

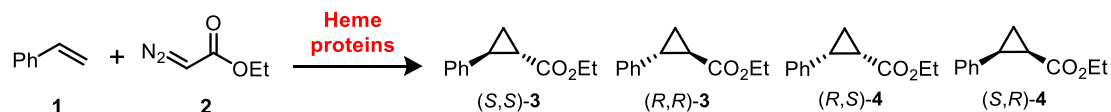
二置換シクロプロパンの Stereo-divergent 合成を目的とした微生物ヘム依存性酵素のゲノマイニングに基づく探索

(阪大院工) ○梅田 康平・竹内 康基・加藤俊介・林 高史

Genome Mining-Based Screening of Microbial Heme-Dependent Enzymes for Stereo-divergent Synthesis of 1,2-Disubstituted Cyclopropanes (*Graduate School of Engineering, Osaka University*) ○Kohei Umeda, Koki Takeuchi, Shunsuke Kato, Takashi Hayashi

Biocatalysis has recently attracted attention as a powerful synthetic alternative to conventional chemical catalysis. To expand the catalytic repertoire of enzymes for abiotic transformations, we here investigated heme-dependent enzymes which can catalyze stereoselective cyclopropanation of styrene. In contrast to previous reports which carried out evolutionary engineering of a specific protein (such as cytochrome P450_{BM3}),¹ we here conducted genome mining-based screening of diverse heme-dependent enzymes to identify an active cyclopropanase with high stereo-selectivity. A series of microbial heme-dependent enzymes (96 proteins in total) were recombinantly prepared and screened to determine its cyclopropanation activity using a “CSAP system”.² Consequently, a bacterial globin from the *S. novella* was found to exhibit high activity and excellent selectivity for *trans*-isomer (*S,S*)-**3** (>96% de, >98% ee). Furthermore, we also identified other enzymes which selectively produce the isomers (*S,R*)-**4**, (*R,R*)-**3**, and (*R,S*)-**4** by sequence homology search and clustering analysis. **Keywords** : Biocatalysis; Cyclopropanation; Heme-dependent Enzymes; Stereo-divergent Synthesis; Carbene transfer reaction

近年、生体触媒反応は従来の化学合成法を代替する次世代の反応技術として注目を集めている。本研究では、生体触媒の有用性を非天然の不斉合成反応へと拡張すべく、スチレン(**1**)の立体選択的シクロプロパン化反応を触媒するヘム酵素の探索を実施した。本反応を自然界で行う酵素は発見されていないが、進化工学的手法により改変されたシトクロム P450 変異体が、本反応に対し触媒活性を示すことが報告されている¹。一方我々は、先行研究の進化工学のアプローチに捉われず、ゲノマイニングに基づき多種多様なヘム酵素を網羅的に探索することで、ジアゾ酢酸エチル(**2**)を用いた **1** の高いシクロプロパン化活性を示すヘム依存性酵素の同定に成功した。まず 96 種類の微生物ヘム依存性酵素の遺伝子ライブラリを調製し、独自のタンパク質精製系を用いた酵素スクリーニングを実施した²。その結果、硫黄酸化細菌 *Starkeya novella* 由来グロビンが、非常に高い触媒活性を示し、(*S,S*)-**3** を立体選択的 (>96% de, >98% ee) に与えることが判明した。さらに配列相同性検索とクラスタリング解析を駆使することで、他の異性体(*S,R*)-**4**, (*R,R*)-**3**, (*R,S*)-**4** を選択的に合成する酵素も同定した。



1) P. Coelho *et al.*, *Science*, **2013**, 339, 307-310.

2) S. Kato *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2023**, 62, e202303764