

平成 31 年 4 月 1 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 773

氏名 岡本 泰典

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：バーゼル（国名：スイス国）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
酸化還元状態の制御を可能とする人工酵素を用いた細胞内触媒反応系の構築
3. 派遣期間：平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 31 日
4. 受入機関名及び部局名
バーゼル大学化学科

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

個々の生体内化学反応は連鎖的に繋がっており、細胞の生理機能を制御している。近年の合成生物学の飛躍的な進歩により、細胞内の生化学反応ネットワークのデザインが可能となってきた。一方で、扱える反応レパートリーは天然に存在する酵素が触媒するものに限られる。反応レパートリーの拡張をめざし、合成触媒による細胞内触媒反応の研究が注目を集め始めている。合成触媒による非天然の触媒反応を細胞内で実施可能となれば、微生物を利用した代謝工学による非天然物質の生産や、生体内での医薬のその場合合成に繋がることが期待できる。しかしながら、細胞内に導入可能な合成触媒は (i) 生体分子によって非毒されない、(ii) 生体内へと移行し留まるという 2 点を満たす必要がある。そのため、利用可能な合成触媒、なかでも多種多様な反応が開発されてきた有機金属触媒の細胞内での利用例は非常に限られている。本報告者はこの「細胞内非天然触媒反応」に「人工金属酵素」をコアテクノロジーとして挑んでいる。

人工酵素は「分子性触媒」に「特徴的な空間を提供する分子」を連結することで構築される。1970 年代の Tabushi, Breslow らのシクロデキストリン人工酵素を皮切りに、ケージ状分子、DNA、タンパク質を反応空間とする人工酵素が報告されてきた。(Ward, *et al. Comprehensive Supramolecular Chemistry II*, **2017**, 4, 459.) 金属錯体を有するタンパク質ベースの人工金属酵素の狙いは、タンパク質に由来する 3 つの特徴を金属錯体の触媒能に付加することである。それは、(i) 水中での物質変換 (金属錯体の水への可溶化)、(ii) 反応速度の向上 (水中での疎水性空間の提供)、(iii) 反応選択性 (キラル環境、立体障害の提供) である。これらの特徴を有する酸化反応、鈴木-宮浦カップリング反応、移動型水素添加反応、オレフィンメタセシスなどがタンパク質ベースの人工金属酵素で達成されてきた。(Ward, *et al. Chem. Rev.* **2018**, 118, 142.)

本報告者は、人工金属酵素の 4 つ目の特徴である「金属錯体への生体分子に対する堅牢性の付与」に注目し、人工金属酵素を用いることで、天然酵素のカスケード反応に有機金属触媒反応を統合することに成功してきた (Figure 1)。(ACS Catal. **2016**, 6, 3553, J. Am. Chem. Soc. **2016**, 138, 5781, Angew. Chem. Int. Ed., **2017**, 56, 10156.) 本研究では、これらを発展させ、夾雑環境下である細胞内での合成触媒反応系の確立に人工金属酵素を用いて挑んだ。海外特別研究員として採択されていた 2 年間では、

- (1) 人工金属酵素による細胞内触媒反応系の構築
- (2) 細胞内酸化還元状態の制御を可能とする触媒反応の開発、
- (3) 人工金属酵素の迅速な最適化法の開発

の三点を中心に進めてきた。(2)と(3)は論文発表前であるため、概要のみ記載する。(2)については約 60 種類の金属錯体をスクリーニングした結果、外部環境に応答した触媒反応を可能とする金属錯体を見出しており、現在、この金属錯体を有する人工金属酵素の構築に取り組んでいる。また、(3)については、人工金属酵素の迅速な調製法に繋がる新たなタンパク質の発現・精製の構築し、現在、その有用性について検討している。次頁より、(1)の成果について詳細を記載する。

