

## 化学合成を必要としない酵素的ベンゼン水酸化反応を指向した、天然物デコイ分子応答シトクロム P450BM3 変異体の指向性進化法による開発

(名大院理<sup>1</sup>・理研 Spring-8<sup>2</sup>) ○横山 侑弥<sup>1</sup>・唐澤 昌之<sup>1</sup>・有安 真也<sup>1</sup>・愛場 雄一郎<sup>1</sup>・杉本 宏<sup>2</sup>・荘司 長三<sup>1</sup>

Directed Evolution of Cytochrome P450BM3 for Responding Natural Products as Decoy Molecules for Direct Benzene Hydroxylation without Chemical Synthesis (<sup>1</sup>*Graduate School of Science, Nagoya University*, <sup>2</sup>*RIKEN, Spring-8*) ○Yuya Yokoyama,<sup>1</sup> Masayuki Karasawa,<sup>1</sup> Shinya Ariyasu,<sup>1</sup> Yuichiro Aiba,<sup>1</sup> Hiroshi Sugimoto,<sup>2</sup> Osami Shoji<sup>1</sup>

Cytochrome P450BM3 (P450BM3) catalyzes efficient hydroxylation of long-chain fatty acids. Our research group has reported that synthetic dummy substrates “Decoy Molecules” enable hydroxylation of non-native substrates such as benzene by P450BM3.<sup>1)</sup> In this research, we aim at developing the reaction system without synthesis and addition of decoy molecules. Therefore, we applied directed evolution in order to engineer P450BM3 mutants recognizing C10-acyl homoserine lactone (C10-AHL), produced by a kind of bacteria, as a decoy molecule. After four rounds of evolution through screening of 5472 mutants by whole-cell benzene hydroxylation in the presence of C10-AHL, the evolved P450BM3 mutant shows about 70-fold higher activity than WT with C10-AHL. We will discuss the evolutionary trajectory and the detail of mutants including X-ray crystal structures and binding affinities against C10-AHL.  
**Keywords :** *Cytochrome P450; Decoy Molecules; Directed Evolution; N-Acyl Homoserine Lactone; Direct Benzene Hydroxylation*

当研究室では、長鎖脂肪酸を高効率に水酸化するシトクロム P450BM3 に対して、天然基質を模倣して化学合成したデコイ分子の添加によるベンゼンなどの非天然基質の水酸化を報告している<sup>1)</sup>。本研究では、既存のデコイ分子と似た骨格を有し、一部の細菌が分泌する C10-アシルホモセリンラクトン (C10-AHL) に着目し、C10-AHL に応答して高い活性を示す P450BM3 変異体を開発し、C10-AHL 分泌菌と P450BM3 変異体発現大腸菌の共培養によるデコイ分子の合成と添加が不要な反応系開発を目的とした (図 1)。

計 5472 変異体を C10-AHL 存在下での菌体内ベンゼン水酸化反応によってスクリーニングし、四世代に渡る指向性進化を実施したところ、図 2 のような各世代の変異体が得られ、最終的に開発した第四世代変異体は C10-AHL 存在下で野生型の約 70 倍の活性を示した。現在、開発した変異体の結晶構造解析や C10-AHL との結合親和性などを調査しており、進化の過程と併せて報告する。

1) O. Shoji, *et. al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56, 10324-10329.

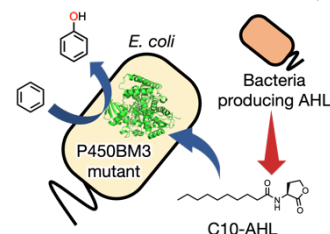


図 1 C10-AHL 分泌菌を用いた菌体内ベンゼン水酸化反応。

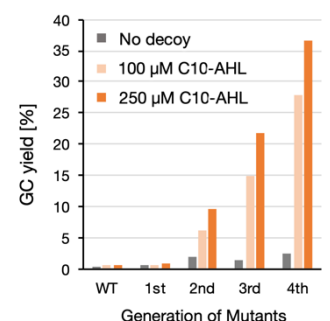


図 2 開発した変異体による菌体内ベンゼン水酸化活性。