

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号： 14401

研究種目： 国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間： 2017～2019

課題番号： 16KK0112

研究課題名（和文）進化学を駆使した高性能バイオハイブリッド触媒の開発（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Development of High Performance Biohybrid Catalyst by Directed Evolution
(Fostering Joint International Research)

研究代表者

小野田 晃 (Onoda, Akira)

大阪大学・工学研究科・准教授

研究者番号： 60366424

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,900,000円

渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：多彩な反応性をもつ金属錯体触媒と、精緻かつ多様な反応場を提供するタンパク質を融合したバイオハイブリッド触媒は、従来にはない位置選択性・官能基選択性・基質選択性の実現が期待される。本研究では、高機能なバイオハイブリッド触媒を効率的に創製するために、指向性進化学の手法を取り入れた触媒探索法の開発に取り組んだ。夾雑な環境でロジウム錯体とタンパク質を連結する手法、またC-H結合官能基化により得られる生成物を蛍光法により迅速に検出する手法を開発し、ロジウム錯体をニトロバインディンタンパク質と連結したバイオハイブリッド触媒を指向性進化学により高活性するためのホールセル技術プラットフォームを確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

石化資源からバイオマス利用への移行が求められており、現代の物質社会を支える多様な物質群を、高効率かつ選択的に変換する触媒は益々重要になっている。石化資源の利用には、合成された固体触媒や金属錯体触媒が利用されており、一方で、バイオマス資源の利用には、酵素等の生体触媒が利用される。金属錯体触媒に、生物がもつ多様な分子環境を融合すれば、未踏の選択性を付与した触媒の開発が期待される。上記の背景とバイオテクノロジーの発展により、新たな物質変換を担う触媒としての認識が高まっており、本研究は、次世代の触媒であるバイオハイブリッドの開発の基盤となる技術と知見を与える成果である。

研究成果の概要（英文）：Efforts to develop biocatalysts with new chemical reactivity and selectivity different from that found in nature indicate that promising strategies involve incorporation of a metal-containing moiety into protein scaffolds. In this project, to generate biohybrid catalysts with improved activity and selectivity, we develop key methods in high-throughput screening technology for directed evolution of biohybrid catalysts containing a transition metal complex. The rhodium complex active for the wide range of C-H bond functionalization is able to be linked with the scaffold protein expressed on the cell surface of the bacteria. In addition, the activity toward C-H bond functionalization producing isoquinoline from phenyloxime and alkynes was screened by the fluorescence measurements. We demonstrated that the catalytic activity of the rhodium complex-linked biohybrid catalyst is improved using these methods that enables directed evolution of the biohybrid catalysts.

研究分野： 錯体化学、タンパク質工学

キーワード： バイオハイブリッド触媒 人工金属酵素 指向性進化学 金属錯体触媒 ロジウム錯体 ホールセル触媒

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

エネルギー・環境問題の解決に向けて、石化資源からバイオマス利用への移行が求められている。このような社会的要請のもと、現代の物質社会を支える多様な物質群を、高効率かつ選択的に変換する触媒は益々重要になっている。石化資源の利用には、合成された固体触媒や金属錯体触媒が利用されており、一方で、バイオマス資源の利用には、酵素等の生体触媒が利用される。金属錯体触媒に、生物がもつ多様な分子環境を融合すれば、未踏の選択性を付与した触媒の開発が期待される。このような人工金属酵素とも呼ばれるバイオハイブリッド触媒は、1970年代から研究が始まっているが、上記の背景とバイオテクノロジーの発展により、新たな物質変換を担いうる触媒としての認識が高まり、近年、研究が精力的に行われている。

