

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20535

研究課題名（和文）進化分子工学を駆使した新規高機能金属酵素の開発

研究課題名（英文）Evolutionary engineering of artificial metalloenzymes for the generation of novel catalysts

研究代表者

加藤 俊介（Kato, Shunsuke）

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：60909125

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、優れた触媒特性を発揮する新規高機能触媒を開発することを目的とし、非天然の遷移金属錯体をタンパク質に導入した人工金属酵素の構築と、指向性進化法を駆使した遺伝子工学的な改変を実施した。具体的には、ロジウム錯体、鉄コロール錯体、鉄ポルフィリン錯体を補因子とする人工金属酵素を構築し、指向性進化法による改変を実施した結果、C-H結合官能基化反応やニトリル合成反応に対して高い触媒活性を示す変異体の獲得に成功した。また、効率的な人工金属酵素の指向性進化を実現するために、新たなハイスループットスクリーニング法も確立している。以上のように、期間全体を通じて当初の予想を上回る大きな成果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、非天然の遷移金属錯体をタンパク質に導入した人工金属酵素の構築と、指向性進化法を駆使した遺伝子工学的な改変を実施し、優れた触媒特性を発揮する新規高機能触媒の開発に成功した。持続可能な社会の実現にむけ、酵素や微生物などを用いた物質生産技術（バイオプロダクション）に注目が集まる昨今において、本研究成果はバイオプロダクションの有用性を拡張し、その社会実装の一助になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we carried out evolutionary engineering of artificial metalloenzymes to develop novel transition metal catalysts with excellent catalytic activities. In particular, artificial metalloenzymes which possess Cp^{*}Rh complex, Fe-corrole complex, and Fe-porphycene complex as a synthetic metal cofactor were generated and engineered through the cycle of directed evolution. Finally, we succeeded in obtaining novel artificial metalloenzymes with excellent catalytic activities.

研究分野：生物無機化学

キーワード：人工金属酵素 進化分子工学 指向性進化法 C-H結合官能基化 生体触媒 ヘムタンパク質 金属ポルフィリノイド

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

持続可能な社会の実現に向け、直截的な物質変換を可能にする高機能性触媒の開発は喫緊の課題である。そこで申請者は、生体内での物質変換を担う酵素、特に金属錯体を補因子として有する金属酵素の「補因子置換」と「反応場改変」に着目した。金属酵素は、進化の過程で最適化されたタンパク質独自の反応場を具備し、反応場が金属補因子の反応性や反応基質の配向を制御することで、優れた酵素活性を発揮する。例えば、ヘム（鉄ポルフィリン錯体）を補因子とする一連のヘム含有酵素は、そのユニークな反応場が鉄活性中心の反応性や基質の配向を制御することで、一連のヘムから多彩な化学反応を実現している。一方で、近年の著しいバイオテクノロジーの発展に伴い、我々科学者は、これら金属酵素の反応場を自在に改変する手法を獲得した。従って、金属酵素の精緻な反応場の改変技術と非天然の合成金属錯体を組み合わせることができれば、従来の小分子錯体では実現困難な触媒特性（触媒活性、ジアステレオ選択性、反応選択性）を実現する新しい金属触媒（人工金属酵素）が開発可能となることが期待される。

2. 研究の目的

進化分子工学とは、自然界の進化のプロセスを模倣し、酵素や抗体などの高機能性タンパク質の改変を行う研究分野である。本研究では、この進化分子工学的手法の中でも、特に「指向性進化法 (directed evolution)」を遷移金属錯体と融合し、新規高機能触媒を開発することを目的とする。具体的には、補因子として合成金属錯体をタンパク質に導入した「人工金属酵素」を構築し、指向性進化法を駆使してその活性中心の化学反応場を遺伝子工学的に改変する。指向性進化法により得られる膨大なタンパク質ライブラリの多様性を武器に、活性中心の化学反応場を網羅的に最適化することで、通常の小分子金属錯体では達成困難な高難度な物質変換を実現する新規高機能金属触媒を開発することをめざした。

