研 究 終 了 報 告 書

「人工金属酵素による細胞内触媒反応系の開発」

研究期間: 2019 年 10 月～2022 年 3 月
研 究 者: 岡本　泰典

1. 研究のねらい

幾つもの生体内の化学反応ネットワークが繋がり、細胞機能は発現する。 一つ一つの生体内化学反応を触媒する酵素の量や活性の変化によって、細胞機能は調節されている。 この生体内の化学反応ネットワークを人為的に再設計し、物質生産や医薬への応用をめざす合成生物学的研究が近年注目を集めている。 前者の例では、酵母や大腸菌などの微生物の代謝経路を設計し、有機合成化学的アプローチでは多段階の化学変換を必要とするような複雑な化合物を微生物内で一挙に合成してしまう方法論が開発されてきた。 また、後者の例としては、バイオマーカーを検知し、治療用分子を分泌する機能を持った哺乳類細胞が報告されている。

このような生体内化学反応ネットワークに非天然の化学変換反応を組み込むことができれば、天然に存在する酵素だけではアクセスできない高付加価値化合物の生産や新たな作用機序の医薬の開発へと繋がることが期待できる。

これまで本研究者は、金属錯体をタンパク質の内部空間へ導入することで構築される人工金属酵素の研究に従事してきた。 人工金属酵素では、金属錯体の触媒能にタンパク質由来の機能を付与することが可能であり、次の 3 点が一般的に挙げられることが多い付加機能である。 1) 水中での物質変換、 2) 反応速度の向上、 3) 反応選択性の付与である。 これらの特徴を有する様々な触媒反応が人工金属酵素で達成されてきた。 これらに加えて、もう一つの付加機能である「金属錯体への biocompatibility の付与」に着目して人工金属酵素の応用展開を開拓してきた。 多くの場合で、金属錯体と生体分子を同一の空間で使用する場合、それらの相互失活が問題となる。 しかし、金属錯体をタンパク質の内部空間へと導入し、人工金属酵素とすることで、金属錯体の機能と生体分子の機能の同時使用を可能としてきた。

本研究では、生体内化学反応ネットワークに摂動を与えうる人工金属酵素を組み込むことを念頭に、人工金属酵素による細胞内触媒反応系に挑むための技術基盤の確立をめざした。新たな人工金属酵素の開発するワークパッケージ 1 と簡便な人工金属酵素の調製を可能にするための細胞外膜小胞の技術基盤を確立するワークパッケージ 2 を並行して実施した。 ワークパッケージ 1 では、金属錯体触媒の開発および、この金属錯体を導入可能なホストタンパク質の探索を行った。 また、ワークパッケージ 2 では細胞膜小胞にホストタンパク質を内包することを念頭に、効率よく任意のタンパク質を内包する方法を検討した。

2. 研究成果

（1）概要
細胞内での利用を念頭に、新規な人工金属酵素の開発に取り組んだ。 本研究ではまず、人工金属酵素の補因子となり、細胞機能に摂動を与えうる合成触媒の開発から実施した。

反応としては、モノアミン系神経伝達物質の代謝に関わるモノアミンオキシダーゼ様の反応に注目し、常温、水中で含窒素化合物の酸化反応（脱水素化反応）を触媒する合成錯体を探索した。 有機金属錯体のスクリーニングから、可視光照射下においてのみ触媒活性を示す有機金属錯体$[Cp^*Ir(dppz)Cl]^+$を見出した。 詳細な反応解析から、$[Cp^*Ir(dppz)Cl]^+$の反応機構が従来の金属錯体による脱水素化反応よりもモノアミンオキシダーゼに近い反応機構であることが示唆された。 ここまでの成果を原著論文として報告した。 つづいて、人工金属酵素の構築に向け、ドッキングシミュレーションを実施し、$[Cp^*Ir(dppz)Cl]^+$を内包可能だと考えられるポケットを有するいくつかのタンパク質の発現系を構築した。 各種複合化条件(pH や塩強度など)を網羅的に検証した結果、$[Cp^*Ir(dppz)Cl]^+$の比が 1:1 となる条件とホストタンパク質を見出すに至った。現在、構造情報の取得に向け、結晶構造解析に挑んでいる。上記の新規な人工金属酵素の開発と並行して、簡便な人工金属酵素の調製を可能にするための細胞外膜小胞の技術基盤を確立に取り組んだ。 まずは細胞外膜小胞の表面と内部に異なる任意のタンパク質を発現させるシステムの構築を行った。目的タンパク質を大腸菌の膜タンパク質に融合させることで細胞外膜小胞の表面に、また別の目的タンパク質を大腸菌のペリプラズムに発現することで細胞外膜小胞の内部に導入することに成功した。 今後、細胞外膜小胞に立脚した人工金属酵素の構築へと展開する

