

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

香料は食品や化粧品に香りを付加する揮発性の低分子化合物で、人々の豊かな生活を演出することができる。中でも、主に植物に含まれ、幅広い種類の香料に利用されるテルペノイドには、それ自体の強力かつ特徴的な香気に加え、香気全体の質を高める効果や抗腫瘍効果等の様々な生理的機能が見出されており、その産業有用性が高く注目されている。しかし、有用なテルペノイドの天然含量は ppm オーダーと極僅かであり、その工業的利用には安定供給を可能とする効率的な合成プロセスの構築が必要不可欠となっている。そこで我々はこの課題に対し、テルペノイド合成活性を有する微生物探索を通じて、微生物細胞内に普遍的に存在する鉄に着目し、還元鉄錯体(Fe^{2+} -chelate)を用いたテルペノイドの酸化的合成手法を見出した。そして、その反応系内における連続的な再生と供給を目的として鉄還元酵素(ferric-chelate reductase)を共役させることで、触媒酸化反応と酵素的還元による触媒再生反応を組み合わせた新規テルペノイド合成系を開発した(Fig. 1)。

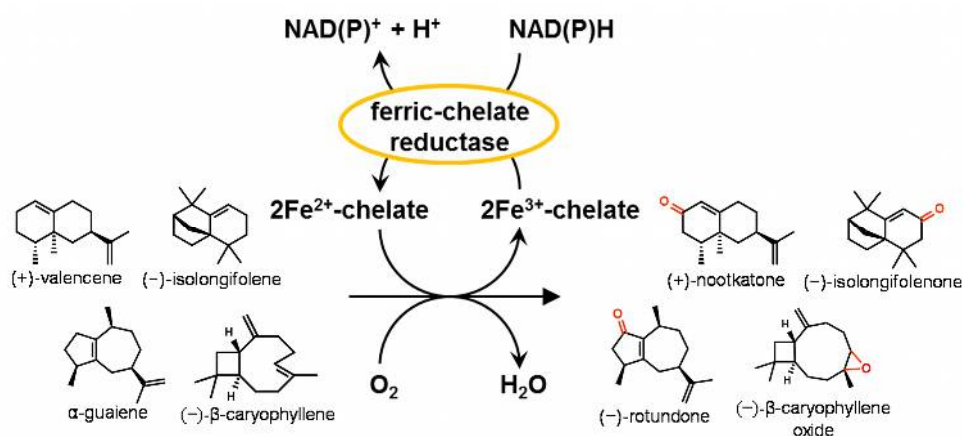


Fig. 1. Fe^{2+} -chelate および ferric-chelate reductase を用いたテルペノイドの化学酵素的合成系

当該反応系では、酸化触媒である Fe^{2+} -chelate とその供給を担う ferric-chelate reductase がそれぞれ独立しており、両者を柔軟に選択できる。従って、目的となるテルペノイドに適した反応系を個別にデザインすることが可能であり、香料として有用な(+)-nootkatone や(-)-isolongifolenone などの多様な構造のテルペノイドを酸化的に合成することに成功した(Fig. 2)。

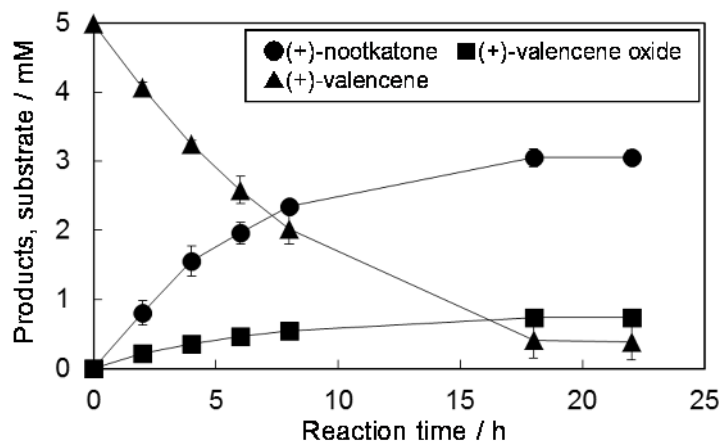


Fig. 2. 新規合成系を用いた(+)-nootkatone の合成

2.2 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) 6-メトキシサリチル酸脱炭酸酵素を用いた芳香族カルボン酸の合成