2. 研究の目的

研究代表者は、多彩な反応性をもつ金属錯体触媒と、精緻かつ多様な反応場を提供するバレル型タンパク質を融合したバイオハイブリッド触媒を構築し、従来にはない位置選択性・官能基選択性・基質選択性を付与した触媒の開拓に取り組んでいる。本研究では、このような新たな高機能バイオハイブリッド触媒をより効率的に創製するために、指向性進化学の手法を取り入れた触媒探索法の開発を目的とした。即ち、タンパク質環境にアミノ酸変異を網羅的に導入した膨大な種類のバイオハイブリッド触媒を作製し、活性等の性能が向上した触媒をハイスループットに探索する手法である。本研究では、バイオハイブリッド触媒の指向性進化学を実現するために、バイオハイブリッド触媒を大腸菌の細胞表面に提示した触媒系の作製とハイスループットな評価法の確立に取り組み、バイオハイブリッド触媒の高活性化を実現した。

3. 研究の方法

幅広い物質変換への適用を狙い、C-H 結合官能基化反応において高い活性を示すヘキサメチルシクロペンタジエニルロジウム $Cp^*Rh(III)$ 錯体を人工金属補因子として選択した。そこで、 $Cp^*Rh(III)$ 錯体をタンパク質反応場に連結するために、マレイミド基を導入した錯体 **1** を合成した (Figure 1a)。タンパク質には、10本の β ストランドからなる強固なバレル型構造を持つニトロバインディン (NB) を用いた (Figure 1b)。NB は、分子量 19 kDa と比較的小さなタンパク質であり、本来は、鉄ポルフィリンであるヘムを補欠分子として持ち、一酸化窒素を結合する機能がある。メチオニン残基はロイシンに置換したうえで、ヘムを取り除いた NB のアポ体を利用し、バレル内の疎水性空孔にシステイン残基を変異導入したタンパク質と **1** を共有結合で連結した。基質にはフェニルオキシムとジフェニルアルケンを選択し、生成物のイソキノリン誘導体をガスクロマトグラフィー-質量分析計、蛍光分光により評価した。

4. 研究成果

大腸菌などの宿主細胞内外で発現したタンパク質を、精製操作をへずにそのまま利用するホールセル触媒は、調製が容易かつ精製操作を必要としないので、進化学を行う上で重要である。一方で、バイオハイブリッド触媒の調製には、目的のタンパク質と金属錯体を選択的に複合化する必要があるため、様々な分子が混在する細胞環境で複合化を行うことは容易でない。その第一の要因は、触媒活性を有する金属錯体が、タンパク質中のシステインやヒスチジン等のアミノ酸残基や、グルタチオン等の低分子など、細胞内外の様々な求核剤と非特異的に錯形成して失活するためである。そこで、このような金属錯体との非特異的な錯形成を抑制して、ホールセル触媒の反応系を構築することから着手した。

$Cp^*Rh(III)$ 錯体は、協奏的メタル化-脱プロトン化の反応機構を經由し、不活性な C-H 結合を様々な官能基へと変換する。その一方で、 $Cp^*Rh(III)$ 錯体は、3つの空配位座に対して、ア

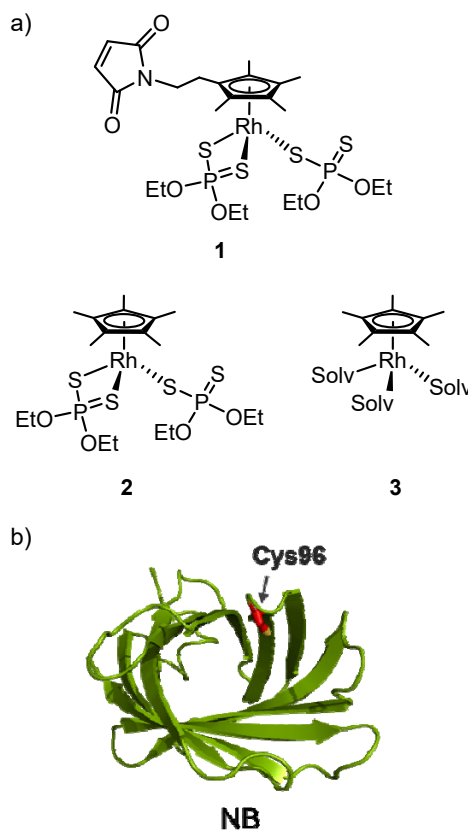


Figure 1. (a) Chemical structures of Cp^*Rh complexes and (b) a β -barrel structure of nitrobindin.

