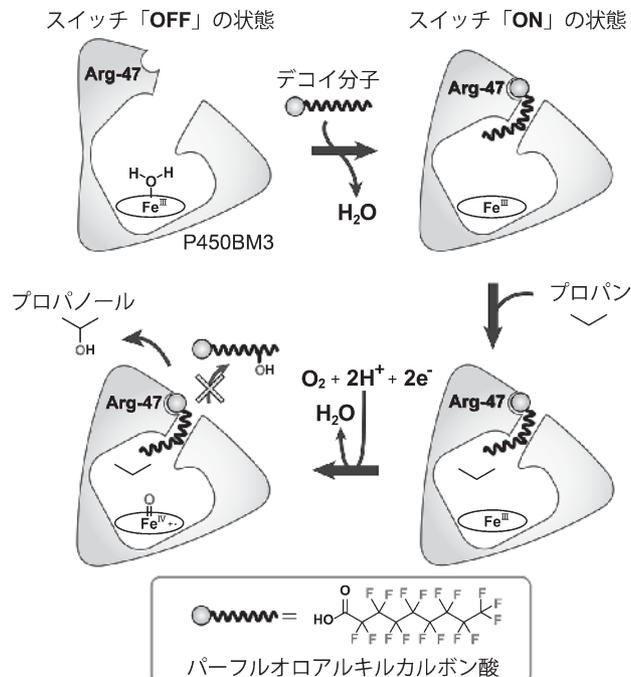


図3. パーフルオロアルキルカルボン酸(デコイ分子)存在下での酸化活性種生成とプロパンの水酸化反応の模式図。

違いを取り込んでしまう疑似基質(デコイ分子と名づけた)を利用する反応系を思い立った。デコイ分子として選んだ化合物は非常に単純で、長鎖脂肪酸のすべての水素原子をフッ素原子に置き換えたパーフルオロアルキルカルボン酸である(図3)。フッ素原子の共有結合半径は64 pmで、水素原子の共有結合半径32 pmに近く<sup>6)</sup>、パーフルオロアルキルカルボン酸の構造は、長鎖脂肪酸に非常によく似たものになる。一方で、C-F結合は、C-H結合よりも安定であるために、P450BM3はパーフルオロアルキルカルボン酸を水酸化することができない。P450BM3は、長鎖脂肪酸とパーフルオロアルキルカルボン酸を区別することができずにパーフルオロアルキルカルボン酸を誤って取り込むと予想した。パーフルオロアルキルカルボン酸を長鎖脂肪酸と勘違いしたP450BM3のスイッチは「ON」の状態になり、酸化活性種が生成されてしまう。パーフルオロアルキルカルボン酸は水酸化されないため、生成された酸化活性種は未反応のまま残されることになる。ここに、ガス状飽和炭化水素などを添加すると、それらが水酸化されると考えたのがP450BM3の誤作動状態を利用する非天然基質の水酸化反応系である(図3)。

**P450BM3の誤作動とガス状アルカンの水酸化** デコイ分子のデザインにはもう少し工夫が必要であった。P450BM3は炭素数16のパルミチン酸を効率よく水酸化するように設計された酵素であるために、基質結合部位

には、炭素数16の長鎖脂肪酸を取り込むのに適したスペースがある(図4)。パルミチン酸のすべての水素原子をフッ素に置換したパーフルオロパルミチン酸をデコイ分子としてP450BM3に取り込ませた場合には、活性部位(ヘム上方)の空間すべてがパーフルオロパルミチン酸によって占有されてしまうために、プロパンなどの基質が取り込まれるスペースがまったくない(図4)。

そこで、アルキル鎖長を少し短くしたパーフルオロアルキルカルボン酸を取り込ませて、ヘム上方の反応空間を確保するとともに、反応空間のサイズをアルキル鎖長の違いによって変えることを考えた。鎖長の異なる一連のパーフルオロアルキルカルボン酸をP450BM3に取り込ませて、プロパンの水酸化反応を行うと、炭素数が13~9のパーフルオロアルキルカルボン酸の存在下でプロパンが水酸化され、2-プロパノールが得られる。炭素数10のパーフルオロデカン酸(PFC10)の場合に最大活性、毎分67回転を示した(表1)<sup>7)</sup>。もちろん、デコイ分子を添加しない場合にはまったく反応は進行しない。プロパン単体では、P450BM3のスイッチを「ON」にできないためである。ブタンとシクロヘキサンの水酸化反応も進行して2-ブタノールとシクロヘキサノールが得られた。ブタンとシクロヘキサンの場合には、炭素数9のパーフルオロノナン酸(PFC9)が最大の活性を示すと同時に、シクロヘキサンの水酸化では、炭素数8のパーフルオロオクタン酸(PFC8)の場合でも反応が進行し