これまでに土壌からのスクリーニングにより 6-メトキシサリチル酸(6MSA)に対する脱炭酸活性を有する微生物 *Cupriavidus* sp. TK、および当該活性を示す脱炭酸酵素(6MSDC)の取得に成功している。さらに、6MSA およびカルボキシ基の配置が異なる 4MSA に対して 6MSDC の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有することを明らかにした。興味深いことに 6MSA および 4MSA の共通の脱炭酸反応産物である 3-メトキシフェノールに対する炭酸固定活性を検討したところ、6MSA は生成せず 4MSA のみ生成した。

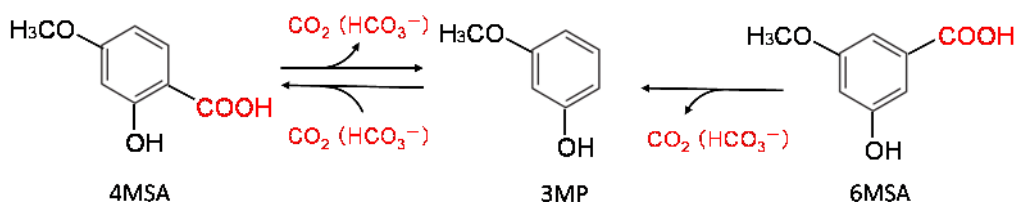


Fig. 3. 6MSDC の基質特異性と可逆的脱炭酸活性

今年度はさらなる芳香族カルボン酸合成の可能性を考え、6MSDC の基質特異性の検討を行った (Fig. 4)。30 種類の芳香族カルボン酸に対して評価したところ、6MSA および 4MSA に加えて 9 種類の新規芳香族カルボン酸に対して脱炭酸活性を示すことを明らかにした。一方、これらの脱炭酸反応産物に対する炭酸固定活性を評価したところ、4MSA に加えてサリチル酸や 2,3-ジヒドロキシ安息香酸、4-メチルサリチル酸など 6 種類の芳香族カルボン酸合成能を有することを明らかにした。とくに複素環である 2-ナフトールから 2-ヒドロキシ-1-ナフトエ酸を合成する可逆的脱炭酸酵素の存在を明らかにしたのは本報告が初めての例である。

(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の取得を目的として、これまでに 4-ヒドロキシイソフタル酸 (4HIPA) に対して脱炭酸活性を有する微生物 *Cystobasidium slooffiae* HTK3 の取得と、目的の 4HIPA に対する可逆的脱炭酸酵素遺伝子 *4hdc* の取得に成功した。当該遺伝子の配列相同性から新規酵素であることが示された。また、大腸菌で高発現させた組換えタンパク質(4HIDC)を用いて生化学的諸性質について詳細な解析を行った。興味深いことに、既知の可逆的脱炭酸酵素の多くは濃度依存的に活性が上昇するのに対し、4HIDC は高濃度の KHCO_3 存在下において活性が低下することを見出した。カルボキシ基を有さない化合物を基質として炭酸固定反応を触媒する従来の酵素との構造特性からこの現象を考察した。4HIPA 以外には 5-カルボキシバニリン酸に対して可逆的脱炭酸活性を示す程度で、基質特異性は低かった。