ミノ酸残基などの求核性をもつ官能基が配位すると、容易に失活する。この失活過程を防ぐために、配位サイトを保護した Cp*Rh(III) 錯体の活用法を探索した。種々の含硫黄配位子を検討した結果、*O,O'*-ジアルキルジチオホスフェート配位子が、Cp*Rh(III) 錯体の保護基として機能することを見出した。ジチオホスフェート配位子は [Cp*RhCl₂]₂ と速やかに反応し、置換不活性な錯体 **2** を形成する (Figure 1a)。錯体 **2** は、触媒反応に関わる 3 つの配位座に対して 2 つのジチオホスフェートが配位しているため、タンパク質中のアミノ酸残基の配位による錯形成を抑制する。したがって、この状態では、錯体 **2** は触媒活性を示さない。この不活性な錯体 **2** に対して、硝酸銀を添加するとトランスメタリ化によるジチオホスフェート配位子の脱離が進行し、C-H 結合官能基化に対して活性な錯体 **3** が系中で生成する (Figure 1a)。ジチオホスフェート錯体 **2** は、潜在的な触媒活性を有しており、空配位座の生成により活性化されることを実証した。この活性化機構を活用して、Cp*Rh(III) 錯体を連結したバイオハイブリッド触媒の構築に着手した。

NB タンパク質の疎水的空孔内部にシステイン残基 (Cys96) を導入した変異体を利用し、Cp*Rh 錯体 **1** に含まれるマレイミド基とシステインの間の共有結合形成により錯体を連結した (Figure 2)。ジチオホスフェート配位子により Rh(III) 錯体の非特異的な錯形成を抑制し、NB の疎水的空孔内へ複合化した後に、続く硝酸銀の添加によりジチオホスフェート配位子を脱保護することで、Cp*Rh 錯体を連結したバイオハイブリッド触媒を構築した。

大腸菌により発現した NB タンパク質を用いて、錯体 **1** を複合化した。ジチオホスフェート配位子の保護により、Cp*Rh(III) 錯体と NB の非特異的な錯形成は抑制され、NB に対して錯体 **1** が定量的に複合化されていることを、ESI-TOF 質量分析により明らかとした。次に、この錯体 **1** を複合化した NB (NB-1) を用いて、C-H 結合活性化によるフェニルオキシム **4** とジフェニルアルキン **5** の付加環化反応を実施した (Table 1, Scheme 1)。硝酸銀を添加した条件で、バイオハイブリッド触媒の活性は回復し、目的生成物 **6** および **7** を 15% の収率で与えた (entry 1)。一方で、硝酸銀非存在下では、反応の進行は見られなかった (entry 2)。この結果より、バイオハイブリッド触媒 NB-3 においても、銀イオンによるジチオホスフェート配位子の脱離が進行することが明らかとなった。また、Rh(III) 錯体近傍のアミノ酸残基に対して変異導入を行った結果、特 NB(L100E)-1 は収率が 24% に向上した。さらに、98、125 番目に変異を導入したところ、NB(L100E/A125E) 変異体において顕著な活性の向上が見られ、収率が 40% に向上した (entry 6)。変異導入されたグルタミン酸は、ジチオホスフェートの脱離にともなう触媒の活性化の段階に寄与したと考えられる。

