

## 微生物機能高度活用プロジェクト

研究代表者 木野 邦器  
(先進理工学部・応用化学科・教授)

### 1. 研究課題

微生物や酵素による反応は、常温・常圧において進行可能であり、高い立体選択性や位置選択性が発揮される。本研究課題では、微生物や酵素の機能を高度に利用することで、有用性の高い水酸化化合物やペプチド、さらには、バイオマスを原料とした汎用化成品の合成プロセスを開発することを目的としている。本稿では、主に水酸化芳香族化合物の合成法の開発ならびにペプチド合成酵素と有用ジペプチドの生産法の開発研究について報告する。

### 2. 主な研究成果

#### 2.1 レスベラトロールをピセアタンノールへ変換する微生物の探索

レスベラトロールの水酸化物であるピセアタンノールは、抗酸化作用や抗癌作用等の多様な生理活性を示す有用なポリフェノールであり、機能性食品や医薬品、化粧品の原料として有用な化合物である。我々はこれまでに、*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株由来の二成分型フラビン依存性モノオキシゲナーゼ HpaBC を発現させた大腸菌細胞を用いて、レスベラトロールからピセアタンノールを合成可能なことを明らかにしている (Fig. 1) (Tetrahedron Lett., 55, 2853 (2014))。レスベラトロール水酸化活性を有する酵素の存在から、自然界にも当該活性を示す微生物が存在する可能性があり、組換え微生物ではなく野生型微生物によりピセアタンノールを合成できれば、食品用途への展開がしやすいと考えられる。本研究では、自然界からレスベラトロールをピセアタンノールに変換する微生物を探索し、野生型微生物を利用したピセアタンノール生産について検討した。

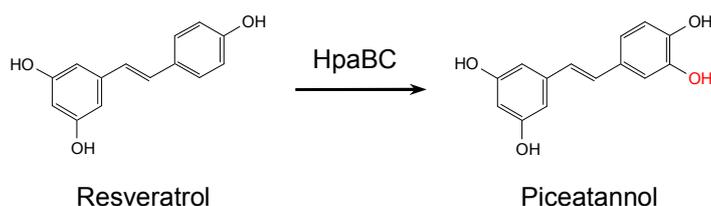


Fig. 1. レスベラトロールのピセアタンノールへの返還.

一次スクリーニングとして、反応の基質であるレスベラトロール、レスベラトロールの部分構造に相当する化合物のフェノール、および HpaBC の生理基質である 4-ヒドロキシフェニル酢酸 (4-HPA) をそれぞれ炭素源とした培地を用い、これらを分解、資化する微生物を集積した。二次スクリーニングでは、一次スクリーニングにおいて集積された候補株に対してレスベラトロールを基質とした菌体反応を行い、HPLC 分析によりピセアタンノール生成の有無を確認した。その結果、4-HPA を炭素源としたスクリーニング系においてピセアタンノール合成活性を示す微生物が 23 株

取得された。この中でとくに高い活性を示した 2 株 (KSH1 株と KSH3 株) について 16S rRNA 遺伝子配列解析を行なった結果、KSH1 株はグラム陰性の *Ensifer* 属細菌、KSH3 株はグラム陽性の *Arthrobacter* 属細菌と同定された。さらに、これらの株の培養条件を検討したところ、当該変換活性は 4-HPA を炭素源とした場合に定常期で強く誘導されることが明らかとなった。KSH1 株は 36 時間、KSH3 株は 9 時間の培養後に回収した菌体で高い活性を示し、それぞれ 3.5 mM と 1.6 mM のピセアタンノールを生成した (Fig. 2)。これまでに、*Streptomyces* 属細菌でレスベラトロールのピセアタンノールへの変換活性が報告されているが、KSH1 株および KSH3 株は *Streptomyces* 属とは遠縁の属の細菌であり、既報の株をはるかに上回るピセアタンノール合成活性を示すことが明らかとなった。