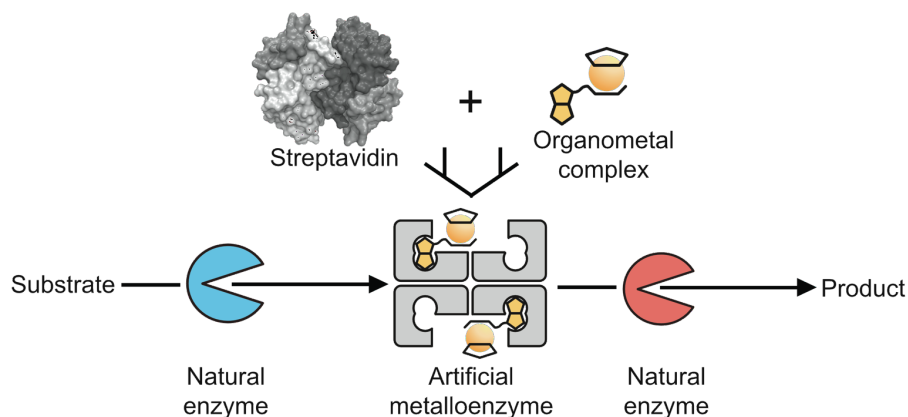


Figure 1. Schematic representation of an artificial metalloenzyme based on streptavidin-biotin technology and artificial/natural enzymatic cascade.

(1) 人工金属酵素による細胞内触媒反応系の構築 (*Nat. Commun.* **2018**, 9, 1943)

錯体触媒による細胞内触媒反応は、Chen, Meggers, Mascareñas, Winssinger, Sadler, Rotello, Bradley らが、Pd、Ru あるいは Au 錯体を用いた例を報告している (Ward *et al. Curr. Opin. Biotechnol.* **2018**, 53, 106)。しかし、上述のように細胞夾雑環境下においても失活しない堅牢性が錯体触媒に求められるため、これまでに開発されてきた錯体触媒の数に対して、細胞内に適用可能なものは限られている。さらに、これまでの細胞内触媒反応のアウトプットは細胞機能に対して直交的 (蛍光分子の turn-on)、あるいは細胞機能の喪失 (細胞死) であることが多く、金属錯体の触媒能を新たな機能として細胞に統合した例はほとんどない。そこで、生体分子に対して堅牢性を示す人工金属酵素を利用し、その触媒能を細胞の新たな機能として組み込むことを研究の目的とした。

本研究の申請段階では NAD(P)H の酸化反応を検討する予定であったが、それに先立ち、細胞内脱アリル化反応を検討した (Figure 2)。本反応で利用されるルテニウム錯体 **1** は種々の生体内分子に対して堅牢性を示すため、細胞内触媒反応の実験系の立ち上げに適していると考えた。本実験系の確立は、細胞内触媒反応による酸化還元状態の制御の研究に大きく役立つ。加えて、酸化還元反応と比べて、より”非天然”な要素の強い脱アリル化反応によって細胞機能を制御することができれば、高いレベルでの目標の達成にもなると考えた。そこで、本研究では、「人工金属酵素」を「合成生物学的な生体内化学反応ネットワークのデザイン」のための新たなツールとすべく、合成生物学的に設計した哺乳類細胞の機能を細胞内触媒反応で制御することとした。

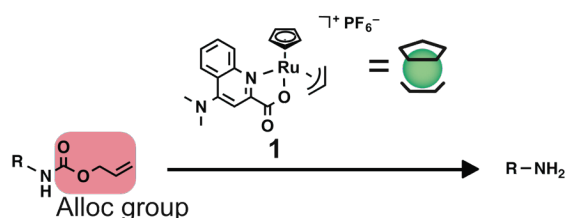


Figure 2. The ruthenium-catalyzed cleavage of *O*-allyl carbamate.