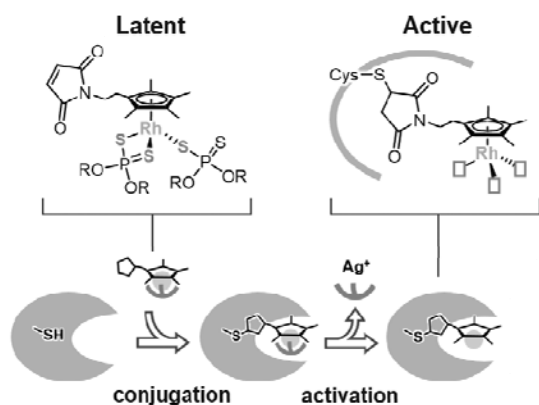


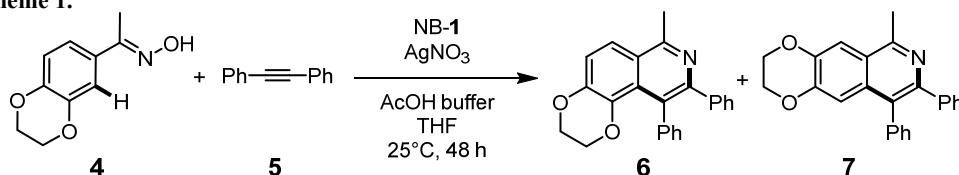
Figure 2. Activation of a latent Cp*Rh complex linked with nitrobindin.

Table 1. Cycloaddition of oxime **4** and alkyne **5**

entry	Rh(III) catalyst	yield	6 / 7
1	NB-1	15 ± 1	92 / 8
2 [a]	NB-1	n.d.	–
3	NB(L100E)-1	24 ± 1	91 / 9
4	NB(T98E/L100E)-1	33 ± 1	90 / 10
5	NB(L100E/A125E)-1	35 ± 1	89 / 11
6 [b]	NB(L100E/A125E)-1	40 ± 1	90 / 10

Reaction conditions: **4** (0.25 mM), **5** (5.0 mM), NB-1 (25 μM) and AgNO₃ (1.0 mM) in AcOH buffer (100 mM AcOH, 20% THF, pH 4.0). Yields were calculated by GC-MS. [a] 0 mM AgNO₃ [b] 10 mM AgNO₃.

Scheme 1.



以上を踏まえ、この潜在的触媒活性を有する Rh(III) ジチオホスフェート錯体を用いた本手法を、ホールセル反応へと応用した。ホールセル反応のプラットフォームとして、NB の細胞表面提示法を用いた。EstA* オートトランスポーターと呼ばれる外膜タンパク質に、NB の C 末端を遺伝子工学的に融合したタンパク質(csdNB) を用い、宿主細胞である大腸菌の細胞膜表

面上でバイオハイブリッド触媒の構築および、触媒反応を実施した (Figure 3a)。NB を細胞膜外に提示することで、タンパク質反応場である NB と Cp*Rh(III) 錯体との複合化の効率と選択性が向上すると期待される。さらに Cp*Rh(III) 錯体の細胞膜透過性を低減するため、負に帯電した水溶性 Rh(III) ジチオホスフェート錯体 **8** を合成した (Figure 3b)。csdNB を外膜上に発現した大腸菌の懸濁液に対し、錯体 **8** を添加し csdNB と複合化し、その後、遠心分離により未反応の **8** を除去することで大腸菌細胞膜上においてバイオハイブリッド触媒を構築した。

この細胞膜提示型バイオハイブリッド触媒を用いて、硝酸銀存在下、オキシム **4** とアルキン **5** の付加環化反応を実施し、主生成物である **6** に由来する 460 nm の蛍光をもとに、各 csdNB 変異体の触媒活性を評価した。錯体 **8** の結合部位となる Cys96 残基をグルタミンに置換した csdNB(C96Q) 変異体を用いた場合と比較して、Cys96 残基を有する csdNB はより高い活性を示した。以上より、大腸菌の外膜上に csdNB を過剰発現させることで、設計通りに錯体 **8** が csdNB と結合していることを確認した。また、Table 1 で示したグルタミン酸を導入した 3 つの NB 変異体についても CSD 法により大腸菌細胞膜上で触媒反応を実施したところ、均一系と同様の触媒活性の向上が見られ、ホールセル反応系においても NB が本来のβ-バレル構造を保持し、反応場として機能することが明らかとなった。

