OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Affinity Purification Systems for Evolutionary Engineering of Artificial Metalloenzymes and in vitro Screening of Bacterial Heme Enzymes
Author(s)	竹内, 康基
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/106997
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　　名	（竹内　康基）
論文題名	Affinity Purification Systems for Evolutionary Engineering of Artificial Metalloenzymes and *in vitro* Screening of Bacterial Heme Enzymes (人工金属酵素の進化工学的改変と微生物由来ヘム酵素の探索を指向したタンパク質アフィニティ精製手法の開発)

論文内容の要旨

昨今の著しいバイオテクノロジー分野の技術発展に伴い、酵素や微生物などの生体触媒を用いた物質生産が注目を集めている。そのような背景のもと、新規の触媒活性や高い選択性を有する酵素の開発は、生体触媒の実用性や有用性を向上させる有効な手段の一つとなっている。

代表的な酵素開発のアプローチとして、一つの特定の酵素に焦点をあてて遺伝子工学的改変を行う指向性進化法に基づく酵素工学的アプローチや、膨大な数の天然酵素の中から目的の触媒活性を有するものを選抜するゲノムマイニングに基づく酵素探索的アプローチが挙げられる。一つ目のアプローチでは、テンプレートとなる酵素の遺伝子にランダム変異導入を行うことで得られる数千から数万種類以上の変異体ライブラリのスクリーニングを行う。この「ランダム変異導入による多様性の創出とスクリーニングによる取捨選択」の流れを繰り返し行うことで、触媒活性を目的に応じて系統的に向上させた酵素を開発することが可能となる。二つ目のアプローチでは、天然酵素のDNA配列情報を解析して、未知の生化学反応を触媒する酵素や目的の反応に対して高い触媒活性を示す新規酵素を見出すことが可能である。このように両アプローチは酵素開発において有用な手段となっているが、どちらにおいても高効率かつ高精度な酵素スクリーニング手法が必要となる。

このような酵素スクリーニングにおいては、精製した酵素サンプルを用いる*in vitro*条件下でのスクリーニング系を使用して、反応条件を正確に設定することができ、信頼度の高い結果が得られる点で有用である。しかしながら、膨大な量の酵素を精製する必要があり、それにかかる時間やコスト、労力をどのようにして低減するかが問題となっている。例えば、イオン交換やサイズ排除カラムクロマトグラフィでは、タンパク質精製に要する時間や労力が問題となり、一方で既存のアフィニティ精製手法では、高価なカラム担体を用いる必要からコストが大きくなるという点で大規模なスクリーニングには適用しにくいのが現状である。そこで、本研究では、低コストかつ使い捨て可能なカラム担体を用いた簡便なアフィニティ精製手法の開発に着手した。そして、それら手法の応用として、人工金属酵素の指向性進化およびタンパク質データベースを活用した酵素探索を実施した。

第1章では、マルトース結合タンパク質（MBP）タグとスターチーアガロース（SA）樹脂を活用した精製手法によるスクリーニング系の構築を行った。さらに確立したスクリーニング系を用いて、鉄コロール錯体を導入したミオグロビンの指向性進化を実施した。合計三世代に渡る指向性進化の結果、野生型の人工金属酵素と比較して6.4倍のk_{cat}/K_M値を示す変異体L89F/H97F/I107Fを獲得した。

第2章では、キチン粉末をカラム担体として活用した*Strep*-tag IIを有するタンパク質のアフィニティ精製手法を開発した。キチン粉末に結合するキチン結合ドメインと*Strep*-tag IIに結合するストレプトアビジン変異体をリンカーで接続した融合タンパク質ChSavを調製し、キチン粉末と組み合わせることで、安価かつ簡便なアフィニティ精製手法（CSAP system）を確立した。さらに、本手法をスクリーニング系へ応用し、スチレンのシクロプロパン化反応を触媒するヘムタンパク質の探索を行った。96種類のヘムタンパク質をスクリーニングした結果、(*S*,*S*)体シクロプロパンと(*S*,*R*)体シクロプロパンをそれぞれ立体特異的に合成可能なSnVHbとSrTrHbと呼ばれる2種類のグロビンフォールドを有するヘムタンパク質を見出した。

第3章では、スチレンのシクロプロパン化反応において、残る2つの生成物(*R*,*R*)体と(*R*,*S*)体を合成可能なグロビンタンパク質を見出すべく、微生物ゲノム配列のデータベース探索戦略と実際に精製条件下で酵素反応を行う*in vitro*スクリーニングを掛け合わせた酵素探索を行った。配列相同性検索とクラスタリング解析を用いたデータベース上での目的酵素の絞り込みと、CSAP systemを用いたスクリーニング系による触媒活性評価を行い、(*R*,*R*)体と(*R*,*S*)体をそれぞれ立体特異的に合成可能な2種類のグロビンタンパク質PcaTrHbとMgGCSを見出した。