哺乳類細胞の合成生物学的な機能の設計および実験は Martin Fussenegger 教授 (スイス連邦工科大学チューリヒ校) の研究室に所属していた小嶋良輔博士の協力を得て実施した。特定の小分子 (ホルモン) を認識して、レポータータンパク質の発現を ON にする遺伝子スイッチを有する哺乳類細胞 (デザイナーセル) を複数構築した (Figure 3)。一方で、遺伝子スイッチを作動できないようにアミノ基を Alloc 基でケージしたホルモンを合成した。複数のデザイナーセルと対応するホルモン、ケージドホルモンの組み合わせの中から、トリヨードサイロニン (T₃) **9** (Figure 4b) のジーンスイッチが最も高いレスポンス (レポータータンパク質の発現がホルモンでは強く誘導されるのに対してケージドホルモンでは誘導されないこと) を示した (Fussenegger *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016** 113, 1244.)。そこで、このデザイナーセルを用いて細胞内触媒反応を検討することとした。

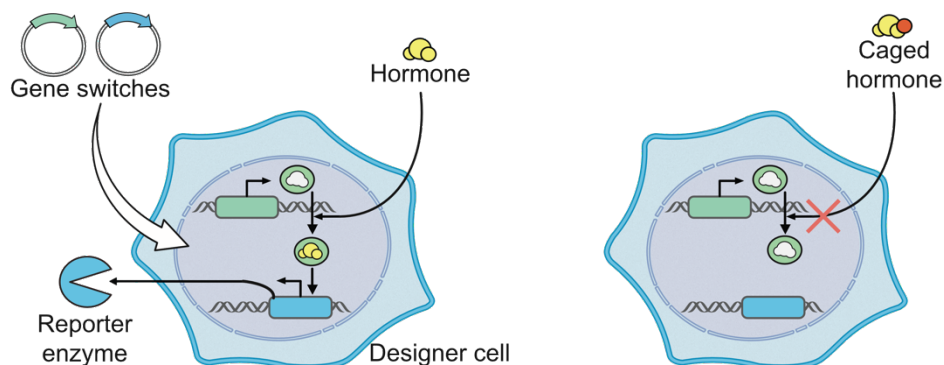


Figure 3. A schematic representation of a designer cell expressing an enzyme as a reporter upon addition of a small molecule turning on the gene switches.

続いて、ケージしたトリヨードサイロニン (AT₃ **8**) の脱アリル化反応を触媒する人工金属酵素 **5** をビオチン修飾ルテニウム錯体 (biot-Ru **2**) とストレプトアビジンから構築した (Figure 4a)。さらに、ストレプトアビジンの変異体のスクリーニングを実施し、人工金属酵素 **5** を AT₃ **8** の脱保護反応 (Figure 4b) に最適化した。

最適化した人工金属酵素に細胞透過性を付与するために、本研究ではアルギニンを含むモノマーユニットがジスルフィド結合で重合した細胞透過性ポリマー (cell-penetrating poly(disulfide), CPD) を利用した。この CPD は共同研究先である Stefan Matile 教授 (ジュネーブ大学) で開発されたものであり、他の細胞透過性ポリマーよりも低細胞毒性であることが確認されている (Matile *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 6069.)。本研究で金属錯体のホストタンパク質として利用しているストレプトアビジンは安定な 4 量体であり、ストレプトアビジン 1 分子は 4 分子のビオチンと強固な非共有結合を形成する。そのため、複数のビオチン修飾分子をストレプトアビジンに導入することが可能である。そこで、ビオチン修飾 CPD (biot-CPD **3**) と biot-Ru **2** を様々な比で導入し、細胞透過性人工金属酵素 **6** を構築した (Figure 4a)。