本研究成果において、ロジウム錯体をニトロバインディンタンパク質と連結したバイオハイブリッド触媒を指向性進化学により高活性するためのホールセル技術プラットフォームを確立した。夾雑な環境においても、ロジウム錯体とタンパク質を連結する手法、また C-H 結合官能基化により得られる生成物を蛍光法により迅速に検出する手法もあわせて開発に成功した。以上は、バイオハイブリッド触媒を網羅的かつ高速に探索可能な実験室進化のための重要な技術要素であり、今後は、この技術を活用して、従来にはない位置選択性・官能基選択性・基質選択性を付与したバイオハイブリッド触媒の開拓を進めていく。

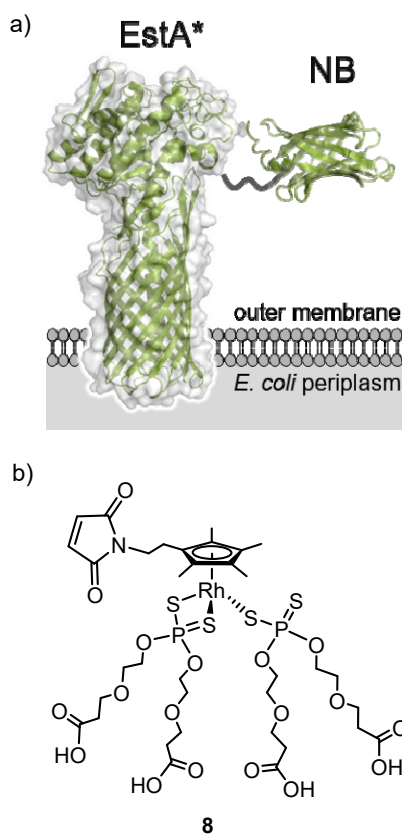


Figure 3. (a) Schematic illustration of csdNB in a whole cell catalyst. (b) Chemical structure of a Cp*Rh(III)-dithiophosphate complex.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 T. Himiyama, N. Taniguchi, S. Kato, A. Onoda, T. Hayashi	4. 巻 56
2. 論文標題 A Pyrene-Linked Cavity within a beta-Barrel Protein Promotes an Asymmetric Diels-Alder Reaction	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Angew. Chem. Int. Ed.	6. 最初と最後の頁 13618-13622
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/anie.201704524	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 A. R. Grimm, D. F. Sauer, M. D. Davari, L. Zhu, M. Bocola, S. Kato, A. Onoda, T. Hayashi, J. Okuda, U. Schwaneberg	4. 巻 8
2. 論文標題 Cavity Size Engineering of a β -Barrel Protein Generates Efficient Biohybrid Catalysts for Olefin Metathesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Catal.	6. 最初と最後の頁 3358-3364
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acscatal.7b03652	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 K. Oohora, A. Onoda, T. Hayashi	4. 巻 52
2. 論文標題 Hemoproteins Reconstituted with Artificial Metal Complexes as Biohybrid Catalysts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acc. Chem. Res.	6. 最初と最後の頁 3358-3364
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.accounts.8b00676	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 5件/うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Shunsuke Kato, Kengo Tachikawa, Akira Onoda, Takashi Hayashi
2. 発表標題 Synthesis of Isoquinoline Derivatives from Oxime and Alkyne Catalyzed by a RhCp*-Linked beta-Barrel Protein
3. 学会等名 14th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akira Onoda
2. 発表標題 SHUTLLING PROTONS: Hydrogen Evolution Catalyzed by a Synthetic Diiron Azadithiolate Complex Embedded within a Protein Matrix
3. 学会等名 Japan-China Joint Interdisciplinary Symposium on Coordination-based Hybrid Materials (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 谷口 直優, 氷見山 幹基, 加藤 俊介, 小野田 晃, 林 高史
2. 発表標題 パレル型タンパク質へのピレン連結による 反応場の構築と不斉 Diels-Alder 反応への応用
3. 学会等名 第34回合同シンポジウム (第84回日本分析化学会有機微量分析研究懇談会, 第104回計測自動制御学会力学量計測部会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 谷口 直優, 氷見山 幹基, 加藤 俊介, 小野田 晃, 林 高史
2. 発表標題 パレル型タンパク質空孔にピレン誘導体を導入した反応場の構築と Diels-Alder 反応への応用
