



Title	Cp*Rh(III)-incorporated Artificial Metalloenzymes : Synthesis of a Functionalized Metal Cofactor and Evolutionary Engineering of a β -Barrel Protein Scaffold
Author(s)	加藤, 俊介
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/82211
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (加 藤 俊 介)	
論文題名	Cp*Rh(III)-incorporated Artificial Metalloenzymes: Synthesis of a Functionalized Metal Cofactor and Evolutionary Engineering of a β -Barrel Protein Scaffold (Cp*Rh(III) 含有人工金属酵素： 機能性金属補因子の合成と β -バレルタンパク質反応場の進化工学的改変)
論文内容の要旨	
昨今のバイオテクノロジーの著しい発展に伴い、酵素を利用した物質変換が注目される中、その有用性を生体反応だけでなく、非天然の化学反応にまで拡張する試みが、近年、精力的に行われている。その試みの一つに、非天然の合成金属錯体を活性中心に有する「人工金属酵素」の開発が挙げられる。非天然の合成金属錯体を補因子としてタンパク質反応場へ導入し、更にこのタンパク質反応場を遺伝子工学的手法により改変することで、人工金属酵素は、非生物学的な化学反応において優れた触媒活性を発揮する。本博士論文では特に、Cp*Rh(III) 錯体を活性中心に有する人工金属酵素の開発と、指向性進化法に基づくタンパク質反応場の改変について論述する。 第一章では、芳香族 C-H 結合官能基化反応に対して触媒活性を示す Cp*Rh(III) 含有人工金属酵素の開発に着手した。Cp*Rh(III) 錯体は、その高い求電子性ゆえに、タンパク質中の求核性アミノ酸残基や、宿主細胞中の求核剤と、非特異的に錯形成し失活する。第一章では、このような非特異的な錯形成を抑制することを目的として、ジチオホスフェート配位子を用いた Cp*Rh(III) 錯体の新規保護手法を開発した。そして、この保護手法を活用し、マレイミド基を有する Cp*Rh(III) 錯体を、β-バレルタンパク質ニトロバインディン (NB) の疎水的空孔内に固定化することで、Cp*Rh(III) 含有人工金属酵素を構築した。得られた人工金属酵素は、芳香族 C-H 結合活性化を経由するオキシムとアルキンの付加環化反応において触媒活性を示すことが明らかとなった。 第二章では、Cp*Rh(III) 含有人工金属酵素を細胞表面に提示するホールセル触媒の構築を行った。第一章で確立した Cp*Rh(III) 錯体の保護手法により、細胞夾雑物との非特異的な錯形成は抑制され、大腸菌細胞表面上に提示した NB に対して Cp*Rh(III) 錯体を固定化することが可能となった。調製したホールセル触媒は、オキシムとアルキンの付加環化反応において触媒活性を示し、また、NB の疎水的空孔内にグルタミン酸残基を変異導入することで、その触媒活性が 2.1 倍に向上することが判明した。 第三章では、MBP タグを活用した新規ハイスループットスクリーニング (HTS) 手法を確立し、Cp*Rh(III) 含有人工金属酵素の指向性進化を実施した。この HTS 手法は、MBP タグを用いたアフィニティー精製の段階を含み、より精度の高い細胞夾雑物非存在下での人工金属酵素の活性評価が可能となった。さらに、この HTS 手法を用いて実際に、Cp*Rh(III) 含有人工金属酵素の指向性進化を実施した。その結果得られた人工金属酵素変異体は、オキシムとアルキンの付加環化反応に対して高い触媒活性を発揮し、変異導入前と比較して、8.5 倍の触媒効率を示すことが判明した。