

はじめに

昨今の著しいバイオテクノロジー分野の発展に伴い、酵素や微生物を用いた物質変換手法(Biocatalysis)は、従来の化学合成プロセスを補完・代替する次世代の反応技術として注目を集めている。しかしながら、天然に由来する既存の酵素では、現在の有機合成化学で必要とされる物質変換の全てを代替できないこともまた事実である。現に、有機化学者がこれまでに発見したフラスコ内の有機化学反応と比較すると、天然の酵素が行う生体内の化学反応の種類は意外と少なく、ゆえにBiocatalysisにより実行可能な化学反応は一定の生体内反応のみに限定されてしまう。そこで我々は、これらBiocatalysisの有用性を非天然の物質変換へと拡張することをめざし、非生物学的な有機化学反応を触媒する酵素の開発に取り組んだ。

立体選択的カルベン転移反応を触媒する微生物酵素の探索

本研究では、まず初めに、非生物学的なカルベン転移反応に着目し、スチレン(1)のシクロプロパン化反応を触媒する微生物酵素の探索を実施した^{1,2}。これまでの先行研究で用いられてきた特定の酵素にとどまらず、データベース上の多種多様な微生物由来のヘム依存性酵素を網羅的に探索することで、目的のシクロプロパン化反応に対して有望な触媒活性を示す酵素の同定をめざした。96種類の微生物由来ヘム依存性酵素のスクリーニングの結果、グロビンフォールドを有する微生物由来のタンパク質(以降、グロビン)が、他のヘムタンパク質と比較して特に高い触媒活性と立体選択性を示すことが明らかとなった。例えば、硫黄酸化細菌 *Starkeya novella* 由来グロビン(SnVHb)は、非常に高い触媒活性($k_{cat}=4.9 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$, $K_M=3.4 \text{ mM}$)を示し、トランス異性体(*S,S*)-3を立体選択的(*trans*:*cis*=99:1, 99:1 e.r.)に与えた。この結果をうけ、次に本研究では、データベースに登録されているグロビンを対象に、主成分分析に基づくクラスター解析を実施し、配列情報の特徴に基づいてグロビンを2次元平面に可視化・分類したところ、それらがシクロプロパン化反応における立体選択性を反映することを明らかにした。そして、それらクラスター解析の結果に基づく系統的な酵素探索の結果、シクロプロパン化生成物のうち未獲得であったトランス異性体(*R,R*)-3とシス異性体(*S,R*)-4, (*R,S*)-4をそれぞれ立体選択的に与える酵素(PcaTrHb, SavTrHb, MgGCS)を同定することに成功した。これらの成果によって、分子の立体構造を厳密に制御しながら、シクロプロパン化反応で生じ得る4種類すべての立体異性体を選択的に作り分ける立体多様(stereodivergent)合成が可能となった(図1)。

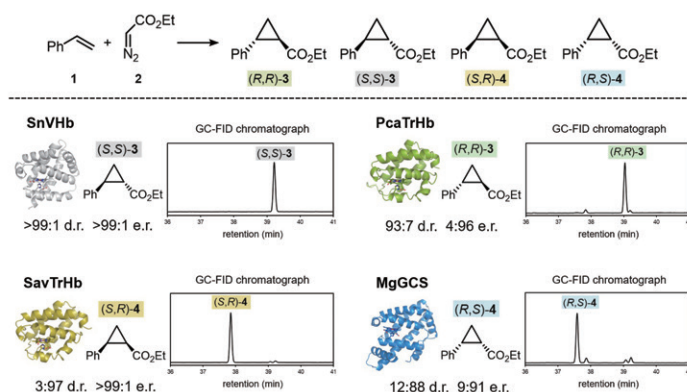


図1：微生物由来グロビンによるシクロプロパンの立体多様合成

非生物学的なラジカル反応を触媒する微生物酵素の探索

さらに本研究では、このデータベースからの酵素探索アプローチを活用し、カルベン転移反応以外の非生物学的な化学反応を触媒する酵素の開発も実施した。例えば、*N*-heterocyclic carbeneと呼ばれる有機触媒のラジカル反応機構に着想を得て、チアミンニリン酸とフラビンを用いた微生物酵素の探索を実施した³。その結果、好熱性放線菌 *Thermobispora bispora* 由来アセト乳酸合成酵素(TbALS)が、 α -ケト酸5をアシル源として用いた α -プロモエステル6や *N*-アシロキシフタルイミド8のラジカル的アシル化反応に対して有望な触媒活性を示すことを見出した(図2)。特にこのTbALSは、不安定なラジカル種(例えば、1~2級炭素