3. 学会等名 第11回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akira Onoda
2. 発表標題 Biohybrid Catalysts Harboring a Synthetic Catalyst within an Asymmetric Protein Environment
3. 学会等名 錯体化学会第67回討論会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 青木亜由美、小野田晃、林高史
2. 発表標題 ベータバレル型タンパク質空孔内にヒドロゲナーゼモデル鉄二核錯体を固定化したバイオハイブリッド触媒における階層的なプロトンシャトルの設計と水素発生評価
3. 学会等名 錯体化学会第67回討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akira Onoda
2. 発表標題 Biohybrid Catalysts Harboring a Synthetic Metal Complex within a Barrel Protein
3. 学会等名 日本化学会 第98春季年
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shunsuke Kato, Alexander Grimm, Akira Onoda, Ulrich Schwaneberg, Takashi Hayashi
2. 発表標題 Construction of Cp*Rh(III)-linked Biohybrid Catalyst for the synthesis of isoquinolines
3. 学会等名 Aachen Protein Engineering Symposium (AcES) 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akira Onoda
2. 発表標題 Tailored Protein Assemblies for Hybrid Biomaterials
3. 学会等名 Aachen Protein Engineering Symposium (AcES) 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷口 直優, 加藤 俊介, 小野田 晃, 林 高史
2. 発表標題 バレル型タンパク質空孔にピレン誘導体を導入した疎水性反応場におけるDiels-Alder 反応の選択性評価
3. 学会等名 日本化学会 第98春季年
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akira Onoda
2. 発表標題 Biohybrid Catalysts Harboring a Synthetic Metal Complex within a Barrel Protein
3. 学会等名 Biotechnology and Chemistry for Green Growth 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shunsuke Kato, Alexander Grimm, Akira Onoda, Ulrich Schwaneberg, Takashi Hayashi
2. 発表標題 Biotechnology and Chemistry for Green Growth 2018: "Synthesis of Isoquinoline Derivatives via C-H Bond Activation Catalyzed by Cp*Rh(III)-linked Biohybrid Catalysts.
3. 学会等名 Biotechnology and Chemistry for Green Growth 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akira Onoda
2. 発表標題 Designing Biohybrid Catalyst and Biohybrid Materials: Covalent Protein Modification Case Study
3. 学会等名 Designer Biology Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shunsuke Kato, Akira Onoda, Alexander Grimm, Ulrich Schwaneberg, Takashi Hayashi
2. 発表標題 A Catalytically Latent Rh(III) Complex for a Cell Surface Displayed Biohybrid Catalyst
3. 学会等名 15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shunsuke Kato, Akira Onoda, Ulrich Schwaneberg, Takashi Hayashi
2. 発表標題 Directed Evolution of a Rh(III)-linked Biohybrid Catalyst for Isoquinoline Synthesis via Cycloaddition of Oximes and Alkynes
3. 学会等名 日本化学会 第100春季年
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://www.chem.eng.osaka-u.ac.jp/~hayashiken/index.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ウルリッヒ シュヴァンネベルグ (Ulrich Schwaneberg)	アーヘン工科大学・バイオテクノロジー研究所・教授	