3. 研究の方法

初めに、各人工金属酵素についてハイスループットスクリーニング系を確立した。具体的に使用するハイスループットスクリーニング系として、研究代表者が独自に開発したマルトース結合タンパク質 (MBP) タグおよび Strep-tag II を用いた *in vitro* 条件下でのハイスループットスクリーニング手法を採用した。本手法は、細胞夾雑物の存在しない精製条件下での人工金属酵素の調製と触媒活性評価を高効率で実現する唯一無二の技術である。反応場として用いる目的タンパク質の N 末端にタグを連結した融合タンパク質を調製し、各人工金属酵素についてハイスループットスクリーニング系を確立した。次に、確立したハイスループットスクリーニング系を活用し、各人工金属酵素の指向性進化を実施した。適切な多様性をもった変異体ライブラリを作成するために、site saturation mutagenesis や error-prone PCR 等の変異導入手法を活用した。そして、得られた人工金属酵素の変異体ライブラリについては、プレートリーダーや GC、HPLC を用いて触媒活性の評価を実施した。また、指向性進化の結果、最終的に得られた優れた触媒特性を示す人工金属酵素変異体については、X 線結晶構造解析や速度論解析などを実施し、反応機構に関する詳細な知見を得た。

4. 研究成果

本研究は、非天然の遷移金属錯体を補因子としてタンパク質に導入した「人工金属酵素」の構築と、指向性進化法 (directed evolution) を駆使した遺伝子工学的な改変を実施し、優れた触媒特性を発揮する新規高機能触媒の開発に成功した。具体的には、2021 年度には、Cp*Rh 錯体を活性中心に有する人工金属酵素を構築し、指向性進化法による改変を実施することで、C-H 結合官能基化反応に対して優れた触媒活性を有する変異体の獲得に成功した (S. Kato *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145*, 8285-8290)。また、2022 年度には、鉄コロール錯体を補因子としてミオグロビンに導入した人工金属酵素を構築し、指向性進化法によるタンパク質反応場の改変を実施した。その結果、ABTS の酸化反応に対して高いペルオキシダーゼ活性を示す変異体を獲得することに成功した。さらに、2023 年度には、鉄ポルフィリン錯体を補因子としてミオグロビンに導入した人工金属酵素についても遺伝子工学的改変を実施し、アルドキシムの脱水反応に対する触媒活性を向上させることに成功した。また、研究期間全体を通じて、効率的な人工金属酵素の指向性進化を実現するために、Strep-tag II を精製タグに用いた新たなハイスループットスクリーニング (HTS) 手法の確立にも成功している (S. Kato *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e20230376)。本 HTS 手法は、安価なキチン粉末をクロマトグラフィー担体として用いて、人工金属酵素の指