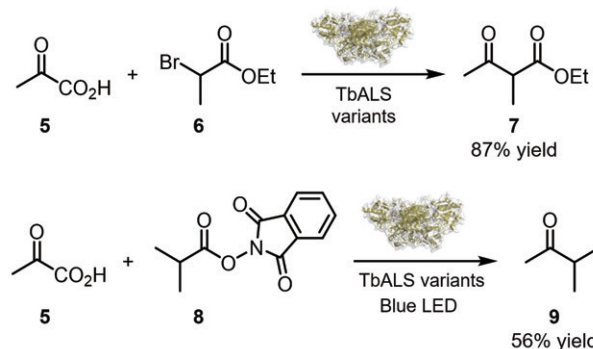


図2：アセト乳酸合成酵素TbALSによるラジカルアシル化反応

中心ラジカル)同士の反応において特に高い収率を与えることが判明し、このような高難度な反応を実現するTbALSの触媒活性は、有機化学的にも特筆すべき結果であった。

また本研究では、ヘム依存性酵素であるアルドキシム脱水酵素(Oxd)の反応モジュールを応用した、非生物学的なラジカル反応の開環についても報告している⁴。オキシムの直接的N-OH結合の切断によるイミニルラジカルの形成は、競合するO-H結合の切断やOH基の低い脱離能のため、有機化学的には困難な反応として知られる。そこで、アルドキシム脱水酵素の触媒反応機構に注目し、そのイミニルラジカル生成機構を非生物学的なラジカル開環反応へと応用することを着想した。データベース上の多様な微生物由来Oxdを探索した結果、放線菌 *Nocardioides simplex* 由来のアルドキシム脱水酵素(NsOxd)が、シクロブタノンオキシム**10**のラジカルの開環反応を触媒し、 γ -シアノスルフィン酸**11**を高い収率(>95%)で与えることが判明した(図3)。また、反応の経時変化を追跡したところ、本酵素反応は室温で10分以内に完了することが明らかとなり、高温条件や24時間以上の反応時間を要する従来の化学触媒を用いた反応系と比較して、NsOxdが示す触媒活性は優位に高いことが示された。

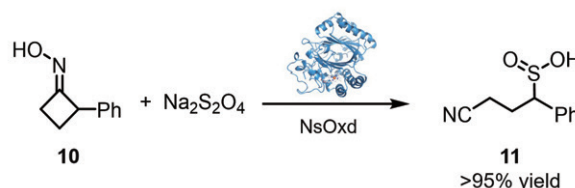


図3：アルドキシム脱水酵素NsOxdによるラジカル開環反応

今後の展望

今後は、これらの非生物学的な酵素反応を細胞内の代謝系へと統合し、従来の生合成の枠組みを超えた物質生産(バイオプロダクション)へと展開することをめざす。特に、本研究で見出されたカルベン転移反応やラジカル反応といった非生物学的な化学反応を、既存の代謝経路と組み合わせることで、従来の天然代謝経路では到達困難であった化学構造を有する化合物群の微生物生産を可能とする非天然型の生合成経路の創出が期待される。さらに、補因子供給系や細胞内環境の最適化といった代謝工学的手法と融合することで、これらの反応を実用的な物質生産プロセスへと発展させることが可能になると考えられる⁵。

謝辞

本研究の遂行にあたり、林高史教授(大阪大学)、蓮沼誠久教授(神戸大学)をはじめ、共同研究者の皆様、ならびに大阪大学工学研究科構造有機化学研究室および神戸大学バイオ生産工学研究室の関係各位に多大なるご支援・ご協力を賜りました。ここに深く感謝申し上げます。

引用文献

1. Kato, S. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **62**, e202303764 (2023)
2. Kato, S. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **65**, e202526025 (2026)
3. Kato, S. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **147**, 14837-14844 (2025)
4. Kato, S. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **64**, e202511590 (2025)
5. Kato, S. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **64**, e202512156 (2025)

