

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、低炭素化社会の実現に貢献する可逆的脱炭酸酵素を用いた非酸化的炭酸固定による芳香族カルボン酸合成法の開発、酸化酵素ならびに新たに開発した酸化反応システムによる香料生産、有用ジペプチドやアミド化合物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 鉄還元酵素を利用したセスキテルペノイド新規合成法の開発

多様な分子構造を有するセスキテルペノイドは、抗ストレス、抗腫瘍等の生理活性に加え、それぞれが特徴的な香気を有する化合物群であり、その産業有用性が高く注目されている。しかし、その多くは天然含量が少なく、工業的利用には効率的な合成プロセスの開発が求められている。我々は、前駆体セスキテルペンの酸化手法を探索する中で、細胞内金属イオンである Fe^{2+} が触媒として分子状酸素を活性化し、セスキテルペノイドを合成可能であることを見出した。この Fe^{2+} による酸化反応に関しては、*biomimetic catalyst* の分野で研究が進められているが、特に *oxygenase* タイプの模倣型として、非ヘム型 Fe^{2+} -chelate 触媒を用いたアリル位酸化が報告されている (*J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 10668 (2010))。そこで、生体内で Fe^{2+} -chelate 生成を担う *ferric-chelate reductase* に着目し、Fig. 1 に示す化学的酵素的合成系を新たに構築した。本反応系は Fe^{2+} -chelate による酸素添加反応と *ferric-chelate reductase* による Fe^{2+} -chelate の還元的供給および再生システムによって構成されており、幅広い酸化反応に適用可能である。

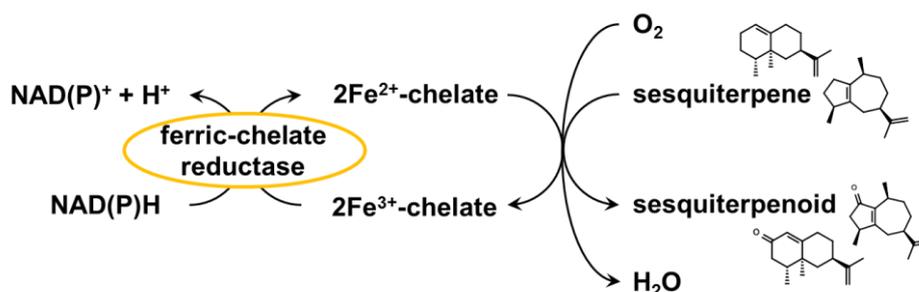


Fig. 1. Fe^{2+} -chelate と *ferric-chelate reductase* を用いた化学的酵素的合成系

セスキテルペノイド合成実施例として、グレープフルーツの重要香気成分である(+)-ヌートカトン合成を Fig. 2 に示す。分子状酸素の利用と触媒の再生供給を可能とする本合成プロセスは、クリ