向性進化を細胞夾雑物非存在下で実現する強力な手法である。以上のように、研究機関全体を通じて当初の予想を上回る大きな成果が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kato Shunsuke, Onoda Akira, Schwaneberg Ulrich, Hayashi Takashi	4. 巻 in press
2. 論文標題 Evolutionary Engineering of a Cp*Rh(III) Complex-Linked Artificial Metalloenzyme with a Chimeric β -Barrel Protein Scaffold	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacs.3c00581	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Hayashi Takashi, Kato Shunsuke	4. 巻 3
2. 論文標題 Engineering of hemoproteins	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Comprehensive Inorganic Chemistry III	6. 最初と最後の頁 215 ~ 230
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/B978-0-12-823144-9.00142-4	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 Kato Shunsuke, Takeuchi Koki, Iwaki Motonao, Miyazaki Kentaro, Honda Kohsuke, Hayashi Takashi	4. 巻 62
2. 論文標題 Chitin and Streptavidin Mediated Affinity Purification Systems: A Screening Platform for Enzyme Discovery	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 e20230376
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/anie.202303764	査読の有無 無
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19件（うち招待講演 5件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 加藤 俊介、竹内 康基、林 高史
2. 発表標題 キチン粉末を利用したアフィニティー精製手法の開発：シクロプロパン化反応を触媒する微生物酵素の探索への応用
3. 学会等名 第49回生体分子科学討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shunsuke Kato
2. 発表標題 Evolutionary Engineering of Artificial Metalloenzymes for Abiotic Transformations
3. 学会等名 SPEED x Bottom-up Biotech x ELSI joint workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shunsuke Kato
2. 発表標題 Directed Evolution of a Rh(III)-Linked Artificial Metalloenzyme for C-H Bond Functionalization
3. 学会等名 Gordon Research Conference -Expanding the boundaries of Protein Engineering- (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shunsuke Kato
2. 発表標題 In vitro High-Throughput Screening Platforms for Protein Engineering and Enzyme Discovery
3. 学会等名 Vortrag im Rahmen des Organisch-Chemischen IOCB-Kolloquiums (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤 俊介、林 高史
2. 発表標題 キチン粉末を利用したタンパク質精製手法の開発: 非天然化学反応を指向した酵素探索への応用
3. 学会等名 生物無機化学シンポジウム
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 加藤 俊介
2. 発表標題 有機触媒反応から学ぶ光駆動型ラジカル酵素の創製
3. 学会等名 学術変革領域(A) 予知生成科学 第3回公開シンポジウム
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Shunsuke Kato
2. 発表標題 In vitro High-throughput Screening of Hemoprotein Library for Stereodivergent Synthesis of 1,2-Disubstituted Cyclopropanes
3. 学会等名 1st Unified Catalysis Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 加藤 俊介
2. 発表標題 非天然化学反応を指向した微生物酵素の探索と遺伝子工学的改変
3. 学会等名 日本農芸化学会2004年度大会 大会シンポジウム「物質生産技術の革新を目指した予知生成科学」(招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 加藤 俊介
2. 発表標題 多糖高分子を利用したタンパク質精製手法の開発：非天然化学反応を指向した酵素探索への応用
3. 学会等名 日本薬学会第144年会 一般シンポジウム「化学の力で拓く革新的タンパク質研究」(招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 加藤俊介、小野田晃、Ulrich Schwaneberg、林高史
2. 発表標題 キメラ型バレルタンパク質を基盤とするロジウム含有金属酵素の指向性進化：芳香族C-H結合官能基化反応への応用
3. 学会等名 第48回生体分子科学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹内康基、加藤俊介、林高史
2. 発表標題 アフィニティ精製手法を活用したハイスループットスクリーニング系の構築と鉄コロール錯体を導入したミオグロビンの指向性進化への応用
3. 学会等名 第34回生物無機化学夏季セミナー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤俊介、林高史
2. 発表標題 キチン粉末を利用したアフィニティー精製手法の開発：非天然化学反応を触媒する微生物酵素の探索への応用
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹内康基、加藤俊介、林高史
2. 発表標題 Directed Evolution of an Artificial Metalloenzyme Containing an Iron Corrole Complex Using a High-throughput Screening Platform Based on an Affinity Purification System
3. 学会等名 錯体化学会第72回討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤俊介、小野田晃、Ulrich Schwaneberg、林高史
2. 発表標題 Evolutionary Engineering of a Rh(III)-linked Artificial Metalloenzyme for Isoquinoline Synthesis via C(sp ²)-H Bond Activation
3. 学会等名 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹内康基、加藤俊介、林高史
2. 発表標題 Directed Evolution of Myoglobin Reconstituted with an Iron Corrole Complex Base on a Screening Platform Based on an Affinity Purification System
3. 学会等名 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹内康基、加藤俊介、林高史
2. 発表標題 Directed Evolution of Myoglobin Reconstituted with an Iron Corrole Complex: Development of Artificial Peroxidase with Enhanced Catalytic Activity
3. 学会等名 第103回日本化学会春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部美笛、加藤俊介、林高史
2. 発表標題 ミオグロビンを利用した人工金属酵素の開発：アルドキシム脱水反応によるニトリル合成
3. 学会等名 第103回日本化学会春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤俊介、小野田晃、Ulrich Schwaneberg、林高史
2. 発表標題 Cp*Rh(III)錯体を活性中心に有する人工金属酵素の指向性進化：芳香族C-H結合活性化を經由する付加環化反応への応用
3. 学会等名 第30回金属の関与する生体関連反応シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤俊介、小野田晃、Ulrich Schwaneberg、林高史
2. 発表標題 キメラ型 η -パレルタンパク質を基盤とするロジウム含有人工金属酵素の指向性進化：芳香族 C-H 結合官能基化反応への応用
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 加藤 俊介、林 高史	4. 発行年 2024年
2. 出版社 バイオインダストリー協会	5. 総ページ数 2
3. 書名 バイオサイエンスとインダストリー	

1. 著者名 加藤俊介	4. 発行年 2023年
2. 出版社 株式会社 化学同人	5. 総ページ数 2
3. 書名 化学「2023年の化学 注目の論文」酵素で光り輝く有機合成	

1. 著者名 加藤俊介、林高史	4. 発行年 2021年
2. 出版社 アグネ技術センター	5. 総ページ数 9
3. 書名 金属 特集「金属の生体機能 最近の話題から 」 代表的な鉄含有タンパク質の構造と生体機能	

1. 著者名 加藤俊介、林高史	4. 発行年 2021年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 10
3. 書名 水中有機合成の開発動向 第 23 章 水中で触媒する人工金属酵素	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>指向性進化法を駆使した人工金属酵素の創製 http://www.cfi.eng.osaka-u.ac.jp/seeds/seeds_list_1/kato_shunsuke_assist/</p> <p>自然界にない化学反応を実現する人工酵素の開発 https://miraibook.jp/researcher/sa23009</p>

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------

ドイツ	RWTH Aachen University	Bielefeld University		
-----	------------------------	----------------------	--	--