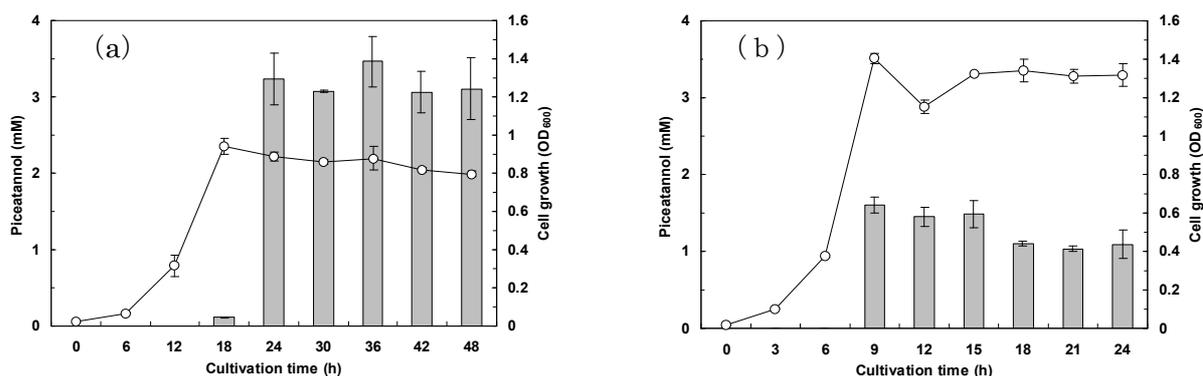


Fig. 2. 培養時間と誘導されるレスベラトロールからのピセアタンノール変換活性の関係。

折れ線グラフ：菌体の生育、棒グラフ：ピセアタンノールの生成量

(a) *Ensifer* sp. KSH1 株 (b) *Arthrobacter* sp. KSH3 株

## 2.2 バニリン高生産に向けた酸化酵素 Cso2 の機能強化

フレーバーやフレグランスとして有用なバニリンはバニラビーンズからの抽出により得られるがその量は限られており、代替製法として微生物や酵素を利用したバイオプロセスに関心が寄せられている。これまでに、バイオマス資源のフェルラ酸を原料としたバニリン合成が試みられているが、既報の経路は補酵素を必要とするためその供給が高生産を阻む一因となっている。我々はこれまでに、補酵素非依存性の脱炭酸酵素 Fdc と酸化酵素 Cso2 からなる新規バニリン合成経路を設計し、これらの酵素を発現させた組換え大腸菌を利用してバニリンを合成可能なことを実証している (Fig. 3) (ChemBioChem, 15, 2248-2254 (2014))。しかしながら、二段階目の Cso2 の安定性が低く、このことがバニリンのさらなる高生産を阻んでいる。本研究では、ランダム変異導入による Cso2 の熱安定性の向上を試みた。

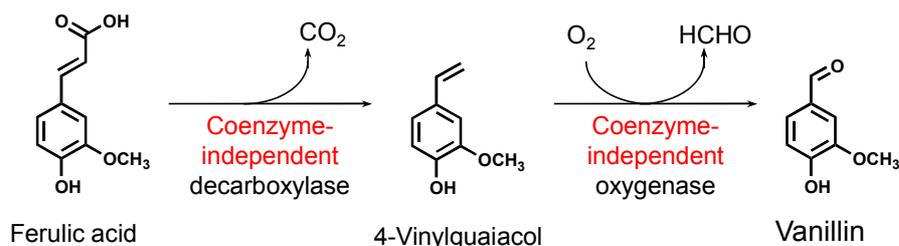


Fig. 3. 補酵素非依存性の脱炭酸酵素 Fdc と酸化酵素 Cso2 からなる新規バニリン合成経路。

ランダム変異導入は error-prone PCR 法により行なった。cso2 遺伝子を鋳型として  $Mn^{2+}$  0.3 mM 存在下で PCR を行なうことにより変異を誘発し、PCR 産物をベクターに連結して大腸菌に導入した。大腸菌を培養後、イソプロピル- $\beta$ -チオガラクトピラノシドの添加により遺伝子発現を誘導した。菌体を緩衝液に懸濁後、野生型 Cso2 が失活してしまう 45°C で 1 時間処理し、処理後の菌体を 4-ビニルグアヤコールと反応させた。活性評価は、4-ビニルグアヤコールがバニリンに変換される際に生じる副産物のホルムアルデヒドを、呈色法で検出することにより行なった。つまり、活性評価で色を呈すれば、45°C の熱処理にも耐えうる有効な変異が Cso2 に導入されたことになる。この一連の過程において、大腸菌の培養と遺伝子発現は固体培地上で、熱処理、反応および活性評価はマイクロプレート上で行なえるようにセットアップし、多くの変異酵素を一度に評価できるスクリーニング系を確立できた。構築したスクリーニング系を利用して、熱安定性の向上した Cso2 の取得を現在試みている。

