



Alteration of the substrate specificity of cytochrome P450 CYP199A2 by site-directed mutagenesis

部位特異的変異導入によるシトクロム P450 CYP199A2 の基質特異性改変

(JBB, Vol. 119, No. 1, 47–51, 2015)

古屋 俊樹¹・下島 洋²・木野 邦器^{3*}

酸化反応は全化学プロセスの3割を占めるといわれているが、膨大な消費エネルギーに加えて使用する酸化剤（重金属など）の毒性や選択性の低さが課題としてあげられるプロセスである。酸化酵素（一酸素添加酵素）は、これらの課題を克服しうる生体触媒として工業化学品や医薬品の製造プロセスへの応用に期待が寄せられている。ヘムタンパク質のシトクロム P450 は代表的な酸化酵素であり、いくつかの酵素がすでに実用化されていることから、新規酵素の探索をはじめ機能解析や改変など、世界中で精力的に研究が行われている。

筆者らは、ゲノム情報を利用した酵素探索により、芳香族カルボン酸に対して特異的に活性を示すシトクロム P450 酸化酵素 CYP199A2 を見いだしている¹⁾。本酵素は、*p*-クマル酸などの多様な芳香族カルボン酸を位置選択的に酸化できるが、カルボキシ基を持たない化合物に対しては活性を示さない²⁾。ユニークな基質特異性を示し、産業上も注目されている酸化酵素であることから、本酵素の結晶構造はオックスフォード大の Bell らのグループにより決定されている³⁾ (図 1A)。その構造から、97 番目のセリン残基 (S97) と 247 番目のセリン残基 (S247)

が基質のカルボキシ基と相互作用して基質をアンカリングし、活性中心に存在するヘム近傍に芳香環が配向されて酸化されることが推測されている。

本研究では、CYP199A2 の基質特異性制御因子の解明および有用化合物生産の拡張を目的として、変異導入実験を実施した。具体的には、基質-酵素間の静電的相互作用（水素結合）を保持したまま基質認識特性のみ改変することを目論み、当該セリン残基（側鎖：ヒドロキシ基）を酸性アミノ酸のアスパラギン酸およびグルタミン酸（側鎖：カルボキシ基）に置換した。これにより、ヒドロキシ芳香族化合物に対する活性が付与されると予想した。そこでまず、野生型酵素の基質特異性を詳細に検討し、*p*-クマル酸などの芳香族カルボン酸に対して活性を示すが、*p*-クレゾールなどのヒドロキシ芳香族化合物には活性を示さないことを確認した (図 1B)。さらに、改変型酵素の基質特異性を評価したところ、*p*-クマル酸に対する活性が消失する一方で、野生型酵素が認識しない *p*-クレゾールなどのヒドロキシ芳香族化合物に対する活性が狙い通り付与されていた (図 1B)。とくに、S247 をアスパラギン酸に置換した酵素は高い活性を示し、当該酵素を発現させた大腸菌は 1 mM の *p*-クレゾールを 30 min で *p*-ヒドロキシベンジルアルコールに完全変換した。

以上のように本研究では、部位特異的変異の導入実験により S97 および S247 が CYP199A2 の基質特異性制御に重要な役割を担っていることを検証し、さらに野生型酵素では合成困難な *p*-クレゾール水酸化体などのジヒドロキシ芳香族化合物の合成を可能とする酵素の創製に成功した。基質-酵素間の静電的相互作用に着目した本研究は、他の酵素への応用の観点からも意義深いと考えている。

- 1) Furuya, T. and Kino, K.: *ChemSusChem*, **2**, 645 (2009).
- 2) Furuya, T. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 6087 (2012).
- 3) Bell, S. G. et al.: *Dalton Trans.*, **41**, 8703 (2012).

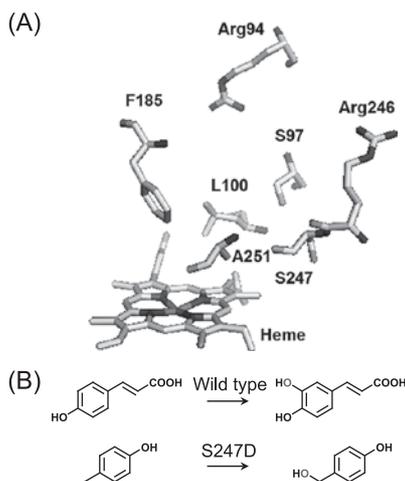


図 1. CYP199A2 の結晶構造 (A) と触媒する反応 (B)

著者紹介 ¹早稲田大学先進理工学部応用化学科 (助教), 現・東京理科大学理工学部応用生物科学科 (講師)
²早稲田大学先進理工学部応用化学科, 現・早稲田大学先進理工学研究科先進理工学専攻 (博士課程学生)
^{3*}早稲田大学先進理工学部応用化学科 (教授) E-mail: kkino@waseda.jp