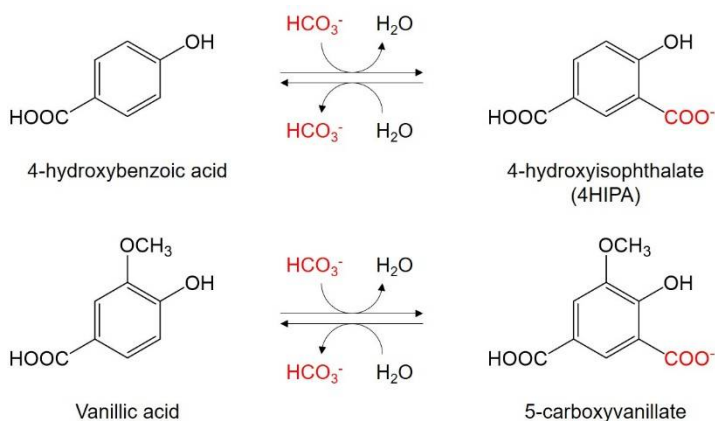


Fig. 4. 4HIDC の可逆的脱炭酸活性と基質特異性

(3) フランジカルボン酸脱炭酸酵素の取得と新規可逆的脱炭酸反応システムの構築

機能性高分子として広く使用されている PET に代わるバイオ樹脂としてポリエチレンフタレート (PEF) が注目されている。PEF の原料となる 2,5-furandicarboxylic acid (FDCA) は米国エネルギー省が選定したバイオリファイナリーの C6 プラットフォーム化合物であり、様々な有用化成品の中間体としての利用価値も高いことが知られている。バイオマスから供給可能な C5 化合物であるフルフラールはバイオマス資源であるリグノセルロースからの大量供給が可能である。そのため、フルフラールからの効率的な FDCA 合成法の開発を検討した。フルフラールを酸化して得られる 2-furoic acid (FA) に対して炭酸固定を行うことで FDCA が合成できる (Fig. 5)。

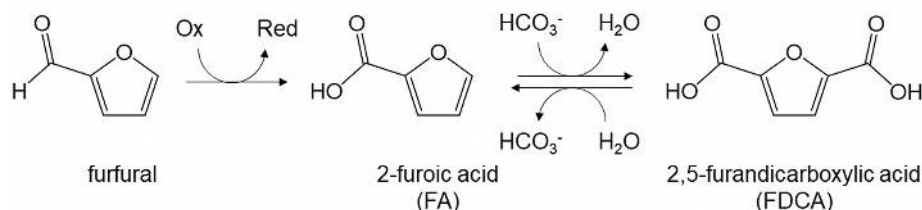


Fig. 5. 新規バイオプロセスによるフルフラールからのフランジカルボン酸合成

そこで、FA から FDCA を合成可能な可逆的脱炭酸酵素の探索を行った。酵素探索に先立ち、FDCA を資化する微生物を土壌より探索した。炭素源を工夫した培地を用いた集積培養により、フルフラールから FA を介して FDCA を合成可能な微生物株 *Paraburkholderia fungorum* KK1 を取得することができた。さらに同属のゲノム解析株の遺伝子情報から、当該活性のうち FA から FDCA 合成反応を触媒する炭酸固定酵素 FDDC をコードする遺伝子 *fdde* のクローニングに成功した。FDDC はユビキチン合成に関わる酵素群である UbiD/UbiX システムに属する非酸化的脱炭酸反応を触媒する新規酵素であり、従来の芳香族カルボン酸に対する可逆的脱炭酸酵素とは異なる炭酸固定反応システムが期待できる。FDDC 高発現大腸菌を用いた菌体反応を行ったところ、フルフラールから FA を経由した FDCA 合成を確認することができた。本研究の新たな展開として、既知の UbiX を高発現させた大腸菌を宿主とする新規 UbiD 探索のためのプラットフォームの構築にも成功した。

2.3 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。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. 6)、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。

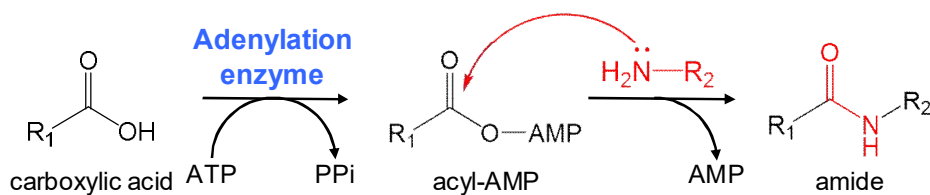


Fig. 6. アデニル化酵素と化学的求核置換反応がドッキングしたアミド化合物合成

(1) D-アミノ酸を含むジペプチドの合成

Fig. 6 で示されるアミド化合物合成法で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。昨年度は *Bacillus subtilis* 168 由来の DltA が基質を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経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. 6 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を行った。その結果、予測通りチオール基を持たない D-Pro を C 末端側基質とした場合でも DltA によってアデニル化した N 末端側基質(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。