### 2.3 非酸化的脱炭酸酵素の探索と芳香族ヒドロキシカルボン酸合成への展開

芳香族ヒドロキシカルボン酸は医薬品、化粧品、食品添加物、液晶ポリマーの原料として有用な化合物であり、一般的にはフェノールに対して炭酸を付加し、カルボキシ基を導入するコルベ-シュミット反応により製造されている。しかしながら、カルボキシ基の導入における位置選択性や収率の低さが依然課題として残されている。微生物由来の非酸化的脱炭酸酵素には、脱炭酸反応のみならず、逆反応である炭酸固定反応を触媒するものも知られている。こうした特性を有する当該酵素を用いると、フェノール類からは多様なヒドロキシカルボン酸の合成が期待できる。また、副次的効果として地球温暖化の原因のひとつである炭酸ガスを有用化合物合成へ展開できるため、低炭素社会の実現にも貢献するプロセスとなりえる。そこで、我々は、この酵素特性に着目し、フェノール類縁体への直接的かつ位置選択的な炭酸固定に利用可能な微生物酵素の探索、ならびに当該酵素を用いた芳香族ヒドロキシカルボン酸の実用的な生産プロセスの開発を目指している。今年度は、当研究室でスクリーニングした新規脱炭酸酵素活性保有菌 *Arthrobacter* sp. K8 株からの脱炭酸酵素遺伝子のクローニングと、大腸菌における高発現を検討した。また、当該酵素における基質特異性の一部を明らかにした。

研究室保有の *Arthrobacter* sp. K8 株は、2,4-ジヒドロキシ-6-メチル安息香酸（オルセリン酸）を単一炭素源として取得した土壌細菌である。既に我々は、K8 株を触媒とした菌体反応において、オルセリン酸の脱炭酸のみならず、逆反応である 5-メチルレゾルシノール（オルシノール）への炭酸固定が可能であることを明らかにしている。さらに、基質特異性の検討において、4-メトキシサリチル酸の脱炭酸と、逆反応による 3-メトキシフェノールへの炭酸固定も確認している (Fig. 4)。一方で、効率的な生産に向けて脱炭酸酵素遺伝子のクローニングと組換え大腸菌における当該酵素の高発現を試みた。

はじめに、脱炭酸酵素遺伝子のクローニングを行った。K8 株のゲノムを制限酵素 BamHI により部分消化し、pUC118 ベクターに挿入することで大腸菌 JM109 を宿主とした K8 株のゲノムライブラリーを構築した。K8 株のゲノム断片を有する大腸菌をディープウェルプレートで培養し、遠心分離後に得た菌体を触媒としたオルセリン酸脱炭酸反応を行った。その後、反応上清に  $FeCl_3$  を添加することで活性の有無を評価した。活性が無い場合は残存したオルセリン酸と  $Fe^{3+}$  は錯体を形成し紫色を呈し、活性がある場合は脱炭酸したオルシノールと  $Fe^{3+}$  は錯体を形成しないため紫色が消失するため、反応の進行を簡便に判断できる。マイクロプレート上で数百クローンを評価した

ところ、2つのクローンにおいて紫色の消失が見られた。そこで、これらクローンの有するベクターに挿入された塩基配列をシーケンスしたところ、脱炭酸酵素の候補遺伝子とその周辺領域を確認することができた。当該酵素のアミノ酸配列をクエリーとした相同性検索を実施したところ、一部の既知脱炭酸酵素と同様に **Amidohydrolase 2** と類推されたが、詳細は不明であったため、組換え酵素を調製し、精製酵素系において機能を評価することとした。

