

別紙 4

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 External Additives-Controlled Stereoselective Chemical Transformations Catalyzed By Cytochrome P450
(シトクロム P450 が触媒する立体選択的化学変換の外部添加物による制御)

氏 名 鈴木 和人

論 文 内 容 の 要 旨

シトクロム P450 は、生体内における代謝やホルモン合成において、基質の酸素化反応を触媒する酵素である。その高い反応性と、酵素に特有な立体構造に由来する反応の位置・立体選択性から、P450 による酸化反応を有機合成化学に応用するための研究が数多く行われてきた。巨大菌から単離された P450BM3 は、他の P450 と比較して非常に高い活性を示すこと、安定で取り扱いが簡便であることから、実用的な P450 のモデルとして幅広く研究されている。しかし、P450BM3 は長鎖脂肪酸及びその類縁体を天然の基質としており、脂肪酸と構造が異なる化合物を基質として加えても、酸化反応はほとんど進行しない。一方、先行研究において、脂肪酸の部分構造を模倣した「偽物の基質」(デコイ分子)が存在すると、P450BM3 が誤って触媒サイクルを開始し、通常は基質とし得ない有機化合物(ベンゼン等)を酸化することが報告されている。結晶構造解析より、デコイ分子は P450BM3 の内部まで部分的に侵入しており、反応空間の一部を形成していることが明らかとなった。本論文は、P450 の触媒機構から P450BM3 の応用例までを示した序論(第一章)、デコイ分子の化学構造による P450BM3 の反応空間、および反応の立体選択性の制御についての研究成果(第二章から第四章)、人工金属錯体を内包した新たな P450BM3 の開発についての研究結果(第五章)の計五つの章より構成されている。

第二章では、P450BM3 による芳香族化合物ベンジル位水酸化反応について、デコイ分子を利用した立体選択性の制御に取り組んだ。インダンの水酸化反応では、5CHVA-Phe 存在下で 53% (*R*) ee、一方で Z-Pro-Phe 存在下で 56% (*S*) ee と、反応のエナンチオ選択性が反転し、加えるデコイ分子の構造の違いのみによって生成物のキラリティを制御することに成功した。また、デコイ分子が結合した P450BM3 の結晶構造解析を行ったところ、デコイ分子が P450BM3 の構造を変化させ、反応空間の形状に影響を与えていることを突き止めた。さらに、それらの構造に対するインダンのドッキングシミュレーションでは、実際の水酸化反応の選択性と一致する向きでインダンが P450BM3 内部に収納されるという結果が得られた。このことから、デコイ分子は、結合時に P450BM3 の構造変化を誘発しており、それによって非天然基質の結合様式を調整すること

で、水酸化反応時の立体選択性を制御している、との反応機構を提案するに至った。

第三章では、P450BM3 のアミノ酸残基である Phe87 (F87) を置換した変異体とデコイ分子を併用し、スチレンの立体選択的なエポキシ化反応の立体選択性を調査した。野生型の P450BM3 では、立体選択性がデコイ分子によってほとんど変化しなかったのに対し、アラニン、バリンに置換した F87A、F87V 変異体がデコイ分子によって大きな変化を示すことを発見した。この結果は、対象とする基質や酸化反応の様式に合わせ、デコイ分子と共に P450BM3 の構造も最適化することで、より高性能な触媒系の設計が可能になることを示す。さらに、P450 の酸化活性種のモデルとしてオキシモリブデンポルフィリン錯体を再構成した P450BM3 変異体とスチレン、デコイ分子の共結晶構造解析にも取り組み、スチレンが活性種の出現に伴って回転することを示唆する結果を得たほか、スチレンがオキシ種に対し、実際のエポキシ化反応の選択性を説明する配向で結合していることを明らかとした。

第四章では、P450 の天然の反応ではない、カルベン転移によるオレフィンのシクロプロパン化反応について、デコイ分子による選択性の制御が可能であるかを検討した。カルベン源としてジアゾ酢酸エチル (EDA) を利用したスチレンのシクロプロパン化反応において、F87A/T268A 変異体の P450BM3 は、デコイ分子 R-Ibu-Phe の存在下、シス選択性 91%、エナンチオ比 94%の選択性で(1*S*,2*R*)体を生成した。この選択性はデコイ分子非存在下における選択性 (シス選択性 81%、エナンチオ比 75%) を上回っており、非天然の反応においても、デコイ分子が反応空間の制御に利用できることを実証している。さらに、分子動力学シミュレーションを利用した計算機実験から、デコイ分子はヘム-カルベン中間体の配向にはほとんど影響を与えていないことが判明した。これに続くドッキングシミュレーションから、本反応においてデコイ分子は、活性部位内でのスチレンの向きを制御する役割を担っており、それによって立体選択性を制御している機構が強く支持された。

第五章では、カルベン挿入による C-H アルキル化反応の活性を P450BM3 に付与すべく、人工金属錯体である鉄フタロシアニンと P450BM3 の複合化を行った。調製した新規タンパク質 (BM3-FePc) は 665 nm に吸収極大を有しており、鉄フタロシアニンと P450BM3 の複合化に成功したことが示唆された。また、F87A/T268A 変異体 BM3-FePc を利用して、イソクロマンへのカルベン C-H 挿入反応を行ったところ、14% ee のエナンチオ選択性で反応が進行したことが GC-MS による分析から確認された。このことから、鉄フタロシアニンは P450BM3 の骨格内部の不斉環境下に存在していることが判明した。

以上、申請者は、P450BM3 が触媒する三種の異なる反応 (水酸化、エポキシ化、シクロプロパン化) の立体選択性の制御、および人工金属錯体と P450BM3 の複合化による新規反応系の構築を達成した。結晶構造解析と計算化学的手法を駆使した、選択性変化の機構解明に関する成果は、P450BM3 を基盤とした今後の触媒設計への指針に繋がるものである。また、本論文で提案した添加物による酵素反応選択性の制御という概念は、従来の酵素機能改変法である変異導入法と両立することができ、P450BM3 以外の幅広い酵素に対しても適用することが可能であると見込まれる。持続可能な社会の実現に取り組む現代において、より環境に配慮した不斉反応系の開発が求められる中、本論文の成果は新たな酵素反応系の開発に貢献するものと期待される。