今年度は、本反応システムにおける C 末端側基質のさらなる拡張性を検証するため、D-Ala を N 末端側基質として、一方、C 末端側基質として様々な性質のアミノ酸(Cys, Pro, Leu, Phe, Gln, Glu, Lys)の L-体および D-体を用いて反応を行った。その結果、側鎖の種類や性質に依存せず、すべての組み合わせにおいて対応するジペプチド(D-Ala-L-Xaa または D-Ala-D-Xaa)の生成を確認した。さらにアミノ酸のみならず、メチルアミンやエチルアミン、ピペリジンといった直鎖あるいは環状の

アミンも D-Ala との間でアミド結合が形成可能であることを確認した。これまでに検討してきた NRPS の A ドメイン同様、DltA についても多様な D-アミノ酸を含むジペプチドやアミド化合物の合成能があることを示した。

(2) ジケトピペラジンの合成

ジケトピペラジン(DKP)は2分子のアミノ酸で構成される環状ジペプチドであり、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。DKPの生理活性は構成するアミノ酸の種類やキラリティーの違いにより大きく異なるため、これらを制御可能な合成法の開発には大きな意義がある。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、自発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経由したDKP合成が可能であると推測した(Fig. 7)。

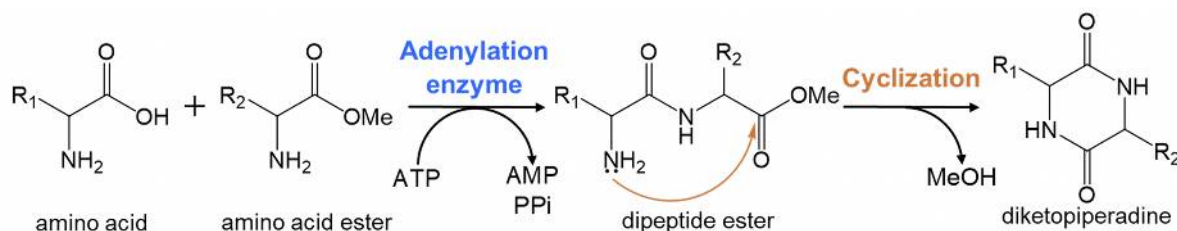


Fig. 7. アデニル化酵素によるジペプチドエステル生成と分子内環化による DKP 合成

昨年度は、*Brevibacillus parabrevis* IAM 1031由来tyrocidine synthetase Aのアデニル化ドメイン(TycA-A)を利用し、L-アミノ酸およびL-アミノ酸エステルを原料としたDKP合成が可能であることを明らかにした。今年度は、TycA-AがL-アミノ酸のみならずD-アミノ酸も基質とするという我々が見出した知見をもとに、D-アミノ酸およびD-アミノ酸エステルにも拡張し、様々なキラリティーを有するDKPの作り分けを検討した。なお、DKP合成反応は、アデニル化反応を促進可能なピロフォスファターゼを添加した条件下で行った。