続いて、候補遺伝子を T7 プロモーターの支配下に遺伝子を挿入した pET ベクターを用い、大腸菌における高発現系を構築した。N-末端に His-tag を付加して発現させた酵素を Ni<sup>2+</sup>アフィニティクロマトグラフィーにより単一に精製した。精製酵素系において反応を検討したところ、K8 株の菌体反応系と同様に、オルセリン酸と 4-メトキシサリチル酸の脱炭酸活性および逆反応であるオルシノールと 3-メトキシフェノールへの炭酸固定活性を確認した (Fig. 4.)。

以上より、当該酵素が新規な脱炭酸活性を有していることが示された。また、既知非酸化脱炭酸酵素と合わせた系統樹解析を行った結果、これまでに知られていない一群を形成していることが明らかになった (Fig. 5)。

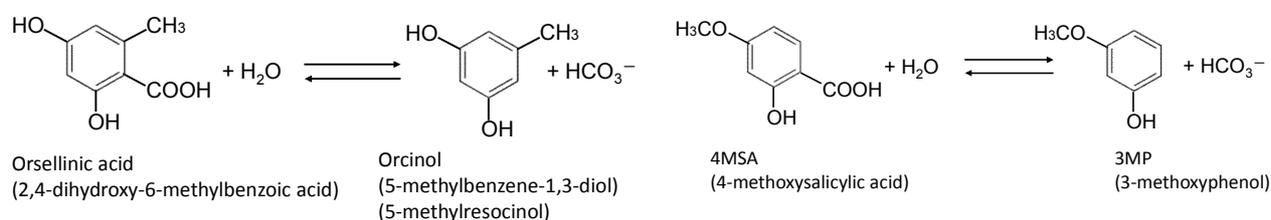


Fig. 4. *Arthrobacter* sp. K8 株由来オルセリン酸脱炭酸酵素が触媒する代表的反応。

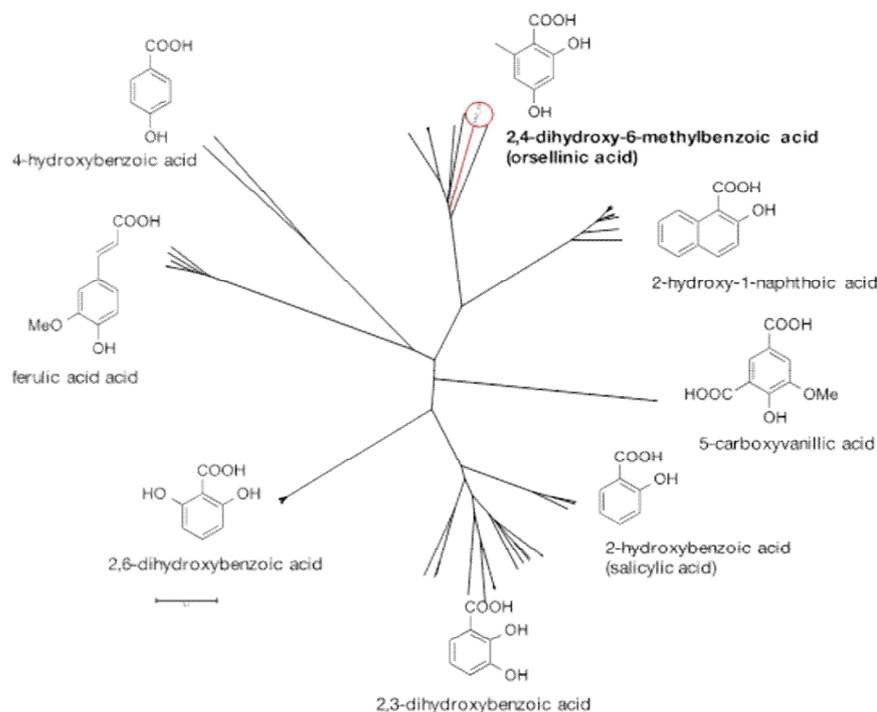


Fig. 5. 多様な非酸化脱炭酸酵素の系統樹解析。  
本研究で見出した新規オルセリン酸脱炭酸酵素は赤丸で示した

## 2.4 L-アミノ酸リガーゼの機能改変と有用ジペプチド合成

ペプチド合成酵素の酵素学的知見と産業利用を促進するために、タンパク質立体構造情報およびアミノ酸配列情報から活性領域と推察される部位への変異導入とその評価によって、構造と機能の関わりを考察した。健康サプリメントとして広く市販されている有用ジペプチドの効率的合成法の開発に成功するなど、その戦略の有用性を実証した。