MBP タグ融合発現の汎用性と、スクリーニングコストを含めた実用性から、今後、本手法が様々な人工金属酵素の指向性進化に幅広く使用されることが期待される。 第四章では、Cp*Rh(III) 含有人工金属酵素の活性向上をめざし、脂肪酸結合タンパク質の α-ヘリックスドメインを、NB の部分構造へと導入したキメラタンパク質反応場の開発を行った。脂肪酸結合タンパク質と NB の β-バレル構造の相同性を考慮し、接合部位のアミノ酸配列を指向性進化法に基づき最適化することで、安定な構造を有するキメラタンパク質反応場を創出することに成功した。また、このキメラタンパク質反応場の疎水的空孔内部を、さらに指向性進化法により最適化することで、Cp*Rh(III) 含有人工金属酵素の触媒反応効率が、40 倍以上に向上することが判明した。 以上、本博士論文では、Cp*Rh(III) 錯体を活性中心に有する人工金属酵素を構築し、そのタンパク質反応場を、遺伝子工学的手法、特に指向性進化法により最適化することで、芳香族 C-H 結合活性化を経由するオキシムとアルキンの付加環化反応における触媒活性を向上させることに成功した。本研究において確立した研究手法は、今後、様々な合成金属錯体、タンパク質反応場を有する人工金属酵素の指向性進化へと応用され、酵素反応の有用性を大きく拡張することが期待される。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (加 藤 俊 介)		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査	教授 林 高史
	副 査	教授 桑畑 進
	副 査	教授 櫻井 英博
	副 査	教授 南方 聖司
	副 査	教授 今中 信人
	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 能木 雅也
	副 査	教授 古澤 孝弘
論文審査の結果の要旨		
近年の著しいバイオテクノロジーの発展に伴い、酵素を利用した物質変換が注目される中、その有用性を生体反応だけでなく、非天然の化学反応にまで拡張する試みが、近年、精力的に行われている。その試みの一つに、非天然の合成金属錯体を活性中心に有する「人工金属酵素」の開発が挙げられる。本博士論文では特に、芳香族 C-H 結合官能基化反応に対して触媒活性を示す $\text{Cp}^*\text{Rh(III)}$ 錯体に着目し、β-バレルタンパク質反応場を基盤とした $\text{Cp}^*\text{Rh(III)}$ 含有人工金属酵素の開発と、指向性進化法に基づくタンパク質反応場の改変について論述している。 第一章では、新規 $\text{Cp}^*\text{Rh(III)}$-ジチオホスフェート錯体を用いた $\text{Cp}^*\text{Rh(III)}$ 含有人工金属酵素の構築と、芳香族 C-H 結合官能基化反応における触媒活性の評価を実施している。$\text{Cp}^*\text{Rh(III)}$ 錯体は、本来その高い反応性ゆえに、タンパク質中の求核性アミノ酸残基や、宿主細胞中の求核剤と、非特異的に錯形成し失活することが知られている。第一章では、このような非特異的な錯形成をともなった失活を抑制することを目的として、ジチオホスフェート配位子を用いた $\text{Cp}^*\text{Rh(III)}$ 錯体の新規保護手法の開発を報告している。そして、この保護手法を活用し、マレイミド基を有する $\text{Cp}^*\text{Rh(III)}$-ジチオホスフェート錯体を、$\beta$-バレルタンパク質ニトロバインディン (NB) の疎水的空孔内に固定化することで、$\text{Cp}^*\text{Rh(III)}$ 含有人工金属酵素の構築を示している。更に、得られた人工金属酵素は、芳香族 C-H 結合活性化を経由するオキシムとアルキンの付加環化反応において触媒活性を示すことを明らかにしている。本結果より、ジチオホスフェート配位子を用いた高反応性金属錯体の保護手法が、人工金属酵素の構築において有用であることを本学位申請者は実証している。 