ーンでかつ効率的なセスキテルペノイド生産を可能とする汎用性のあるユニークな化学的酵素的合成法であり、新たな知見の提供と工業的生産への応用展開が期待できる。

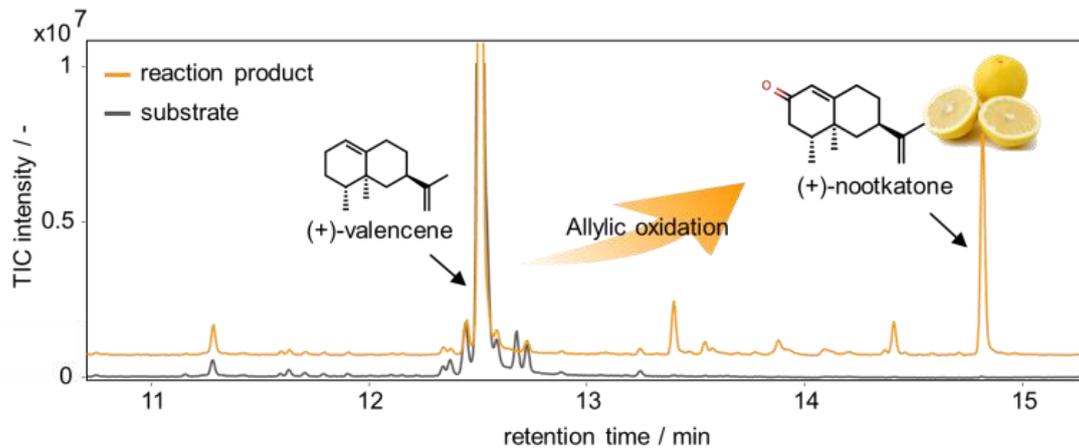


Fig. 2. ferric-chelate reductase 反応系を用いた(+)-ヌートカトン合成

2.2 バニリン高生産に向けたバイオプロセスの開発

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))。

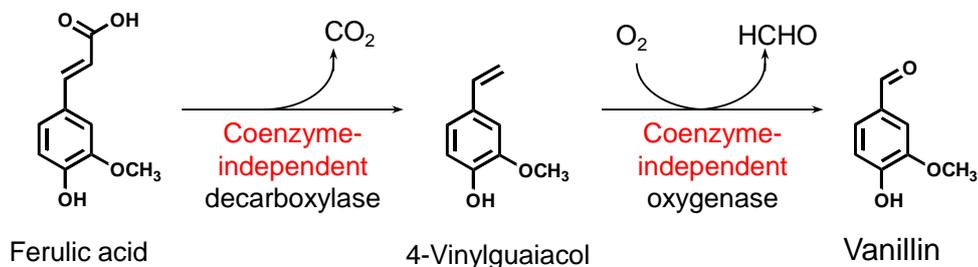


Fig. 3. 補酵素非依存性の脱炭酸酵素 Fdc と酸化酵素 Cso2 を用いるバニリン合成

一方、本合成経路の2段階目の反応を触媒する Cso2 の安定性が低く、バニリン合成の律速になっていると考えられた。そこで、その不安定性の原因を明らかにするとともに、Cso2 を用いた効率的なバニリン合成プロセスの開発を試みた。まず、酵素反応系にカタラーゼを添加すると合成量が向上することを見出しており、過酸化水素を分解するカタラーゼの添加効果は、酸化反応で生成する活性酸素種による Cso2 への悪影響を示唆する結果と推察した。Cso2 発現大腸菌の細胞破碎液を用いたバニリン合成において、カタラーゼの添加効果はほとんど認められなかった。これは宿主大腸菌に内在するカタラーゼが機能しているためであり、Cso2 を利用するバニリン生産では、菌体反応系が適していると判断した。これまでに、アルギン酸カルシウムゲルによって包括した組換え大腸菌を用いた繰り返し利用による生産性の向上を確認している。

本年度は、Cso2 のバニリン合成活性が律速である原因をさらに検討し、Cso2 のバニリン合成活性が、生成物であるバニリンにより阻害されることを明らかにした。またもう 1 つの生成物であるホルムアルデヒドは、Cso2 の活性に大きな影響は与えないが、基質である 4-vinylguaiacol を捕捉することも見出した。これらの結果を踏まえて、

反応系内を定常状態に維持可能な固定化菌体を用いた連続生産 (Fig. 4) を検討した。生成物による悪影響の緩和を期待したが、Cso2 活性そのものが低いため、連続生産プロセスの特徴である基質負荷を十分にかけることができず、現時点では、繰り返し生産と比べて著しいバニリン収量の向上には至っていない。現在、より安定で高活性なバニリン合成酵素の探索・改変を検討している。

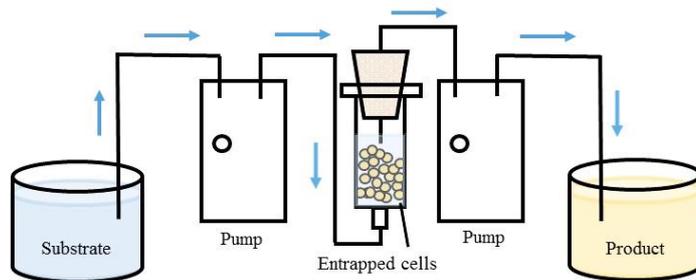


Fig. 4. 固定化菌体を用いたバニリン連続生産プロセス

2.3 可逆的脱炭酸酵素を利用した炭酸固定による芳香族カルボン酸の合成

我々は、低炭素化社会の実現に向け、二酸化炭素を固定して汎用性のある有用化合物を生産する技術開発と、それを光合成の暗反応により二酸化炭素を吸収して生育する植物性バイオマス为原料とする有用化合物生産に展開させる検討を行っている。具体的には、非酸化的炭酸固定活性を有する微生物由来の可逆的脱炭酸酵素に着目し、これまでに、バイオマス資源であるリグニン由来芳香族化合物为原料として芳香族カルボン酸を合成する可逆的脱炭酸酵素を見出している。本研究では、合成可能な芳香族カルボン酸の多様性の拡張を目的として、新規基質特異性を有する可逆的脱炭酸酵素の探索を行った。