今年度も、抗酸化、抗疲労作用を有するイミダゾールジペプチドの酵素的合成法の検討を継続して行った。前年度、 $\beta$ -Ala を N 末端基質として認識する L-アミノ酸リガーゼ(Lal)である YwfE の改変酵素を用いたカルノシン( $\beta$ -Ala-L-His)の合成収量の大幅向上に成功したが、アンセリン( $\beta$ -Ala-3-methyl-L-His)とバレニン( $\beta$ -Ala-1-methyl-L-His)の合成活性も確認することができた。そこで、あらためて YwfE の結晶構造情報とカルノシン合成での知見を踏まえて、合成収量(変換効率)の向上を可能とする変異型酵素を創製し、その活性評価を行った。カルノシンでは 11.4 mM(収率 91.4%)とさらに合成収量が向上し、アンセリンでは段階的に変異を導入して創製した三重変異体で 11.8 mM(収率 94.7%)と好成績を達成した。バレニンに関しては、反応物の LC-MS 解析によりその生成を確認することができた。

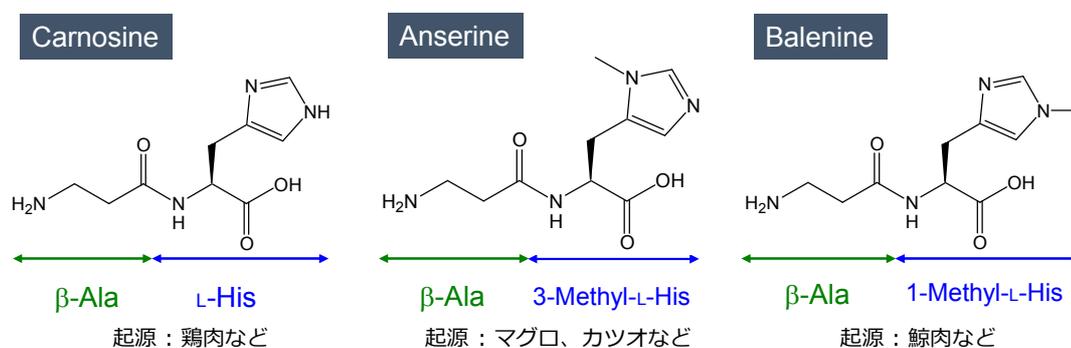


Fig. 6. 抗酸化・抗疲労効果を有するイミダゾールジペプチド。

## 2.5 ポリ- $\alpha$ -グルタミン酸合成酵素 RimK の結晶構造解析

昨年度、大腸菌由来ポリ- $\alpha$ -グルタミン酸合成酵素 RimK において新規形状結晶の取得に成功し、分解能 2.34 Å で立体構造が決定されたが、RimK と基質との複合体の明確な結晶構造取得には至っていないため基質の電子密度は未だ不鮮明で、RimK と基質の結合力が弱いことが示唆された。そこで今年度は、RimK と基質との結合力を高めることを目的として、ADP の代わりに ATP ホモログである AMP-PNP と複合体を形成した RimK の結晶化及びその X 線回折試験と結晶構造解析を新たに行うことにした。また、X 線回折試験において結晶を液体窒素噴射により凍結させるための抗凍結溶液について、結晶のドロップと抗凍結溶液の pH の差が分解能低下の原因であると考えられたため、抗凍結溶液の pH 調整を新たに行った。以上の新たな検討を踏まえ、胡桃坂研究室との共同研究のもと、取得した単結晶を用いて大型放射光施設 Photon Factory にて X 線回折試験を行ったところ、分解能 2.05 Å で AMP-PNP,  $Mg^{2+}$ ,  $SO_4^{2-}$  と複合体を形成した RimK の結晶構造を取得することに成功した。構造中に非対称単位中に 8 分子が確認され、各構造にて基質の噛み込みの可否で場合分けしたところ、2 種類のパターンに分けることができ、しかも、この 2 種類の構造を重ね合わせたところ、一部で構造の差異が認められた (Fig. 7)。

