

別紙 4

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

主 論 文 の 要 旨

論文題目	Development of Domain-ligation Method for the Reconstitution of Full-length P450BM3 and Evaluation of Monooxygenase Activity of Heme-substituted P450BM3 (ドメイン連結による再構成手法の開発およびヘム置換 P450BM3 の活性評価)
氏 名	大村 慧太

論 文 内 容 の 要 旨

シトクロム P450 はヘム酵素の一種であり、常温常圧下において高難度酸化反応である C(sp³)-H 結合の水酸化を行うことから、バイオ触媒としての応用が期待される。特に *Priestia megaterium* から単離されたシトクロム P450BM3 は、P450 酵素ファミリーの中でも特に高い触媒効率を示す。この高い活性の由来は、触媒部位（ヘムドメイン）と還元系（還元ドメイン）が一本のペプチド鎖で一体化した特徴的な複合構造にある。これにより、効率的にドメイン間で電子伝達を行うため、速やかに酸素分子を活性化し酸化活性種を発生させることが可能である。これまで数多くの先行研究により、P450BM3 の基質特異性は大幅に改善され、様々な有機小分子の水酸化に成功している。この高い活性と高い基質一般性を兼ね備えた P450BM3 の酵素反応場の利点を活かしつつ、その活性部位の改変（例えば、天然補因子であるヘムの合成錯体への置換、活性部位への非標準アミノ酸の導入など）を行うことができれば、高い機能をもつバイオ触媒の創成が期待される。しかし、P450BM3 はその複雑なタンパク質構造のため、適用可能な改変手法には制限があった。そこで本研究では、P450BM3 に適用可能な改変手法の拡張を目指した酵素再構築手法の開発を行った（第二章）。さらに、その手法の応用として、補因子置換を行った P450BM3 の調製（第三、四章）および、非標準アミノ酸を導入した P450BM3 の調製（第五章）を行った。第二章では、活性部位の改変手法を拡大に向け、P450BM3 を構成するヘムドメインと還元ドメインを分割して発現し、その後ドメイン間を連結するという手法を考案した。連結にはトランスペプチダーゼであるソルターゼを利用した。ドメイン間をつなぐリンカー部位の構造を検討した結果、野生型酵素と同等の活性を示すリンカー配列を見出した。連結後にこのリンカー配列となるようにヘムドメインの C 末端と還元ドメインの N 末端に連結用のタグペプチドを導入し、調製した連結体の活性評価を行った。調製した P450BM3 は高い活性を維持し、本連結手法が P450BM3 の活性部位改変に有効であることを確認した。これにより、還元ドメインに影響を及ぼすことなく、ヘムドメインのみを改変した P450BM3 の調製が可能となった。例えば、ヘムド

メインのみを鉄制限培地で発現し、ヘムを持たない状態（アポタンパク質）として調製することで、非天然金属錯体の導入（ヘム置換）が可能となる。その後還元ドメインの連結によって、還元ドメインの変性など無く全長体のヘム置換 P450BM3 が調製可能となる。

第二章で開発した全長体の P450BM3 再構成法を利用し、第三章では実際にヘム置換体の検討を行った。ヘム置換ヘムドメインを用いて、非天然錯体からなる活性中心が構築となる。さらに、還元ドメインを連結することで、P450BM3 の酸素分子活性化機能を利用した反応系の構築が期待される。酸素分子の活性化に有効な非天然金属錯体の探索に向け、ヘムと同様の炭素骨格を有するプロトポルフィリン IX あるいはメソポルフィリン IX を配位子とした種々の錯体を検討した。その結果、マンガンプロトポルフィリン IX を導入した P450BM3（以下、Mn-P450BM3）がモノオキシゲナーゼ活性を示すことを見出した。

第四章では、第三章で調製した Mn-P450BM3 の触媒機能に関して詳細な検討を行った。デコイ分子と Mn-P450BM3 変異体の組み合わせから、種々の有機小分子の酸化反応に成功した。さらに、不活性な脂肪族 C-H 結合の直接水酸化も可能であることを明らかにした。そこで、この水酸化反応の反応機構を調べるために詳細な検討を行った。酸素 18 安定同位体による標識実験により、Mn-P450BM3 はヘム結合型 P450BM3 と同様に、酸素分子の活性化によって酸化活性種を生成し、水酸化反応を行うことが示唆された。次に、重水素標識した基質を用いた分子内速度論的同位体効果（KIE）実験を行った。高い KIE を示したことから、その水酸化は、基質の C-H 結合の切断を経由することが示された。さらに、ラジカルクロック分子を用いた検討から、天然型 P450 と同様に、C-H 結合のホモリティック開裂とそれに続く C-O 結合形成によって水酸化が進行することを明らかにした。興味深いことに、Mn-P450BM3 では水酸化反応における C-O 結合形成速度の低下が確認された。これは、反応中間体であるアルキルラジカル種の寿命が増加していることを意味し、アルキルラジカルを反応中間体とした種々の反応への展開が期待される。既報の合成マンガニ錯体との反応性の比較から、マンガニ(V)オキシ種が活性種であることが示唆された。さらに密度汎関数法（DFT）を用いた検討を行い、実験結果と相関のある結果が得られた。

第五章では、P450BM3 再構成手法を利用し、ヘムの軸配位子をシステインからセレノシステインに置換した変異体の調製し、その評価を行った。ヘムドメインをセレノシステイン含有培地で発現させ、通常培地で発現させた還元ドメインと連結させることにより、セレノシステイン配位型全長体 P450BM3 を調製することに成功した。続いて、活性種に対するセレノシステイン配位の効果に関して調査を行った。先行研究においてセレノシステイン配位型の酸化活性種は、システイン配位型の酸化活性種よりも高い C-H 活性化能を有することが報告されていたが、その詳細なメカニズムは解明されていなかった。そこで、P450BM3 の広い基質適応範囲を活かし、反応機構プローブ分子を利用した検討を行った。以上のとおり、本研究ではドメイン連結による P450BM3 再構成手法を確立し、ヘム置換体 P450BM3 の調製に成功した。これにより、合成ポルフィリン錯体を活性中心とした酸素分子活性化系の構築に初めて成功した。本手法は、天然補因子であるヘムでは実現困難であった高難度酸化反応や、非天然反応を行うバイオ触媒の開発に有効であるだけでなく、P450BM3 の高機能化手法として高い応用可能性が期待される。