(1) 芳香族カルボン酸を対象とした可逆的脱炭酸酵素の探索

化粧品原料として使用されている 4-メトキシサルチル酸(4MSA)に対する可逆的脱炭酸活性を有する微生物 *Arthrobacter* sp. K8 株を既に土壌からのスクリーニングで見出していたが、今年度、ショットガンクローニングによって当該活性を有するタンパク質(OAD)をコードする遺伝子の取得に成功した。大腸菌で発現させた組換え型 OAD の基質特異性を調査したところ、4MSA の他に β -レゾルシン酸やオルセリン酸(2,4-dihydroxy-6-methylbenzoic acid)に対する脱炭酸活性を示し、これら芳香族カルボン酸を合成する炭酸固定活性の存在も明らかにした。

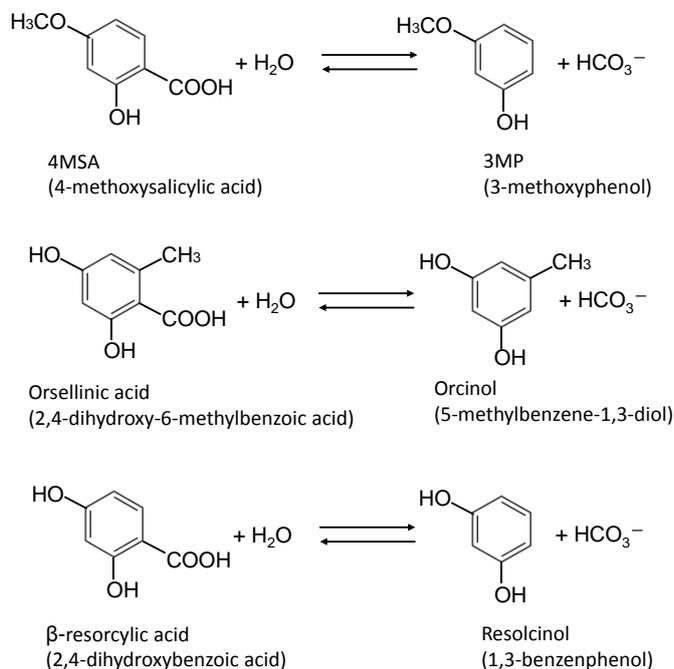


Fig. 5. OAD の基質特異性と可逆的脱炭酸活性

なお、上記 OAD の取得と同様に、6-メトキシサルチル酸(6MSA)を単一炭素源としたスクリーニングにより、6MSA に対する脱炭酸活性を有する微生物 *Cupriavidus* sp. TK を取得した。ショットガ

スクリーニングにより当該活性を有する遺伝子を取得し、組換え型タンパク質(6MSDC)の取得に成功した。6MSDC について、6MSA およびカルボキシ基の配置が異なる 4MSA に対して脱炭酸活性を検討したところ、どちらの化合物に対しても脱炭酸活性を示すことを明らかにした。6MSA および 4MSA の脱炭酸産物である 3-メトキシフェノール(3MP)に対する炭酸固定活性を検討したところ、予想に反して 6MSA の生成は観察されず、4MSA の生成のみが観察された (Fig. 6)。6MSDC が OAD と同様に 4MSA に対する可逆的脱炭酸活性を示したことから、これらの一次構造が類似している可能性を考え、その比較を行った。その結果、6MSDC は OAD とはあまり類似しておらず (Identity: 37%)、寧ろ 6MSA とは構造が異なる 2-ヒドロキシ-1-ナフトエ酸に対する可逆的脱炭酸酵素と類似していた (Identity: 82%)。現在、当該酵素の機能解析を行っている。

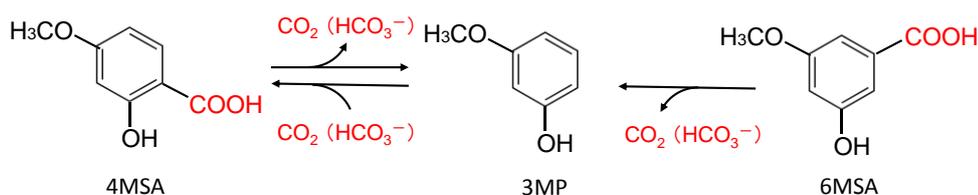


Fig. 6. 6MSDC の基質特異性と可逆的脱炭酸活性

(2) 芳香族ジカルボン酸を対象とした可逆的脱炭酸酵素の探索

芳香族ジカルボン酸に対する可逆的脱炭酸酵素を取得するため、4-ヒドロキシイソフタル酸 (4HIPA) を単一炭素源としたスクリーニングにより、4HIPA に対する脱炭酸活性を有する微生物 *Cystobasidium slooffiae* HTK3 を取得した。4HIPA に対する分解活性を指標とした精製により、脱炭酸活性を示す精製タンパク質を取得した。精製タンパク質から得られた N 末端アミノ酸配列を基に作製した縮重プライマーを用いて、3'-RACE 法により当該脱炭酸活性を担う酵素をコードする遺伝子を取得し、4HIPA に対して可逆的脱炭酸活性を有する組換え型タンパク質 (4HIDC) を調製した (Fig. 7)。現在、4HIDC の基質特異性など、その生化学的諸性質の解明を行っている。