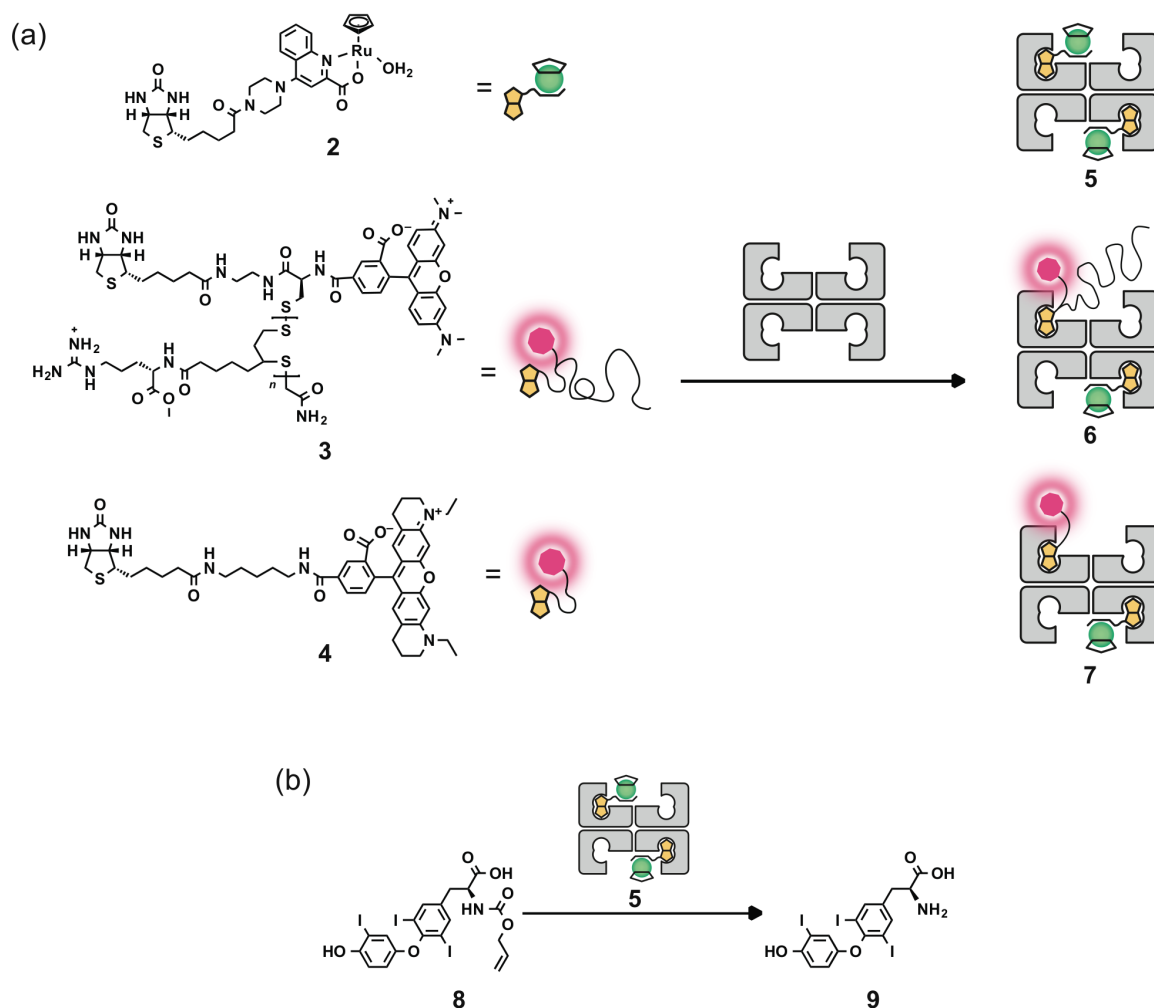


Figure 4. (a) Assembly of cell-penetrating artificial metalloenzymes for (b) the ruthenium catalyzing uncaging reaction.