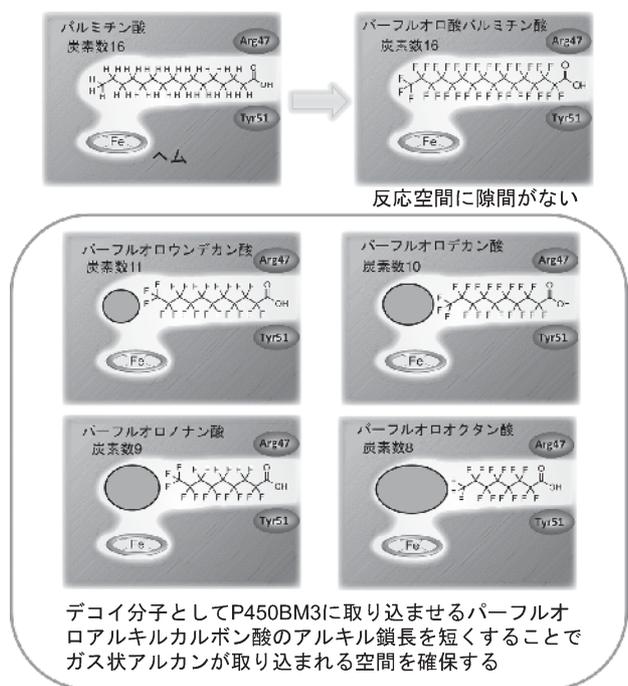


図4. パルミチン酸(左上), パーフルオロパルミチン酸(右上), アルキル鎖長の異なるパーフルオロアルキルカルボン酸(下段)を取り込ませたP450BM3の反応空間の模式図。

た。これらの結果は、水酸化する基質のサイズと有効なデコイ分子のアルキル鎖長に相関があることを示している。デコイ分子の鎖長によって基質結合部位の空間サイズをある程度制御できることを示している。最近、エタングスの供給圧を上げて反応を行うことで(5気圧)、反応活性は低いものの(0.67/min/P450), エタンを直接にエタノールに変換することにも成功している<sup>8)</sup>。

**ベンゼンのフェノールへの直接変換** フェノールは、ベンゼンを250°C, 30気圧でプロピレンと反応させてクメンに変換し、クメンを酸化する「クメン法」で工業的に製造されている。クメン法では、高温高压で反応を行う必要があるだけでなく、副生成物として多量のアセトンが生成してしまうため、ベンゼンの直接酸化によるフェノールの合成法の開発が進められている。しかしながら、フェノールは、ベンゼンよりも酸化されやすく、ベンゼンを水酸化できるような高酸化活性種は、フェノールと容易に反応してしまい過剰酸化物を形成することが多い。したがって、ベンゼンの直接酸化によるフェノール合成では、フェノールの過剰酸化反応を如何にして抑制するかが重要である。P450BM3の誤作動を利用するプロパンやブタンの水酸化反応では、生成するアルコールがさらに酸化される過剰酸化反応はまったく観測されなかった。この特性をうまく利用できれば、ベンゼンをフェノールに選択的に変換できるのではないかと考えた。炭素数12~8のパーフルオロアルキルカルボン酸をデコイ分子として添加して反応を行うと、ベンゼンが水酸化されてフェノールが得られ、炭素数9のパーフルオロノナン酸(PFC9)を用いた場合、1分間あたり

表1. アルキル鎖長の異なる一連のパーフルオロアルキルカルボン酸(PFC)存在下でのP450BM3による炭化水素の水酸化活性(回転数/分)<sup>a)</sup>。

PFC	RH $\xrightarrow[\text{NADPH, O}_2]{\text{P450BM3, PFC}}$ ROH			
	プロパン	ブタン	シクロヘキサン	ベンゼン
なし	n.d. <sup>b)</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
PFC8	n.d.	2 ± 3	63 ± 4	38 ± 6
PFC9	24 ± 8	110 ± 30	110 ± 10	120 ± 9
PFC10	67 ± 2	100 ± 30	72 ± 13	120 ± 5
PFC11	40 ± 4	69 ± 20	54 ± 10	83 ± 6
PFC12	25 ± 6	69 ± 15	44 ± 8	71 ± 5
PFC13	11 ± 3	35 ± 10	26 ± 1	-
PFC14	n.d.	13 ± 3	16 ± 2	-

a) 主生成物は、それぞれ、2-プロパノール、2-ブタノール、シクロヘキサノール、フェノール。 b) not detected (検出されず)。

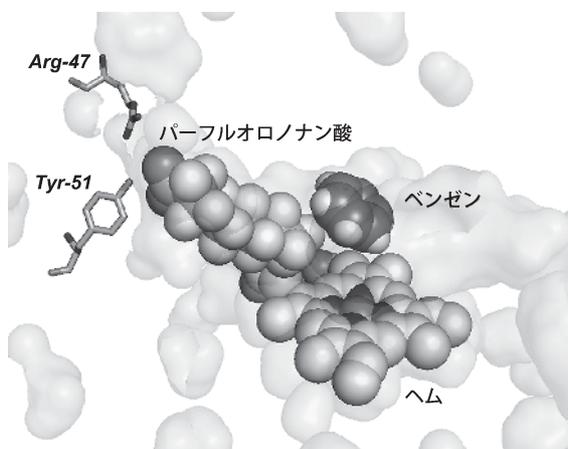


図5. パーフルオロノナン酸 (PFC9) とベンゼンを同時に取り込んだシトクロム P450BM3 の活性部位の推定構造.