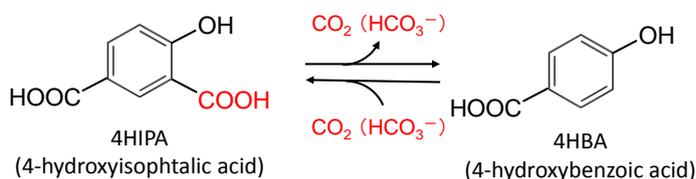


Fig. 7. 4HIDC の可逆的脱炭酸活性

2.4 アデニル化酵素を利用したアミド化合物合成の拡張

アミド化合物は化成品や医薬品、機能性食品素材などとして利用される有用化合物である。我々はこれまでに、非リボソーム型ペプチド合成酵素(NRPS)のアデニル化ドメイン(A ドメイン)や fatty acyl-AMP ligase(FAAL)といったアデニル化酵素に属する酵素を利用したアミド化合物合成法を開発しており (Fig. 8)、多種多様なアミド化合物の合成に成功している。今年度は合成可能なアミド化合物のさらなる拡張を目指し、D-アミノ酸を含むジペプチドをはじめ、環状ジペプチドであるジケトピペラジンおよびフェルラ酸アミドの合成法開発を検討した。

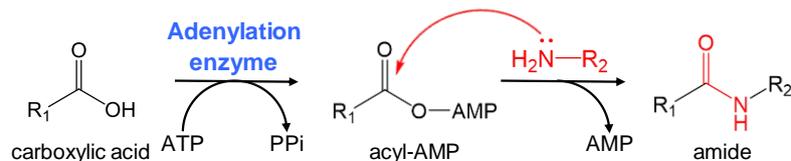


Fig. 8. アデニル化酵素と化学的求核置換反応がドッキングしたアミド化合物合成

(1) D-アミノ酸を含むジペプチドの合成

Fig. 8 で示される新規アミド化合物合成法においてジペプチドを合成する場合、その N 末端側基質はアデニル化酵素 (A ドメイン) の基質特異性による制限を受けるが、C 末端側はキラリティに関係なく求核活性を有する任意のアミノ酸が導入可能になる。我々はこれまでに *Brevibacillus parabrevis* IAM1031 由来 tyrocidine synthetase の A ドメイン(TycA-A)が D-Trp, D-Phe, D-Tyr, D-Ala, D-Leu, D-Met の 6 種類、*Bacillus licheniformis* NBRC 12199 由来 bacitracin synthetase の A ドメイン(BacB2-A)が D-Lys を基質とすることを見出している。そこで、N 末端側基質として D-Trp (TycA-A) または D-Lys (BacB2-A)、C 末端側基質として 20 種類のタンパク質構成性アミノ酸の D-体 (D-Xaa) を用いてジペプチド合成試験を行ったところ、使用した C 末端側基質に対応した D-Trp-D-Xaa あるいは D-Lys-D-Xaa が生成した。本結果は Fig. 8 の反応特性を反映したものであり、多様なジペプチドの合成可能性を実証できた。さらに、N 末端に導入可能な D-アミノ酸の拡張を目的として D-アミノ酸をアデニル化可能な酵素を探索を行った。*Bacillus subtilis* 168 由来のアデニル化酵素である DltA が Gly, D-Ala, D-Val, D-Cys, D-Ser, D-Thr を基質としてアデニル化した後に L-Cys との間でチオエステル中間体を經由してアミド結合を形成するという知見(T. Abe, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **291**, 1735-1750 (2016))に着目し、Fig. 8 の機構を利用すれば C 末端側基質は L-Cys に限定されないと推測し検証した。その結果、予測通りチオール基を持たない D-Pro を C 末端側基質として利用した場合でも Gly, D-Ala, D-Val, D-Ser, D-Thr との間でアミド結合が形成され、D-Xaa-D-Pro が生成した。以上、D-Ser や D-Thr といった側鎖にヒドロキシ基を有する D-アミノ酸を N 末端に配するジペプチドの合成への拡張に成功した。

(2) ジケトピペラジンの合成

ジケトピペラジン(DKP)はジペプチドのアミノ基とカルボキシ基が縮合し環状化した化合物であり、抗菌性や抗腫瘍性、抗高血糖性など様々な生理活性を示すものが報告されている。既報の酵素を利用したDKP合成法では、酵素の触媒機能によりジペプチドエステルやジペプチドチオエステルが生成した後、非酵素的な分子内環化によりDKPが生成することが示唆されている。そこで、NRPSのAドメインを利用したアミド化合物合成法を応用し、基質としてアミノ酸、求核剤としてアミノ酸エステルを用いることで、ジペプチドエステルを經由したDKP合成が可能であると推測した (Fig. 9)。