以上、確立したアフィニティ精製手法を含むスクリーニング系は、本研究において対象とした酵素以外にも広く適用可能であり、本手法を駆使することにより、新規反応性を有する酵素の更なる獲得が大いに期待される。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（　竹内康基　）		
	（職）	氏　名	
論文審査担当者	主査	教授	林　高史
	副査	教授	南方　聖司
	副査	教授	古川　森也
	副査	教授	櫻井　英博
	副査	教授	宇山　浩
	副査	教授	佐伯　昭紀
	副査	教授	中山　健一
	副査	教授	藤内　謙光
	副査	教授	古澤　孝弘　（産業科学研究所）
	副査	教授	能木　雅也　（産業科学研究所）

論文審査の結果の要旨

昨今の著しいバイオテクノロジー分野の技術発展に伴い、酵素や微生物などの生体触媒を用いた物質生産が注目を集めている。この背景のもと、新規の触媒活性や高い選択性を有する酵素の開発は、生体触媒の実用性や有用性を向上させる有効な手段の一つとなっている。本博士論文では、代表的な酵素開発のアプローチである、一つの特定の酵素に焦点をあてて遺伝子工学的改変を行う指向性進化法に基づく酵素工学的アプローチおよび膨大な数の天然酵素の中から目的の触媒活性を有するものを選抜するゲノムマイニングに基づく酵素探索的アプローチを駆使し、新規の触媒活性や高い選択性を有するヘムタンパク質を開発している。加えて、上記酵素開発アプローチを実現するための低コストかつ使い捨て可能なカラム担体を用いた簡便なアフィニティ精製手法の開発に着手している。そして、これらの成果について以下のように記載している。

第 1 章では、マルトース結合タンパク質（MBP）タグとスターチーアガロース（SA）樹脂を活用したアフィニティ精製手法によるスクリーニング系を構築し、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と応用した結果について記述している。計三世代にわたる指向性進化の結果、過酸化水素を基質とした ABTS およびグライアコールの一電子酸化反応に対して k_{cat}/K_M 値が 6.4 倍および 3.7 倍にそれぞれ向上した変異体 L89F/H97F/I107F を獲得している。このように、第 1 章では、ヘムタンパク質を用いた人工金属酵素の指向性進化を実現するスクリーニング系を開発し、網羅的な改変による導入したポルフィリン類縁体の周辺アミノ酸環境を最適化することが触媒活性の向上に寄与する有意義な知見を示している。本結果は、ミオグロビンのヘムポケットを非天然金属錯体に対して改変する新規の変異体設計指針を与える興味深い内容である。

第 2 章では、キチン粉末をカラム担体として活用した *Strep*-tag II を有するタンパク質のアフィニティ精製手法を開発している。キチン粉末に結合するキチン結合ドメインと *Strep*-tag II に結合するストレプトアビジン変異体をリンカーで接続した融合タンパク質 ChSav を調製し、キチン粉末と組み合わせることで、安価かつ簡便なアフィニティ精製手法（CSAP system）を確立している。さらに、本手法をスクリーニング系へ応用し、スチレンとジアゾ酢酸エチルのシクロプロパン化反応を触媒するヘムタンパク質の探索を行っている。96 種類のヘムタンパク質をスクリーニングした結果、(*S*,*S*)体および(*S*,*R*)体シクロプロパンをそれぞれ立体特異的に合成可能な SnVHb と SrTrHb と呼ばれるグロビンフォールドを有する 2 種類のヘムタンパク質を見出している。本結果は、確立したスクリーニング系が、非天然反応を触媒する新規酵素を見出す手法への応用に対して非常に有用であることを示している。

第 3 章では、先述のシクロプロパン化反応において、残る 2 つの生成物(*R*,*R*)体と(*R*,*S*)体を合成可能なグロビンタンパク質を見出すべく、微生物ゲノム配列のデータベース探索戦略と実際に精製条件下で酵素反応を行う *in vitro* ス

クリーニングを掛け合わせた酵素探索を実施している。配列相同性検索と主成分分析によるクラスタリング解析を用いたデータベース上での目的酵素の絞り込みと、CSAP system を用いたスクリーニング系による触媒活性評価を行い、(*R*,*R*)体と(*R*,*S*)体をそれぞれ立体特異的に合成可能な 2 種類のグロビンタンパク質 PcaTrHb と MgGCS を見出している。本章では、主成分分析を活用した酵素データベース探索が、網羅的な変異導入による進化工学的改変と比較して広範な配列空間から目的の反応を触媒する最適酵素を発見できること、および非天然反応を触媒する酵素の探索にも適用可能な興味深い結果を示している。

以上のように、本博士論文では、確立した 2 種類のアフィニティ精製手法がそれぞれ、遺伝子工学的改変を行う指向性進化法に基づく酵素工学的タンパク質開発および膨大な数の天然ヘムタンパク質の中から目的の触媒活性を有するものを選抜する酵素探索的タンパク質開発に極めて有用であることを実証している。さらに、実際に、一電子酸化反応に対して k_{cat}/K_M 値が最大 6.4 倍に向上した鉄コロール錯体含有再構成ミオグロビン変異体 L89F/H97F/I107F の開発およびスチレンのシクロプロパン化反応において立体異性体を作り分け可能な 4 種類のグロビンタンパク質の同定に成功している。本研究成果は、本論文で対象とした酵素以外にも広く適用可能であり、本手法を駆使することにより、新規反応性を有する酵素のさらなる獲得が大いに期待される。よって本論文は博士論文として十分な価値あるものと認める。