略歴

- 2016年 3月 大阪大学 工学部 応用自然科学科 卒業
- 2017年 9月 RWTH Aachen University, Institute of Biotechnology, visiting researcher
- 2018年 3月 大阪大学大学院 工学研究科 応用化学専攻 博士前期課程 修了
- 2018年 4月 日本学術振興会 特別研究員DC1
- 2018年 8月 RWTH Aachen University, Institute of Biotechnology, visiting researcher
- 2021年 3月 大阪大学大学院 工学研究科 応用化学専攻 博士後期課程 修了
- 2021年 4月 大阪大学大学院工学研究科 応用化学専攻 助教
- 2025年 7月～ 神戸大学 先端バイオ工学研究センター 准教授
- 2025年11月～ 神戸大学, 大学院科学技術イノベーション研究科, 准教授(兼任)

Introduction

With the rapid advancement of biotechnology, biocatalysis using enzymes and microorganisms has emerged as a next-generation reaction platform that complements and replaces conventional chemical synthesis. However, naturally occurring enzymes are inherently limited in their ability to catalyze the full range of transformations required in modern organic synthesis. In fact, compared to the vast repertoire of reactions developed by organic chemists, the diversity of enzymatic reactions found in nature remains surprisingly restricted. Consequently, the scope of chemical transformations accessible through biocatalysis is largely confined to naturally evolved metabolic reactions. To address this limitation, I aimed to expand the utility of biocatalysis toward non-natural transformations by developing enzymes capable of catalyzing abiotic chemical transformations.

Discovery of Microbial Enzymes for Stereodivergent Carbene Transfer Reactions

In this study, I first focused on abiotic carbene transfer reactions and explored microbial enzymes capable of catalyzing the cyclopropanation of styrene (**1**) with ethyl diazoacetate (**2**).^{1,2} In addition to a set of previously studied enzymes, comprehensive screening of diverse heme-dependent enzymes derived from various microorganisms was performed. Screening of 96 heme proteins revealed that microbial globins exhibit significantly higher catalytic activity and stereoselectivity compared to other heme-dependent enzymes. For example, a globin derived from *Starkeya novella* (SnVHb) showed exceptionally high catalytic activity ($k_{\text{cat}} = 4.9 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$, $K_M = 3.4 \text{ mM}$) and afforded the *trans* product (*S,S*)-**3** with excellent stereoselectivity (*trans* : *cis* = 99:1, 99:1 e.r.). To further rationalize these findings, we performed principal component analysis (PCA)-based clustering of globin sequences, enabling visualization and classification of sequence features in a two-dimensional space. Notably, the resulting clusters correlated well with stereoselectivity in the cyclopropanation reaction. Guided by this clustering, systematic enzyme screening led to the identification of additional globins (PcaTrHb, SavTrHb, MgGCS) capable of selectively producing the previously inaccessible stereoisomers (*R,R*)-**3**, (*S,R*)-**4** and (*R,S*)-**4**. These results demonstrate that all four stereoisomers of cyclopropanation products can be selectively synthesized through stereodivergent biocatalysis (Figure 1).

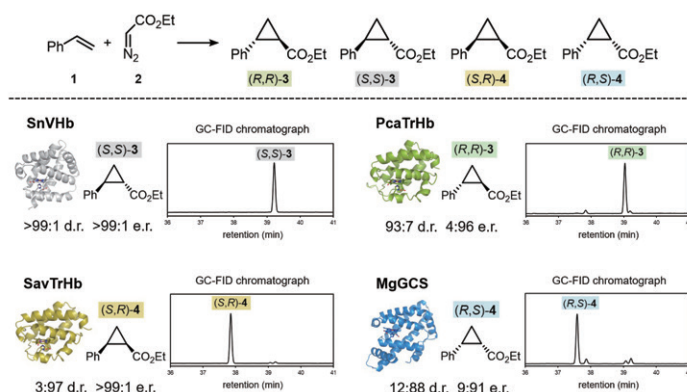


Figure 1. Stereodivergent cyclopropanation catalyzed by microbial globins

Discovery of Microbial Enzymes for Abiotic Radical Reactions

This database-driven enzyme discovery approach was further extended to develop biocatalysts for other types of abiotic transformations beyond carbene transfer reactions. Inspired by radical mechanisms of *N*-heterocyclic carbene (NHC) organocatalysis, microbial enzymes that utilize thiamine diphosphate and flavin cofactors were investigated.³ As a result, acetolactate synthase from *Thermobispora bispora* (TbALS) was found to catalyze radical acylation reactions of α -bromo esters **6** and *N*-acyloxyphthalimides **8** using α -keto acids **5** as acyl donors (Figure 2). Notably, TbALS exhibited high efficiency even for reactions involving unstable radical intermediates, such as primary and secondary carbon-centered radicals,

