

## 別紙 4

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

## 主 論 文 の 要 旨

論文題目 Utilizing Substrate Misrecognition for the Functional Modification of Lipid-Specific Peroxygenases and Monooxygenases  
(基質誤認識を利用した脂質酸化酵素の機能改変)

氏 名 小野田 浩宜

## 論 文 内 容 の 要 旨

## 【目的】

過酸化水素は環境負荷が少なく安価で再生可能な資源である。本論文では、高い触媒活性を示す脂質特異的な酸化酵素を用いて、過酸化水素を酸化剤として利用する汎用的な物資変換の触媒反応系の構築を目指した。

## 【問題提起と解決方策】

過酸化水素を用いて基質に酸素原子を添加する酵素であるペルオキシゲナーゼは、2019年現在、5種類しか特定されていない。その中でも、水溶性タンパク質として取扱が容易な微生物由来のペルオキシゲナーゼ（シトクロム P450 の 152 ファミリー酵素、CYP152）は、通常、長鎖脂肪酸以外の基質を酸化できないという問題があった。

本論文第二章では、好熱性細菌由来の熱安定性を期待された脂肪酸特異的なペルオキシゲナーゼ（CYP152N1）の過剰発現系及び大量精製手法を確立し、CYP152N1の物性評価と脂肪酸酸化活性評価を行った。本論文第三章では、CYP152の反応溶液に対して、長鎖脂肪酸の基質疑似分子として「酢酸」を加えることで、長鎖脂肪酸とは全く構造の異なる芳香族化合物である、1-メトキシナフタレンとスチレンの酸化活性を評価した。本論文第四章では、酢酸の添加を必要としない触媒反応系の確立の為に、長鎖脂肪酸や酢酸に共通するカルボキシル基を、アミノ酸側鎖に持つ「グルタミン酸」を、脂肪酸認識部位の近傍に変異導入した CYP152 の変異体を作成した。また、代表的なシトクロム P450 モノオキシゲナーゼである CYP101A1 及び CYP102A1、CYP119A1 の反応場に「グルタミン酸」を変異導入した変異体を作製し、ペルオキシゲナーゼ活性を評価した。本論文第五章では、脂質特異的な CYP102A1 モノオキシゲナーゼの基質汎用性獲得を指向した人工進化変異体 KT2 と *N*-アシルアミノ酸を用いた基質誤認識システムの相乗効果を評価し、シクロアルカンの酸化活性に与える *N*-アシルアミノ酸の作用機序を評価した。

**【実験結果】**

ヒスチジンタグ融合型蛋白質として CYP152N1 を大腸菌内で過剰発現し、プロテアーゼを併用した手法でヒスチジンタグを取り除いた CYP152N1 の単離精製に成功し、CYP152N1 の結晶構造を解明した。CYP152N1 は 1 分間あたり最大 1900 回の長鎖脂肪酸水酸化反応を触媒し、高い位置選択性 ( $\alpha > 99\%$ ) と立体選択性 (91% ee (*S*)) を示した。50  $\mu\text{M}$  以下の低濃度過酸化水素存在下で、CYP152N1 は過酸化水素と当量的に水酸化脂肪酸を生成したが、1 mM 以上の過剰な過酸化水素存在下では、脂肪酸の  $\alpha$ -酸化的な脱炭酸反応を経て、反応に用いた脂肪酸より炭素鎖が炭素 1 個分短い脂肪酸を生成した。

CYP152A1 や CYP152B1 は長鎖脂肪酸の酸化反応を特異的に触媒し、通常、1-メキシナフタレンやスチレン等の酸化反応を触媒できないが、高濃度の酢酸ナトリウムを含む水溶液中では 1 分間あたり 150 回を超える速さで 1-メキシナフタレンの芳香環水酸化反応を触媒した。CYP152N1 は、25°C 以下でほとんど触媒活性を示さなかったが、40°C の反応溶液中で 1 分間あたり 300 回以上の水酸化反応を触媒した。CYP152A1 は高温条件で触媒活性を失ったが、CYP152B1 は 40°C で 1 分間あたり 600 回の芳香環水酸化を触媒した。この活性は、報告済みの触媒活性の約 5 倍に達している。また、酢酸イオンを含む水溶液中で、CYP152A1 と CYP152B1 はスチレンの立体選択的なエポキシ化反応を優先的に触媒したが、CYP152N1 はスチレンの  $\beta$ -位の酸化反応を優先的に触媒した。

CYP152B1 A245E 変異体は、野生型と異なり、酢酸の添加を必要とせずスチレンのエポキシ化反応を触媒できると報告していた。CYP152A1 A246E 変異体は同様にスチレンの酸化反応を触媒し、CYP152N1 A243E 変異体はスチレンの  $\beta$ -位の酸化反応を触媒した。さらに、上記の変異体はチオアニソールの過剰な酸化(スルホン化)を抑えつつ、スルホキシド化反応を特異的に触媒した。特に CYP152B1 A245E 変異体は、立体選択的 (66% ee (*R*)) に 1 分間あたり 6,400 回ものスルホキシド化反応を触媒した。野生型の CYP102A1 は過酸化水素を酸化剤として利用しないが、T268E 変異体は過酸化水素を用いてスチレンの酸化反応を触媒した。結晶構造解析から、導入したグルタミン酸が想定した位置に配置された事を確認し、グルタミン酸が過酸化水素の一般酸塩基触媒として機能したと考えられる。

本来、CYP102A1 は還元酵素と酸素を用いて脂質を酸化する酵素である。通常、シクロペンタンの酸化反応を触媒できない ( $< 1 \text{ min}^{-1}$ ) が、基質疑似分子の *N*-パーフルオロノナノイルフェニルアラニン存在下ではシクロペンタンの酸化反応を触媒する ( $950 \text{ min}^{-1}$ )。基質汎用性を指向した KT2 人工進化変異体は野生型と異なりシクロペンタンを酸化できる ( $23 \text{ min}^{-1}$ ) と報告されていたが、*N*-パーフルオロノナノイルフェニルアラニン存在下の KT2 変異体は高いシクロペンタンの酸化活性 ( $1330 \text{ min}^{-1}$ ) を示した。

**【総括】**

目的の化合物を合成する天然酵素は、厳格な基質認識機構を有する。高濃度の過酸化水素存在下や基質疑似分子存在下、先天的な部位特定変異導入や非特異的な変異導入により、基質認識機構が誤作動し、酵素は非天然の基質を誤認識して反応を触媒した。上記の基質誤認識を駆使した酵素の汎用的な物資変換システムの開発が期待される。