調製した細胞透過性人工金属酵素をデザイナーセルの培養液に加えて一時間培養した。その後、培養液を三回交換して、細胞内に移行しなかった、あるいは細胞表面に吸着している人工金属酵素を取り除いた。本細胞内触媒反応の基質として、細胞透過性を向上させるために AT₃ **8** のカルボン酸をアセトキシメチル (AM) 基で保護した AMAT₃ **10** を用いた (Figure 5)。AM 基は細胞内へと移行すると内在性のエステラーゼによって速やかに加水分解される。この AMAT₃ **10** を人工金属酵素を導入したデザイナーセルの培養液に加えて、24 時間培養した。細胞内で人工金属酵素が活性を示せば、AT₃ **8** は T₃ **9** へと変換され、遺伝子スイッチが ON になり、レポータータンパク質であるルシフェラーゼの発現が誘導される (Figure 5)。

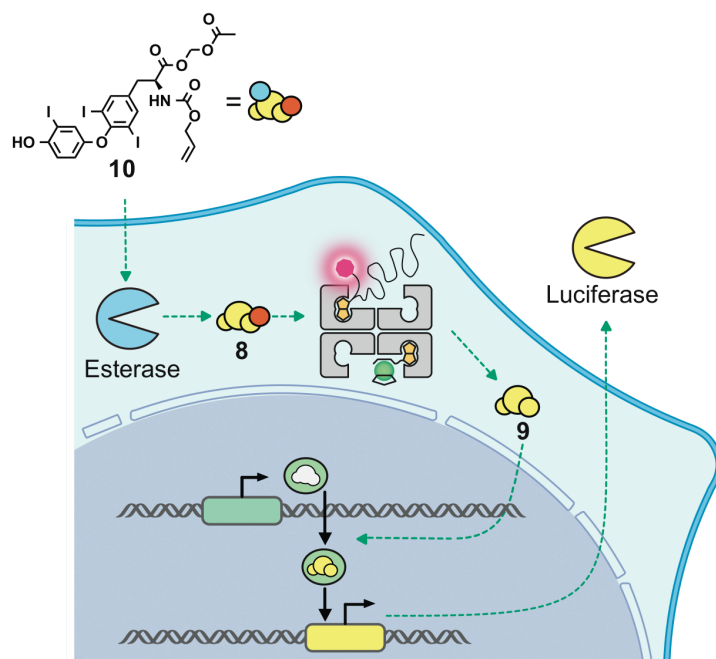


Figure 5. An intracellular reaction cascade including an abiotic reaction catalyzed by an artificial metalloenzyme to turn on a gene switch.

まず、人工金属酵素の細胞透過性を評価した。 蛍光分子 TAMRA をその部分構造に有する biot-CPD **3** を有する人工金属酵素 **6** と TAMRA と分光学的に類似したビオチン修飾 Atto565 (biot-Atto **4**) を修飾した人工金属酵素 **7** を比較検討した。 フローサイトメトリーの結果、Biot-CPD 修飾人工金属酵素 **6** は細胞内への移行が確認された。 一方で、細胞透過性モジュールを有さない人工金属酵素 **7** は細胞内へと移行することができなかった。 この結果より、人工金属酵素を用いて、その非天然反応を細胞内で実施するためには、人工金属酵素に細胞透過性を付与することが不可欠であることが明らかである。

続いて、人工金属酵素の細胞内での活性をレポータータンパク質であるルシフェラーゼの発現量から評価した。 人工金属酵素 **6** を細胞内へと導入したデザイナーセルではルシフェラーゼの発現が確認されたことから、細胞内で人工金属酵素 **6** による AT₃ **8** の脱アリル化が進行したことがわかる。 一方で、ルテニウム錯体 **1** のみでは、ルシフェラーゼの発現は確認できなかった。 これはルテニウム錯体 **1** が細胞内へと移行し留まることができないためであると推察できる。 また、本研究の条件下において、細胞内触媒反応の細胞毒性は確認されなかった。

以上のように、人工金属酵素を用いた細胞内触媒反応系の構築および細胞内触媒反応による細胞機能の制御という本研究の目標を達成することができた。 また、ここまでの成果を報告した論文 (*Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1943) は *Chemical and Engineering News* や *Chemistry World* でも紹介されており、本研究分野の注目度の高さを示している。