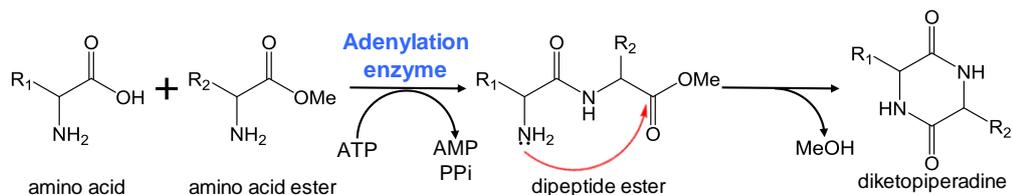


Fig. 9. アデニル化酵素によるジペプチドエステル生成と分子内環化による DKP 合成

NRPSのAドメインとしてTycA-A、基質アミノ酸としてL-Trp、L-Tyr、アミノ酸エステルとしてL-Pro-OMe、L-Trp-OMe、L-Phe-OMe、L-Ser-OMe、L-Ile-OMeを用いてDKP合成を行った。L-TrpとL-Pro-OMe、L-Trp-OMe、L-Ser-OMeの組み合わせおよびL-TyrとL-Pro-OMe、L-Trp-OMeの組み合わせで予想されるDKPであるcyclo(L-Trp-L-Pro)、cyclo(L-Trp-L-Trp)、cyclo(L-Trp-L-Ser)、cyclo(L-Tyr-L-Pro)、cyclo(L-Tyr-L-Trp)が生成した。したがって、NRPSのアデニル化ドメインを用いたDKP合成が可能であることを明らかにした。D-アミノ酸を含むジペプチドの合成の検討にて得られたAドメインに関する知見を踏まえると、今後D-アミノ酸を含むDKPの合成への展開も期待でき、立体異性体を含めた多様なDKPが合成可能であると考えられる。

(3) フェルラ酸アミドの合成

フェルラ酸アミドはフェルラ酸と各種アミンが縮合した化合物であり、日焼け止め化粧料や糖尿病治療薬、植物の萌芽抑制剤などへ用いられる有用化合物である。フェルラ酸アミドは有機合成化学的手法により合成可能であるが、多段階で煩雑、副生成物の生成、有毒試薬や有機溶媒の使用に伴う環境負荷などの課題があり、新規合成法が求められている。そこで、我々が開発したアミド合成法を応用することで、フェルラ酸をアデニル化可能な酵素によりフェルラ酸アミドの合成が可能になると考えた。フェルラ酸を基質としてコエンザイムA(CoA)との縮合を触媒するフェルロイルCoA合成酵素(FCS)やフェルラ酸の構造類似体である4-クマル酸とCoAの縮合を触媒する4-クマル酸:CoAリガーゼ(4CL)に目的活性があると推定し、検討を行った (Fig. 10)。

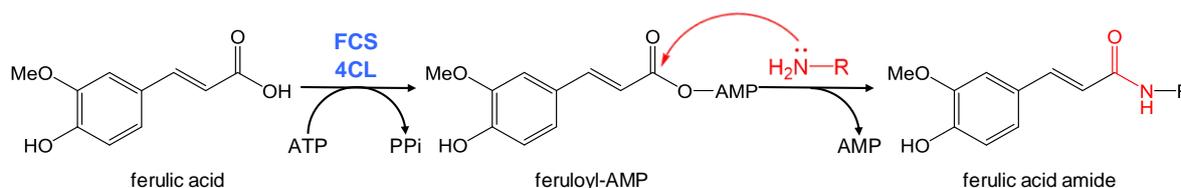


Fig. 10. FCSおよび4CLを利用したフェルラ酸アミド合成

Pseudomonas putida KT2440 由来 FCS および *Arabidopsis thaliana* 由来の 2 つの 4CL(At4CL1, At4CL2)のフェルラ酸に対するアデニル化活性を検証したところ、いずれの酵素も活性を保持していた。そこで、最も活性の高かった At4CL2 を利用し、求核剤アミンとしてメチルアミン、ジメチルアミン、ピペリジン、L-プロリン、D-プロリンの 5 種類を用いてフェルラ酸アミドの合成を試みた。いずれのアミンを用いた場合にも対応したフェルラ酸アミドが生成しており、合成法の開発に成功した。本手法は他の多様なフェルラ酸アミド合成への適用も期待でき、既存技術と比較して簡便かつ環境調和性の高い革新的なプロセスになると考えている。