（2）詳細

研究テーマ A「新規人工金属酵素の開発」

人工金属酵素の補因子となりうる合成触媒のターゲット反応として、ドーパミンやセレトニンなどの神経伝達物質に関連するモノアミンオキシダーゼ様のアミンの酸化反応に注目した。モノアミンオキシダーゼは基質適用範囲が限られており、その拡張に向けたタンパク質工学的研究が進められている。これに対して、常温、水中で駆動する合成触媒を開発することができれば、細胞内で変換可能な含窒素化合物のレパートリーが増大すると考えた。そこで、本研究では常温、水中(pH 7.4) で含窒素化合物の酸化反応（脱水素化反応）を触媒する合成錯体の探索を実施した。モノアミンオキシダーゼの活性検出のために開発された Turn-on 型の蛍光分子プローブを利用して、 イリジウムおよびロジウムを金属中心とする合成錯体のスクリーニングを実施した。(図 1a) しかし、用いた合成錯体の中で活性を示すものは得られなかった。当初、活性中間体として金属-ヒドリド種の形成を想定していた。イリジウム錯体を用いたギ酸からの水素発生を報告している先行研究によると、光照射によって金属-ヒドリド種が活性化され、反応が触媒的に進行することが報告されていた。そこで、光照射下で再度、スクリーニングを実施した。まず、光照射下でのスクリーニングのための反応装置を作製した。本装置ではテープ型 LED を光源として用い、テープ上の LED 一つ一つ(約 0.25 W)の上にガラスバイアルを設置した。また、反応温度を制御するため、ガラスバイアル中に温度センサーを設置した。本装置を用いて、合成錯体のスクリーニングを実施したところ、$[Cp^*Ir(dppz)Cl]^+$が活性を示すことがわかった。(図 1b) 反応を詳細に解析したところ、当初想定していた水素ではなく、過酸化水素が副生成物として生じていることがわかった。これは酸素が末端酸化剤として消費されている可能性を示唆している。そこで、嫌気条件下において酸素との反応を抑制したところ、反応中間体と考えられる金属錯体の UV-vis スペクトルが得られた。この反応中間体の NMR 解析から、含窒素環状化合物の脱水素化反応

は金属錯体の金属イオン上ではなく、配位子上で進行している可能性が示唆された。(図 1b) これらの結果は、[Cp*Ir(dppz)Cl]$^+$の反応機構が従来の金属錯体による水素を副生成物とする脱水素化反応よりもモノアミンオキシダーゼに近い反応機構であることを示唆している。

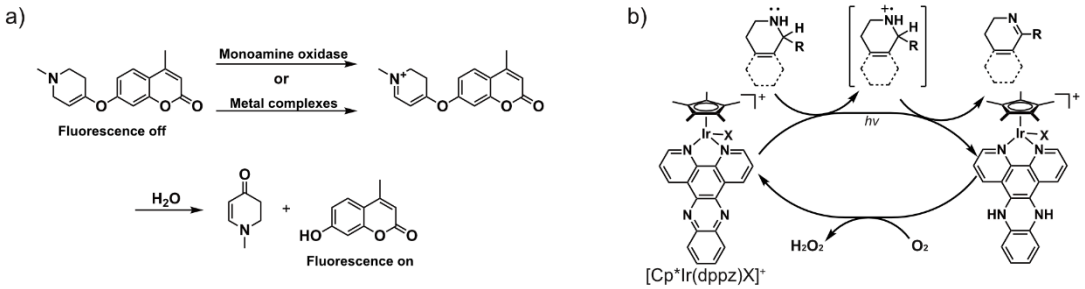

図 1. (a) 合成錯体のスクリーニングのための turn-on 型蛍光基質、(b) [Cp*Ir(dppz)Cl]$^+$による含窒素化合物の脱水素化の反応機構

上記のように見出した[Cp*Ir(dppz)Cl]$^+$を補因子とする人工金属酵素の構築にあたり、そのホストタンパク質の選定から行った。[Cp*Ir(dppz)Cl]$^+$を内包可能だと考えられるポケットを有するタンパク質を用いて、ドッキングシミュレーションを実施した(図 2)。 その中で、複合体の形成が示唆されたいくつかのタンパク質とその変異体を発現、精製した。 次に、これらのホストタンパク質に過剰量の[Cp*Ir(dppz)Cl]$^+$を加えて、透析や脱塩カラムを用いて遊離の[Cp*Ir(dppz)Cl]+を取り除いた。過剰量の[Cp*Ir(dppz)Cl]$^+$を取り除く手法による違いは見られないものの、用いる緩衝液の組成(pH や塩強度)によって、[Cp*Ir(dppz)Cl]+とホストタンパク質の比は大きく変化した。現在、1:1 の比率となる条件で調製したサンプルの構造情報を得るために結晶化を試みている。