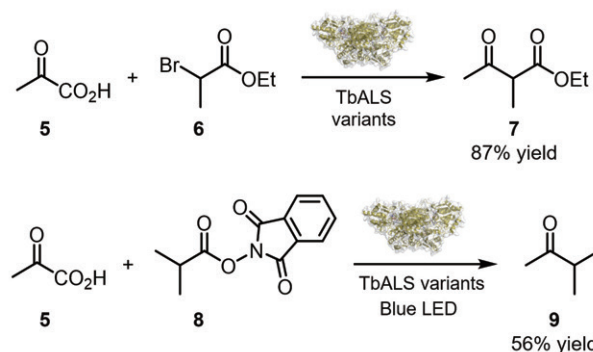


Figure 2. NHC-mediated radical acylation catalyzed by TbALS

highlighting its unique catalytic capability from an organic chemistry perspective.

In addition, I developed abiotic radical transformations based on the reaction module of aldoxime dehydratase (Oxd).⁴ Direct cleavage of the N-OH bond of oximes to generate iminyl radicals is challenging in synthetic chemistry due to competing O-H bond cleavage and the poor leaving ability of hydroxyl groups. By leveraging the intrinsic catalytic mechanism of Oxd, I envisioned repurposing this system for abiotic radical reactions of iminyl radical chemistry. Screening of diverse microbial Oxd enzymes identified an enzyme from *Nocardioides simplex* (NsOxd) that efficiently catalyzes the radical ring-opening of cyclobutanone oximes **10**, affording γ -cyanosulfonic acids **11** in high yield (>95%) (Figure 3). Time-course analysis revealed that this reaction proceeds to completion within 10 minutes at room temperature, significantly outperforming conventional chemical catalysts that require elevated temperatures and prolonged reaction times.

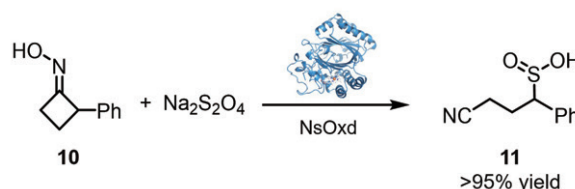


Figure 3. Radical ring-opening reaction of cyclobutanone oximes catalyzed by NsOxd

Future Perspectives

In future work, we aim to integrate these abiotic enzymatic transformations into intracellular metabolic networks and expand them toward bioproduction. By combining non-natural reactions such as carbene transfer and radical transformations with native metabolic pathways, it will become possible to construct non-natural biosynthetic pathways that enable the microbial production of structurally diverse molecules inaccessible through natural metabolism. Furthermore, integration with metabolic engineering strategies, including optimization of cofactor supply and intracellular environments, will facilitate the development of practical and scalable production systems. This approach is expected to establish a new paradigm in which chemistry-inspired enzymatic transformations are embedded within living systems, thereby expanding the scope of biosynthesis and enabling next-generation bioproduction.⁵

Acknowledgements

The author gratefully acknowledges Prof. Takashi Hayashi (Osaka University), Prof. Tomohisa Hasunuma (Kobe University), as well as all collaborators, laboratory members of Hayashi Group at Osaka University, and members of the Bioproduction Engineering Laboratory at Kobe University for their invaluable support and contributions to this research.

References

1. Kato, S. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **62**, e202303764 (2023)
2. Kato, S. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **65**, e202526025 (2026)
3. Kato, S. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **147**, 14837-14844 (2025)
4. Kato, S. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **64**, e202511590 (2025)
5. Kato, S. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **64**, e202512156 (2025)

Brief Biography

March	2016	B.S. in School of Engineering, Osaka University
September	2017	Visiting researcher, RWTH Aachen University, Institute of Biotechnology
March	2018	M.S. in Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University
April	2018	JSPS research fellow (DC1)
August	2018	Visiting researcher, RWTH Aachen University, Institute of Biotechnology
March	2021	Ph.D. in Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University
April	2021	Assistant Professor, Graduate School of Engineering, Osaka University
July	2025	Associate Professor, Engineering Biology Research Center, Kobe University
November	2025	Associate Professor (Concurrent), Graduate School of Science, Technology and Innovation, Kobe University