2.5 アミノ酸リガーゼの高機能化と機能性ジペプチド合成法の開発

(1) イミダゾールジペプチド生産プロセスの開発

イミダゾールジペプチド (カルノシン、アンセリン、バレニン) は、疲労軽減効果や認知症予防効果などの生理機能を有する食材として広く注目されており、社会的背景を受けてその需要の増大が見込まれている。鶏肉や魚肉などからの抽出法に依存しない安定供給可能な低コスト型生産プロセスの開発を目指して、これまでにアミノ酸リガーゼを利用する合成法を開発している。昨年度は、L-アミノ酸リガーゼである YwfE の結晶構造情報とこれまでに知見を踏まえて、合成収量 (変換効率) が大幅に向上した変異型酵素の創製に成功した。その結果、精製酵素反応において 90% 以上収

率でカルノシン(β -Ala-L-His)の合成に成功し、アンセリン(β -Ala-3-methyl-L-His)においても高収率合成を達成することができた。

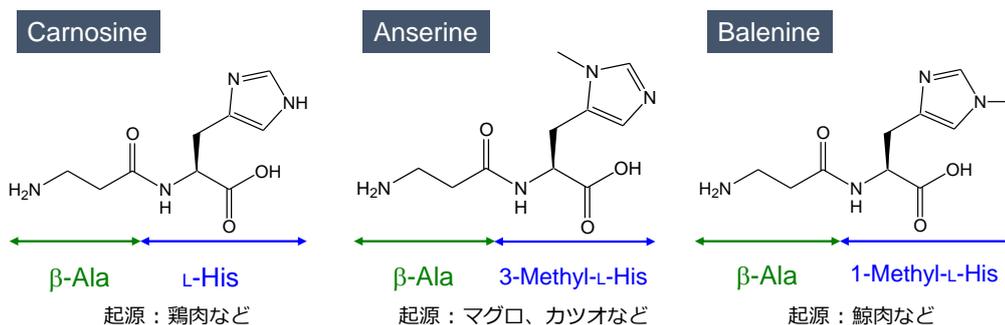


Fig. 11. 抗酸化効果や疲労軽減効果を有するイミダゾールジペプチド

しかし、本反応は等モルの ATP を必要とするため、工業的生産プロセスとして ATP を添加するプロセスは大きな課題となっていたが、宿主大腸菌の糖代謝系による ATP 再生を期待して実施した菌体反応系でのイミダゾールジペプチド生産において、ATP に代えてグルコース添加系でカルノシン、アンセリンいずれも収率 90% 以上の好成績を達成することができた。さらに、カルノシン生産をモデルとして 1L-Jar へのスケールアップにおいて諸条件を検討した。緩衝液から水系に変えて NaOH による pH7.6 下限コントロールした場合も成績の低下はなく、工業生産プロセスとしての可能性を明確に示すことができた。

(2) コラーゲンペプチド生産プロセスの開発

皮膚の老化防止に効果のあるコラーゲンペプチドの市場は拡大しており、我々の開発したアミノ酸リガーゼによるヒドロキシプロリン(*trans*-4-hydroxyprolyl-glycine: OG)を対象に合成可能性を検討した。これまでに、既に塩味増強効果のあるジペプチドとして Pro-Gly を見出しており、*Pseudomonas syringae* 由来のアミノ酸リガーゼ TabS にその合成活性のあることを報告している(J. Biosci. Bioeng. **122**, 155-159 (2016))。そこで、TabS による OG 合成の可能性を確認したところ、問題なく生成することが確認できた。

3. 共同研究者

胡桃坂 仁志(東京大学定量生命科学研究所・教授)

原 良太郎(京都大学大学院農学研究科・特定准教授)

古屋 俊樹(東京理科大学・理工学部・応用生物科学科・講師)

有村 泰宏(ロックフェラー研究所・研究員)

青野 陸(早稲田大学理工学術院先進理工学部・講師任期付)

梅澤 覚(長谷川香料株式会社・技術研究所、早稲田大学先進理工学研究科・博士課程 2 年)

鈴木 伸(先進理工学部・応用化学科・助手)

倉本 歩(早稲田大学理工学術院総合研究所・嘱託研究員、東海物産株式会社・研究員)