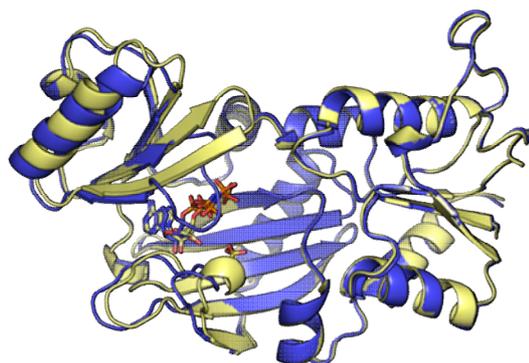


Fig. 7. The superposition of two crystal structures of closed form RimK and open form RimK. Closed form RimK and open form RimK were color-coded blue and yellow.

### 3. 共同研究者

胡桃坂 仁志 (先進理工学部・電気・情報生命学科・教授)

原 良太郎 (理工学術院・理工学研究所・次席研究員)

古屋 俊樹 (理工学研究所・招聘研究員、東京理科大学・理工学部・応用生物科学科・講師)

有村 泰宏 (先進理工学部・電気・情報生命学科・助教)

### 4. 研究業績

#### 4.1 学術論文

1. Haruka Kino, Shota Nakajima, Toshinobu Arai and Kuniki Kino, "Effective production of Pro-Gly by mutagenesis of L-amino acid ligase", *J. Biosci. Bioeng.*, **122**(2), 155-159 (2016).
2. Seiya Watanabe, Kunihiko Tajima, Satoshi Fujii, Fumiyasu Fukumori, Ryotaro Hara, Rio Fukuda, Mao Miyazaki, Kuniki Kino, and Yasuo Watanabe, "Functional characterization of aconitase X as a cis-3-hydroxy-L-proline dehydratase", *Scientific Reports*, 6:38720 (2016).
3. Toshiki Furuya, Mari Kuroiwa, Kuniki Kino, "Biotechnological production of vanillin using immobilized enzymes", *Journal of Biotechnology*, **243**, 25-28 (2017).

#### 4.2 総説・著書

1. 木野邦器, 木野はるか, 解説 (査読有) "解説 L-アミノ酸リガーゼを利用したジペプチドライブラリーの構築と塩味増強効果を有するジペプチドの探索", *日本醸造協会誌*, **11**(2), 79-85 (2016).
2. 木野邦器, (査読有) 大村智ノーベル生理学・医学賞受賞記念特集: 微生物由来天然物の実用化と未来, "微生物の多様性に学ぶ酵素探索と利用", *生物工学会誌*, **94**(7), 395-8398 (2016).
3. 木野邦器, (査読有) 特集ペプチド化学の最前線: "ペプチド合成酵素の探索とオリゴペプチド合成法の開発", *化学工業*, **67**(10), 40-47 (2016).

4. 木野邦器, 木野はるか, 解説 (査読有) “L-アミノ酸リガーゼを利用した塩味増強効果を発揮するジペプチドの探索とその効率的な合成法”, 化学と生物, **55**(3), 182-188 (2017).

#### 4.3 (招待)講演

1. 木野邦器, “グリーンバイオを推進する酵素探索と機能開発”, 2016年度グリーンバイオイノベーションフォーラム設立記念シンポジウム基調講演 (招待講演), JBA 主催 東京大学農学部中島記念ホール (東京), 2016年7月20日
2. 木野邦器, “微生物・遺伝子探索、培養技術の最新動向とその展開: Fundamental Source of Ideas on Japanese Microbial Production: Screening technology innovation for novel microbes and genes”, BioJapan2016, パシフィコ横浜 (横浜), 2016年10月12-14日

#### 4.4 受賞・表彰

1. 原良太郎, 北辻早希, 山縣海, 木野邦器, 日本生物工学会 2016年度大会トピックス選定, “酵素法によるアルギニンからの 3-ヒドロキシオルニチンおよび *trans*-3-ヒドロキシプロリンの合成”, 講演要旨集 p.95, 1P-1p020
2. T.Furuya, Yoh Shitashima, and K.Kino, 2016年度生物工学論文賞 (Award for J. Biosci. Bioeng.)