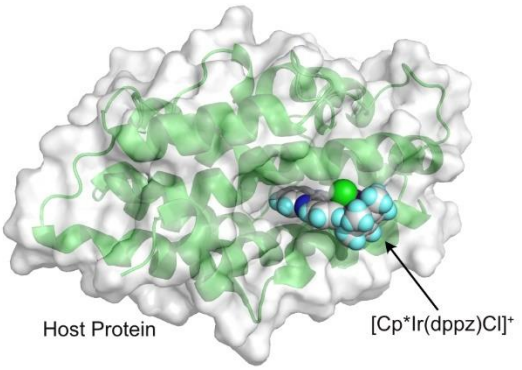

図 2. ドッキングシミュレーションと分子動力学計算から推定される[Cp*Ir(dppz)Cl]$^+$を内包する人工金属酵素

研究テーマ B「簡便な人工金属酵素の調製に向けた細胞外膜小胞の技術基盤を確立」
上記の新規な人工金属酵素の開発と並行して、簡便な人工金属酵素の調製を可能にするための細胞外膜小胞の技術基盤の確立に取り組んだ。
まずは細胞外膜小胞の内部に任意のタンパク質を発現させるシステムの構築を行った。先行研究で、目的とするタンパク質を大腸菌のペリプラズムに発現させることで細胞外膜小胞

に内包できることが示されている。 そこで、既報にならい、大腸菌のペリプラズムへの輸送を指示するシグナルペプチドを融合したストレプトアビジンの発現を検討した。培養液から大腸菌を遠心分離によって取り除き、上清を超遠心分離することでストレプトアビジンを内包したと考えられる細胞外膜小胞を得ることができた。この細胞外膜小胞をプロテアーゼによって処理したところ、ストレプトアビジンの分解は見られなかった。細胞外膜小胞は界面活性剤によって容易に崩壊する。そこで、界面活性剤を加えたところ、プロテアーゼによるストレプトアビジンの分解が見られた。(図 3) この結果は界面活性剤の非存在下では、プロテアーゼがストレプトアビジンにアクセスできず、分解が進行しないこと、つまり、ストレプトアビジンが細胞外膜小胞に内包されていることを示唆している。 また、別の目的タンパク質を大腸菌の膜タンパク質に融合させることで細胞外膜小胞の表面に導入することにも成功している。 これにより細胞外膜小胞のアフィニティ精製が可能となる。 これらの成果を基に、今後は細胞外膜小胞に立脚した人工金属酵素の構築へと展開する。

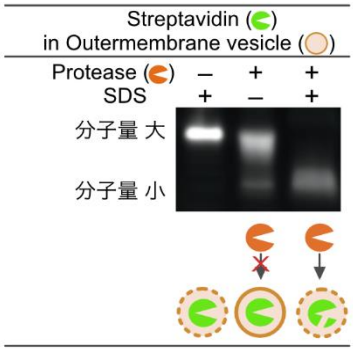

図 3. 細胞外膜小胞に内包されたストレプトアビジンのプロテアーゼによる分解

3. 今後の展開

本研究を通じて、細胞外膜小胞の機能化に関して、多くの知見を蓄えることができた。 今後はこれを基盤とし、細胞外膜小胞を利用した輸送システムの構築へと展開する。(目標 2 年程度)。 人工金属酵素については、結晶化を試み、詳細な構造情報を取得することめざす。その後に、確立した細胞外膜小胞に目的タンパク質を内包する方法を用いて、細胞外膜小胞内部での人工金属酵素の構築をねらう(目標 2 年程度)。 これらの技術を統合し、人工金属酵素による細胞機能の制御に繋げたい。

4. 自己評価

【研究目的の達成状況】テーマ A の人工金属酵素の新奇な補因子となりうる金属錯体を見出したことは評価に値すると考える。 この金属錯体が触媒する反応は、従来、有機溶媒中・高温下で進行するものであったが、それを常温、水中 (中性) で可能とする金属錯体の発見は合成化学的にも価値がある。 本成果は責任著者として論文にまとめた。 本論文は Highly Important Paper や Cover Feature に選定されただけでなく、優れた若手独立研究者による論文として本研究者のインタビュー記事も掲載された。 今後、この合成触媒のさらなる性能向上に向け、本研究で端緒を見出している人工金属酵素の研究を進めていく。