4. 研究業績

4.1 学術論文

1. Toshiki Furuya, Masahiko Sai, and Kuniki Kino, “Efficient monooxygenase-catalyzed piceatannol production: application of cyclodextrins for reducing product inhibition”, *J. Biosci. Bioeng.*, **126**(4), 478-481, (2018).
2. Yasuhiro Arimura, Tomonori Kono, Kuniki Kino and Hitoshi Kurumizaka*, “Structural polymorphism of the *Escherichia coli* poly- α -L-glutamate synthetase, RimK”, *Acta Crystallographica Section F* **74**, 385-390 (2018).
3. Shin Suzuki and Kuniki Kino, “Aminoacyl proline synthesis coupled with ATP regeneration using pyruvate phosphate dikinase”, *J. Biochem Biotech*, 2019 Volume **2** issue 1, 70-74 (2019).
4. Soichiro Kano, Shin Suzuki, Ryotaro Hara, and Kuniki Kino, “Synthesis of D-amino acid-containing dipeptides using the adenylation domains of nonribosomal peptide synthetase”, *Appl. Environ. Microbiol.*, *in print*. 2019. DOI: 10.1128/AEM.00120-19
5. Ryotaro Hara, Takeyuki Nishikawa, Takuya Okuhara, Kento Koketsu, and Kuniki Kino, “Ectoin hydroxylase displays selective *trans*-3-hydroxylation activity towards L-proline”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *in print*. 2019. DOI: 10.1007/s00253-019-09868-y

4.2 総説・著書

1. 古屋俊樹, 木野邦器, 解説 (査読有) “微生物・酵素を利用したバニリンの合成”, *日本醸造協会誌*, **113**(2), 64-70 (2018).
2. 荒勝俊, 木野邦器, (査読有) “早稲田地球再生塾が目指す”Society 5.0+”の世界”, *生物工学会誌*, **96**(12), 720-721 (2018).
3. 木野邦器, (査読有) “超スマート社会実現に向けた生物工学の使命”, *バイオサイエンスとイノベーション*, **75**(6), 486-487 (2018).
4. 木野邦器, (査読有) “科学技術研究の方向性”, *化学と工業*, **72**(2), 105 (2019).
5. 木野邦器, 古屋俊樹 (分担執筆): 細胞・生体分子の固定化と機能発現, 監修: 黒田章夫, 第2編細胞の固定化と機能発現, 第18章固定化微生物・酵素を用いた有用物質生産法の技術開発, pp.177-pp.186, シーエムシー出版, 東京, 2018年4月. ISBN978-4-7813-1326-9

4.3 招待講演

1. 木野邦器, “生産現場から学ぶ知恵と新たなバイオプロセスの開発”, *日本生物工学会 2018年度(第25回)九州支部鹿児島大会特別講演*, 講演要旨集 p.19, 鹿児島大学農学部 (鹿児島) 2018年12月1日
2. 木野邦器, “有用物質生産プロセスの開発に向けた酵素の探索と戦略”, *やまぐちバイオ関連産業推進協議会スタートアップセミナー基調講演*, 翠山荘: 山口市湯田温泉, 2019年2月5日

4.4 受賞・表彰

無し

4.5 学会および社会的活動

1. 佐々木楓, 鈴木伸, 木野邦器, “アデニル化酵素を利用した芳香族カルボン酸アミドの合成”, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2A10a01, 名城大学 (名古屋)
2. 鈴木伸, 宇留野樹生, 木野邦器, “アスパラギン酸合成酵素を利用した□-アスパルチルアミド合成”, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2A10a02, 名城大学 (名古屋)
3. 村瀬諒大, 原良太郎, 梶沢 遼, 広川安孝, 木野邦器, “*Arthrobacter sp. K8* 由来オルセリン酸脱炭酸酵素の特性解析と当該酵素を利用した有用芳香族ヒドロキシカルボン酸合成”, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2A10p19, 名城大学 (名古屋)
4. 賀野壮一郎, 鈴木伸, 原良太郎, 木野邦器, “D-アミノ酸含有ジペプチドの汎用的な酵素合成法の開発”, 日本生物工学会 2018 年度大会, 3Ma02, 要旨集 : p283, 関西大学 (大阪)
5. 駒林卓磨, 倉本歩, 木野邦器, “菌体反応系によるイミダゾールジペプチドの効率的生産法の開発”, 日本生物工学会 2018 年度大会, 3Ma03, 要旨集 : p283, 関西大学 (大阪)
6. 齋藤翼, 青野陸, 古屋俊樹, 木野邦器, “大腸菌包括菌体によるバニリンの効率的生産プロセスの開発”, 日本生物工学会 2018 年度大会, 3La10, 要旨集 : p282, 関西大学 (大阪)
7. 木野邦器, “生産現場から学ぶ知恵と新たなバイオプロセスの開発”, 日本生物工学会 2018 年度 (第 25 回) 九州支部鹿児島大会特別講演, 講演要旨集 p.19, 鹿児島大学農学部 (鹿児島) 2018 年 12 月 1 日
8. 梅澤覚, 木野邦器, “鉄還元酵素を利用した香気を有するセスキテルペノイド(-)-ロタンドン合成法の開発”, 日本農芸化学会 2019 年度大会, 1D7p03, 東京農業大学 (東京) 2019.3.24. ポスター発表 (優秀発表) ポスター番号 : P091 17:10-18:10
9. 倉本歩, 駒林卓磨, 木野邦器, “菌体反応系を利用したイミダゾールジペプチド生産技術の開発”, 日本農芸化学会 2019 年度大会, 1D7p12, 東京農業大学 (東京)
10. 西田穂高, 青野陸, 吉原朋矢, 木野邦器, “芳香族ジカルボン酸に対する新規可逆的脱炭酸酵素の探索”, 日本農芸化学会 2019 年度大会, 3E2p04, 東京農業大学 (東京)
11. 吉原朋矢, 青野陸, 木野邦器, “4-hydroxyisophthalic acid に対する新規可逆的脱炭酸酵素の同定と遺伝子解析”, 日本農芸化学会 2019 年度大会, 3E2p05, 東京農業大学 (東京)