#### 4.5 学会および社会的活動

1. 原良太郎, 北辻早希, 山縣海, 木野邦器, “酵素法によるアルギニンからの 3-ヒドロキシオルニチンおよび *trans*-3-ヒドロキシプロリンの合成”, 第68回日本生物工学会 2016年度大会, 講演要旨集 p.95, 1P-1p020, 富山国際会議場 (富山), 2016年9月28日
2. 中島悠太, 原良太郎, 木野邦器, “ヒスチジン水酸化酵素の特性解析と組換え大腸菌による 3-ヒドロキシヒスチジン生産”, 日本生物工学会 2016年度大会, 講演要旨集 p.96, 1P-1p021, 富山国際会議場 (富山), 2016年9月28日
3. 木内愛海, 原良太郎, 山縣海, 三宅良磨, 川端潤, 木野邦器, “リジン水酸化酵素発現大腸菌を利用したヒドロキシリジン生産プロセスの開発”, 日本生物工学会 2016年度大会, 講演要旨集 p.96, 1P-1p022, 富山国際会議場 (富山), 2016年9月28日
4. 鈴木伸, 原良太郎, 木野邦器, “アミノアシルプロリン合成におけるピロフォスファターゼの効果と菌体反応系での生産”, 日本生物工学会 2016年度大会, 講演要旨集 p.170, 2P-1p005, 富山国際会議場 (富山), 2016年9月29日
5. 平井健吾, 原良太郎, 木野邦器, “Fatty acyl-AMP リガーゼを利用した脂肪酸アミド合成法の開発”, 日本生物工学会 2016年度大会, 講演要旨集 p.170, 2P-1p006, 富山国際会議場 (富山), 2016年9月29日
6. 古屋俊樹, 黒岩麻里, 木野邦器, “固定化酵素を利用したバニリン合成”, 日本生物工学会 2016年度大会, 講演要旨集 p.96, 1P-1p024, 富山国際会議場 (富山), 2016年9月28日
7. 平井健吾, 鈴木伸, 原良太郎, 木野邦器, “酵素反応と化学反応の融合による新規アミノ酸アミド合成法の開発”, 第76回酵素工学研究会, 講演要旨集 p64, B-14, 東大山上会館 (東京), 2016年10月7日
8. 木内愛海, 原良太郎, 山縣海, 三宅良磨, 川端潤, 木野邦器, “リジン水酸化酵素を利用した

- ヒドロキシリジン生産プロセスとヒドロキシピペコリン酸生産への展開”, 日本化学会第 6 回 CSJ フェスタ, 講演要旨集 P4-082, タワーホール船堀 (東京), 2016 年 11 月 14-16 日.
9. 鈴木伸, 原良太郎, 木野邦器, “新規ポリリン酸キナーゼによる AMP からの ATP 再生を利用したアミノアシルプロリン生産”, 日本化学会第 6 回 CSJ フェスタ, 講演要旨集 P5-097, タワーホール船堀 (東京), 2016 年 11 月 14-16 日
  10. 古屋俊樹, 齋政彦, 木野邦器, “酸化酵素を利用したピセアタンノール合成に対するシクロデキストリンの添加効果”, 第 18 回生体触媒化学シンポジウム in 東京, 講演要旨集 P-04, 明星大学 (東京), 2016 年 12 月 21-22 日
  11. 木野邦器, “有用微生物酵素の探索と物質生産プロセスへの展開”, 日本農芸化学会 2017 年度大会シンポジウム招待講演, 講演要旨集 2SY05-4\_C22, 京都女子大学 (京都) 2017 年 3 月 18 日
  12. 伊巻尚人, 古屋俊樹, 齋政彦, 木野邦器, “レスベラトロールをピセアタンノールに変換する微生物の探索”, 日本農芸化学会 2017 年度大会講演要旨集 3C26p15, 京都女子大学 (京都) 2017 年 3 月 19 日
  13. 原良太郎, 林拓人, 三宅良磨, 川端潤, 木野邦器, “酵素法によるヒドロキシリジンの製法開発”, 日本農芸化学会 2017 年度大会講演要旨集 2C26p13, 京都女子大学 (京都) 2017 年 3 月 18 日
  14. 駒林卓磨, 橋田紋佳, 紫牟田ひな子, 木野邦器, “酵素法によるイミダゾールジペプチドの生産”, 日本農芸化学会 2017 年度大会講演要旨集 2C26p08, 京都女子大学 (京都) 2017 年 3 月 18 日
  15. 鈴木伸, 平井健吾, 原良太郎, 木野邦器, “脂肪族アシル-AMP 合成酵素を利用した脂肪族アミド合成”, 日本農芸化学会 2017 年度大会講演要旨集 2C26p10, 京都女子大学 (京都) 2017 年 3 月 18 日
  16. 大久保絢夏, 梅原将洋, 野中詩織, 柳江高次, 古屋俊樹, 木野邦器, 齋政彦, “LC-MS-MS を用いたパッションフルーツ種子中のフェノール性化合物の分析”, 日本農芸化学会 2017 年度大会講演要旨集 3C13p14, 京都女子大学 (京都) 2017 年 3 月 18 日