第二章では、第一章で確立した $\text{Cp}^*\text{Rh(III)}$ 錯体の保護手法を活用し、$\text{Cp}^*\text{Rh(III)}$ 含有人工金属酵素を細胞表面に提示するホールセル触媒の構築と、その触媒活性評価を実施している。人工金属酵素を含むホールセル触媒を構築する上で問題となるのは、細胞環境下における合成金属錯体の非特異的な失活である。そこで、本学位申請者は、ジチオホスフェート配位子を用いた保護手法により、細胞環境下に $\text{Cp}^*\text{Rh(III)}$ 錯体の失活を抑制し、大腸菌細胞表面上に提示した NB に対して $\text{Cp}^*\text{Rh(III)}$ 錯体を固定化することを実現している。調製したホールセル触媒は、オキシムとアルキンの付加環化反応において触媒活性を示し、また、NB の疎水的空孔内にグルタミン酸残基を変異導入することで、その触媒活性が 2.1 倍に向上することを明らかにしている。本結果より、ジチオホスフェート配位子を用いた金属錯体の保護手法が、人工金属酵素を含むホールセル触媒の構築において有効な手段となることを明確に提案している。 第三章では、第一章で構築した $\text{Cp}^*\text{Rh(III)}$ 含有人工金属酵素の触媒活性の向上をめざし、指向性進化法によるタン		

タンパク質反応場の改変の実施を紹介している。その過程で確立された新規ハイスループットスクリーニング (HTS) 手法は、MBP タグを用いたアフィニティー精製の段階を含み、より精度の高い細胞夾雑物非存在下での人工金属酵素の活性評価を実現している。さらに、この新規 HTS 手法を用いて実際に、 $\text{Cp}^*\text{Rh(III)}$ 含有人工金属酵素の指向性進化を実施し、オキシムとアルキンの付加環化反応にける人工金属酵素の触媒反応効率を 8.5 倍に向上させることに成功している。本結果より、今回提案している HTS 手法を用いた人工金属酵素の指向性進化は、非天然合成金属錯体の触媒活性を向上させる有効な手段となることを本学位申請者は論じている。さらに、本章で紹介されている MBP タグ融合発現の汎用性とスクリーニングコストを含めた実用性は、今後この HTS 手法が様々な人工金属酵素の指向性進化に幅広く使用されることが期待される。

第四章では、第三章で獲得した $\text{Cp}^*\text{Rh(III)}$ 含有人工金属酵素の更なる触媒活性の向上をめざし、タンパク質反応場の再設計を紹介している。具体的に本学位申請者は、脂肪酸結合タンパク質の α -ヘリックスドメインを、NB の β -バレル構造へと導入したキメラタンパク質反応場の構築し、 $\text{Cp}^*\text{Rh(III)}$ 錯体近傍の配位圏の最適化を行っている。さらに脂肪酸結合タンパク質と NB の β -バレル構造の相同性を考慮し、接合部位のアミノ酸配列を指向性進化法に基づき最適化することで、安定な構造を有するキメラタンパク質反応場の創出に成功している。また、このキメラタンパク質反応場の疎水的空孔内部を、更に指向性進化法により最適化することで、 $\text{Cp}^*\text{Rh(III)}$ 含有人工金属酵素の触媒反応効率が、40 倍以上に向上することを明らかにしている。本結果より、キメラタンパク質反応場の構築と、指向性進化法に基づく配位圏の最適化が、人工金属酵素の触媒活性を向上させる強力な手段となることが明確に示されている。

以上のように、本博士論文では、 $\text{Cp}^*\text{Rh(III)}$ 錯体を活性中心に有する人工金属酵素を構築し、そのタンパク質反応場を、遺伝子工学的手法、特に指向性進化法により最適化することで、芳香族 C-H 結合活性化を経由するオキシムとアルキンの付加環化反応における触媒活性の向上に成功している。本研究において確立された研究手法は、今後、様々な合成金属錯体、タンパク質反応場を有する人工金属酵素の指向性進化法へと応用され、酵素反応の有用性を大きく拡張することが期待される。よって本学位申請者が執筆した上述の四章からなる論文は博士論文として十分に価値あるものと認められた。