表2. パーフルオロノナン酸 (PFC9) 存在下での P450BM3 による一置換ベンゼンの水酸化反応活性 (回転数/分)

置換基 R=	オルト位	メタ位	パラ位
-CH <sub>3</sub>	220 ± 7	n.d. <sup>a)</sup>	5.3 ± 0.2
-OCH <sub>3</sub>	260 ± 4	n.d.	38 ± 0.3
-Cl	120 ± 4	n.d.	14 ± 0.6
-NO <sub>2</sub>	0.9 ± 0.05	n.d.	n.d.
-COCH	2.9 ± 0.1	n.d.	n.d.

a) not detected (検出されず)

の触媒回転数は120回転に達した(表1)<sup>9)</sup>。一方、フェノールがさらに酸化された物はほとんど検出されなかった。フェノールが過剰に酸化されることがなかったのは、疎水性のアミノ酸から構成される P450BM3 の活性部位とパーフルオロアルキルカルボン酸の疎水的な性質のため、親水的なフェノールは直ちに活性部位から放出され、再び活性部位に近寄ることができないために、過剰に酸化されなかったと考えている(図5)。トルエンなどの一置換ベンゼンも水酸化することができ、トルエンの場合には反応性の高いベンジル位ではなく芳香環のオルト位が選択的に水酸化された(表2)<sup>9)</sup>。クロロベンゼンとアニソールも同様にオルト位が選択的に水酸化され、さらに、メタ配向性のニトロベンゼンやアセトフェノンでさえオルト位が選択的に水酸化された。

### まとめ

酸化活性の高い細菌由来 P450 は、バイオ触媒として

の利用が期待されてきたが、もう一つの特徴である高い基質特異性のために適用できる基質に制限があった。これまでに、細菌由来 P450 の基質特異性の変換を目的とする数多くの変異体を作成され、変異体によるさまざまな基質の反応が報告されてきた。我々は、P450BM3 にデコイ分子としてパーフルオロアルキルカルボン酸を添加して意図的に誤作動を引き起こすと、ガス状アルカンやベンゼンなど本来の対象基質とは構造が大きく異なる化合物の水酸化反応が進行することを明らかにした。デコイ分子を用いる手法は、天然に存在する野生型の酵素をそのまま利用可能で、酵素自体を改変する必要がない。デコイ分子を用いるシステムを酵素の機能改変法の一つの軸として確立することを目指して、新たなデコイ分子の開発と P450BM3 以外の酵素への適用可能性などを模索している。最近、P450BM3 によるガス状アルカンの水酸化活性を大幅に向上させることができる第二世代のデコイ分子の開発に成功した。未発表データのため、残念ながら本稿で詳細を紹介させていただくことができないが、単純なパーフルオロアルキルカルボン酸とは異なる次世代デコイ分子がさらに効果的に機能する事実は、デコイ分子を利用する酵素化学がますます面白く、奥の深いものになっていくことを予感させ、デコイ分子を利用する手法が、酵素機能改変法としてある程度の市民権を得る日も、さして遠い日のことではないのかもしれないと期待している。

### 謝 辞

本稿で紹介した研究成果は、文部科学省科学研究費補助金基盤研究S、若手研究A、新学術領域研究「直截的物質変換をめざした分子活性化法の開発」の研究助成により行われました。この場を借りて感謝申し上げます。

### 文 献

- 1) 大村恒彦ら編：P450の分子生物学 第2版，講談社(2009)。
- 2) Ortiz de Montellano, P. R., 3rd ed., *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, Plenum Press, New York, (2005)。
- 3) Boddupalli, S. S. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **292**, 20 (1992)。
- 4) Narhi, L. O. and Fulco, A. J.: *J. Biol. Chem.*, **261**, 7160 (1986)。
- 5) Whitehouse, C. J. C. et al.: *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 1218 (2012)。
- 6) Pyykko, P. and Atsumi, M.: *Chem. Asian J.*, **15**, 186 (2009)。
- 7) Kawakami, N. et al.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 5315 (2011)。
- 8) Kawakami, N. et al.: *Chem. Sci.*, **4**, 2344 (2013)。
- 9) Shoji, O. et al.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 6606 (2013)。