## 5. 研究活動の課題と展望

水酸化芳香族化合物の合成研究では、健康食品用途としての展開から、レスベラトロールを水酸化してピセアタンノールに変換可能な野生型微生物の探索を実施し、ピセアタンノール合成活性の高い株としてグラム陰性菌である *Ensifer* 属細菌 KSH1 株とグラム陽性菌である *Arthrobacter* 属細菌 KSH3 株を取得した。高生産プロセス構築に向けて活性誘導条件や反応条件を検討する。一方で、非組換え微生物としてこれまでにない高活性を達成したことから、当該酸化活性を有する酵素ならびに遺伝子の取得と解析も実施し、学術的観点からの考察を行う。補酵素を必要としない新規酵素によるバニリン生産においては、熱安定性を指標とした安定化酵素の取得を続行し、実用的な高生産プロセスの開発を目指す。さらに、こうした芳香族化合物に対する水酸化プロセスは、オリブに微量含まれる抗酸化化合物であるヒドロキシチロソールの合成研究へも展開する。

非酸化的脱炭酸酵素の可逆的炭酸固定活性を利用した芳香族カルボン酸生産の研究に関しては、今回取得したオルセリン酸脱炭酸酵素をはじめその種類を増やし、低炭素化社会の要請に応える革

新的な技術として推進していく予定である。

Lalによる有用ジペプチドの合成研究は、昨年度、塩味増強ジペプチドとして Pro-Gly や Met-Gly をユニークな探索法によって見出すことができたが、今年度は、健康食品（サプリメント）として既に上市されている抗酸化、抗疲労効果を有するイミダゾールジペプチドの合成法の開発に注力した。カルノシン( $\beta$ -Ala-L-His)などイミダゾールジペプチドの合成が可能な YwfE に着目し、その立体構造情報等の知見からあらためて酵素のデザインを検討したところ、アンセリン( $\beta$ -Ala-3-methyl-L-His)では変換収率 90%を越える変異酵素の創製に成功することができた。アンセリンやバニリンの実生産においては、基質となるメチルヒスチジンの供給が課題となる。今後、企業との連携も進めつつ、発酵生産も考慮した実用化プロセスの開発にむけた検討を推進する予定である。

ペプチド合成酵素に関しては、Lal の反応機構に関わる多くの知見を蓄積し、基質特異性や鎖長制御など効率的な機能改変酵素の創出を実現することが課題である。そのために、特異的な Lal やペプチド合成酵素の結晶構造解析をさらに推進する必要があると考えている。タンパク質修飾酵素で、かつポリ- $\alpha$ -グルタミン酸合成活性を有する RimK の詳細な結晶構造解析データを基に構造と機能との関係を部位特異的変異の導入によって検証を行う。当該酵素の反応特性を明らかにしつつ基質特異性の異なる改変型 RimK の創製を戦略的に進め、タンパク質やペプチドの C 末端をアミド化する技術の開発を進める。