5. 研究活動の課題と展望

これまで微生物の有する多様な機能を高度に活用した有用物質生産に向けた研究を展開してきた。従来の技術や知見を踏まえつつ、新たな酵素機能を見出し、従来にない革新的なプロセスを開発することもできた。

昨年度までに開発した非リボソーム型ペプチド合成酵素 (NRPS) のアデニル化ドメイン (A ドメイン) や fatty acyl-AMP ligase (FAAL) のようなアデニル化酵素を利用したアミド化合物合成法は、微生物酵素の機能と化学的な求核置換反応をドッキングさせた革新的なアミド結合形成反応の開発であり、創薬や機能性化成品などの製造技術としてバイオ産業に貢献するものと考えられる。今年度の成果であるキラリティに関係しない任意のペプチド合成技術の開発は、医薬品や化学品等への素材提供を可能とする実用的プロセスであり、工業化に向けて高活性の反応系を構築していく予定である。

疲労軽減効果や認知症予防効果等を有するイミダゾールジペプチドの安価で安定供給が可能なバイオプロセスの開発は、現代社会において強く求められており、今年度の研究で ATP の外部添加の必要性がなく、pH 制御による菌体反応により高収率でのカルノシン(β -Ala-L-His)やアンセリ

ン(β -Ala-3-methyl-L-His)の生産が可能となった。また、興味深い点として、ペプチドはその生分解性のため微生物菌体を用いた生産が困難と思われてきたが、大腸菌においては β -Ala-Xaaなるジペプチドの場合、その分解が抑制されることを見出したことはペプチドの工業化生産において大きな知見を与えることとなった。また、現在最もニーズの大きいアンセリンの生産に関しては、ヒスチジンのメチル化プロセスの開発が律速になっているが、カルノシンをメチル化してアンセリンに変換する酵素を酵母に見出しており、今後、当該酵素の改変等による収量増に注力する予定である。現代社会において問題となっている精神的疾患に対応可能な食品素材として期待されているイミダゾールジペプチドの安価な提供は健康社会増進に貢献するものと期待できる。

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、今年度、芳香族モノカルボン酸に加え、芳香族ジカルボン酸の合成も可能とする新規可逆的脱炭酸酵素の発見に成功しており、また、生分解性プラスチック素材として注目されているフランジカルボン酸のバイオマス資源からの合成法の開発に向け、現在取り組んでおり、土壌からのスクリーニングによって可能性のある微生物を最近取得しており、新たな炭酸固定酵素による当該研究の発展が期待できる。低炭素化社会の要請に応える革新的な技術として引き続き推進していく予定である。

微生物機能の利用による高機能物質の創出や有用物質の革新的な生産技術の開発は、第5期科学技術基本計画(Society 5.0)に合致するものであり、OECDが提唱しているバイオエコノミーの実現に大きく貢献するものである。昨年度、理工総研を場として「早稲田地球再生塾(WERS)」を立ち上げ、バイオテクノロジーに限定しない学術分野を対象にシンポジウムやコロキウムを開催した。我々は、Society 5.0をさらに高度化したSociety 5.0+を提唱しており、物理的にも心理的にも人に幸せと豊かさを与える科学技術の在り方を議論している。

人類が直面している地球規模で起きている喫緊の課題に対し、国連はSDGsを推進しているが、その多くのゴールに対して解決のカギを握るバイオテクノロジーを実効性のある具体的なツールとしてブラッシュアップしていくことは我々の使命であると考えている。そうした意識を持ちながら、本研究PGを着実に推進していくつもりである。