テーマ B の細胞外膜小胞の調製には超遠心分離機を利用する予定であったが、後に述べるように研究環境の変化があり、超遠心分離機の利用が困難となった。 そこで、より難易度の高い、細胞外膜小胞のアフィニティ精製法の確立に舵を切った。アフィニティ精製には、細胞外膜小胞の表面にタグタンパク質等を効率よく提示する必要がある。 ACT-X の年次報告会など

でたびたび総括をはじめとするアドバイザーの先生方がおっしゃっていた「研究者として将来的に取り組みたい研究の夢を描き、その芽となる研究に実際にチャレンジしていくことが大切です」の言葉に背中を押され、ACT-X の次のステップとして想定していた「細胞外膜小胞のアフィニティ精製法」を前倒しで実施した。 当初の計画より難易度が上がったため、論文などの目に見える成果には至っていないが、当初の計画では得られなかったであろう多くの知見を蓄えることができ、よりしっかりとした技術基盤の構築に成功した。 今後の展開への道筋は見出しており、引き続き、研究を進めることで 1-2 年のうちに論文として発表したいと考えている。
また、支援期間中に人工金属酵素の総説（Molecules, 招待論文）と細胞内触媒反応に関する著書（Methods in Molecular Biology)を責任著者として執筆でき、当該分野における本研究者のプレゼンスを高めることができた。

【研究体制】本研究者が独立研究者として東北大学に着任するとほぼ同時に ACT-X による支援を頂くことができた。 本研究者は単独で研究活動をしているため、当初の予定では、技術支援員を雇用する予定であった。 しかし、第 2 年度に入るタイミングで、計算機科学から神経科学といった様々な分野の研究者が居住する建物内に自身のオフィスと実験スペースが確保でき、学内の共有設備を主として研究を進めることとなった。 そのため、ACT-X の支援によって、共通機器にない設備を揃えることができ、大いに有効活用できたと考える。

【研究成果の波及効果】ACT-X では、これまでの延長的なテーマではなく、今後の研究の基盤となる技術の確立に 0 から挑んだ。 総括やアドバイザーの先生方の「夢を描くこと」「将来の土台を構築すること」の重要性を説く言葉で、将来を見据えて辛抱強く取り組むことができた。今後、この基盤をより強固なものとし、触媒化学のライフサイエンス分野への応用研究に取り組んでいきたい。 また、上述のように多様な分野の研究者と日常的に交流可能な研究環境に身を置いたこともあり、研究テーマ A、B を基にした他分野の研究者との共同研究へと発展させることもできている。

5. 主な研究成果リスト

（1） 代表的な論文（原著論文）発表

研究期間累積件数：1件

1. Holly Jane Davis, Daniel Häussinger, Thomas R Ward, and Yasunori Okamoto ‘A Visible-Light Promoted Amine Oxidation Catalyzed by a Cp* Ir Complex’ ChemCatChem 2020, 12, 4512-4516.
水中（中性 pH)・常温・常圧下という温和な反応条件下において、含窒素環状化合物の脱水素化を触媒する光駆動型金属錯体を見出した。この金属錯体は 150 を超える触媒回転数を示し、副生成物として過酸化水素が生じることがわかった。これらの結果は、本研究で見出した金属錯体の反応機構が従来の金属錯体による水素を副生成物とする脱水素化反応よりもモノアミンオキシダーゼに近い反応機構であることを示唆している。本論文は Highly Important Paper に選定され、Cover picture としてハイライトされている。

（2）特許出願

研究期間全出願件数：0 件（特許公開前のものも含む）

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

総説論文

Tomoki Himiyama, and Yasunori Okamoto “Artificial Metalloenzymes: from. Selective Chemical Transformations to Biochemical Applications” *Molecules* **2020**, *25*, 2989.

著書

Yasunori Okamoto, Ryosuke Kojima “Intracellular Catalysis Enabled by an Artificial Metalloenzyme” in *Methods in Molecular Biology*, **2021**, *2312*, 287–300., Springer.

国際的な学術誌でのインタビュー記事の掲載

ChemCatChem **2020**, *12*, 4501

招待講演

国際会議

Yasunori Okamoto “Photocatalytic amine oxidation catalyzed by Cp*Ir complex reminiscent of monoamine oxidase”

International Symposium on Bioorganometallic Chemistry（2021 年 6 月、オンライン）

国内会議

岡本 泰典 “人工金属酵素に立脚した Systems Catalysis への挑戦”

第 33 回 生物無機化学夏季セミナー（2021 年 8 月、オンライン）