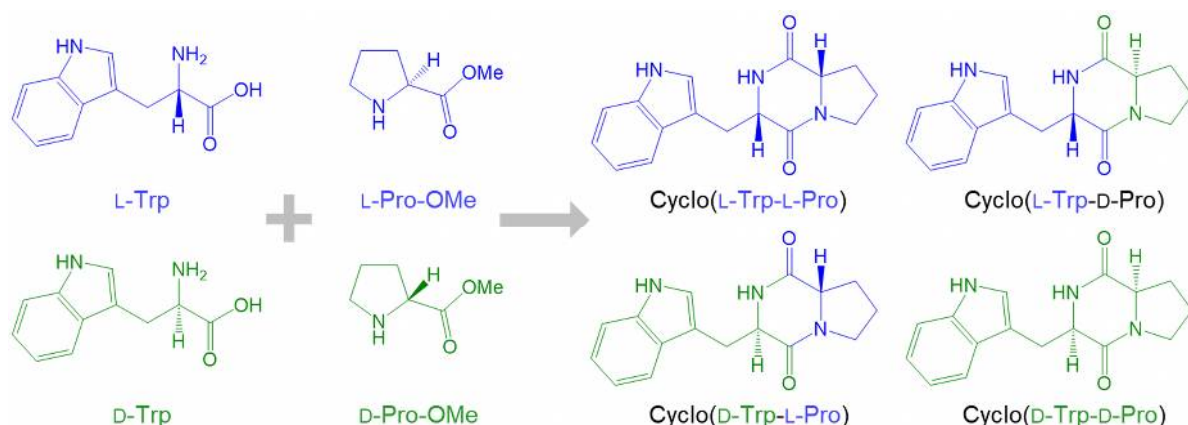


Fig. 8. 原料アミノ酸、アミノ酸エステルのキラリティーと生成DKPのキラリティー

アミノ酸にL-TrpまたはD-Trpをアミノ酸エステルにL-Pro-OMeまたはD-Pro-OMeを用いてcyclo(Trp-Pro)の光学異性体4種類の合成を試みた。全ての組み合わせでcyclo(Trp-Pro)の分子量と一致する生成物が得られた。さらに、キラルカラムを用いてこれら生成物の分離を行うと、4つのピークに分離することができ、それぞれキラリティの異なるcyclo(Trp-Pro)であることが確認できた (Fig. 8)。同様に、アミノ酸にL-PheまたはD-Phe, L-TyrまたはD-Tyr, L-MetまたはD-Metを使用した場合にも、それぞれキラリティの異なる4種類のcyclo(Phe-Pro), cyclo(Tyr-Pro), cyclo(Met-Pro)の生成が確認できた。すなわち、原料のキラリティを選択することで異なるキラリティを有する任意のDKPの作り分けに成功した。本手法は、他のD-アミノ酸を認識するAドメインに対しても適用可能であり、キラリティを制御した汎用的なDKP合成法となるものと考えている。

(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。昨年度、フェルラ酸の構造類似体である4-クマル酸とコエンザイムA(CoA)との縮合反応を触媒する*Arabidopsis thaliana*由来4-クマル酸: CoA リガーゼ (At4CL2) がフェルラ酸を基質とすることを見出し、At4CL2を利用した酵素的なフェルラ酸アミド合成法を開発した (Fig. 9)。

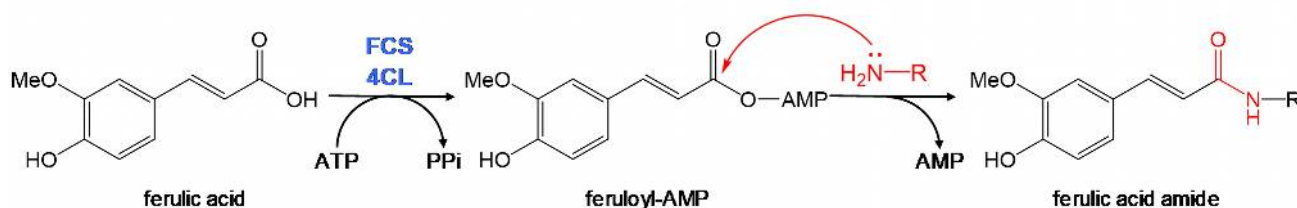


Fig. 9. FCSおよび4CLを利用したフェルラ酸アミド合成

これまでに、フェルラ酸に対してメチルアミン、ジメチルアミン、ピペリジン、L-プロリン、D-プロリンの5種類のアミンが反応し、対応するフェルラ酸アミドが生成することを明らかにしている。今年度、新たにアンモニア(塩化アンモニウム)、チラミン、トリプタミン、セロトニンが求核剤アミンとして反応することを確認した。これら9種類のフェルラ酸アミドについて、基質フェルラ酸の減少量から合成量を算出したところ、1.0~2.4 mM (対添加基質収率 20~48%)であった。

At4CL2が本来の基質である4-クマル酸のみならずフェルラ酸も基質としたことから、他の構造類似体に対してもアデニル化活性を示すのではないかと考え、詳細な基質特異性評価を行った。10種類の桂皮酸誘導体 (Fig. 10A) に対して評価を行ったところ、桂皮酸、*o*-, *m*-, *p*-クマル酸、*m*-, *p*-メトキシ桂皮酸、カフェ酸、*p*-アミノ桂皮酸の8種類が基質となることが示唆された (Fig. 10B)。すなわち、At4CL2はこれら8種類の桂皮酸誘導体に対してもアミド化活性を示すと考えられ、幅広い桂皮酸アミド誘導体の合成にも利用できると考えられる。

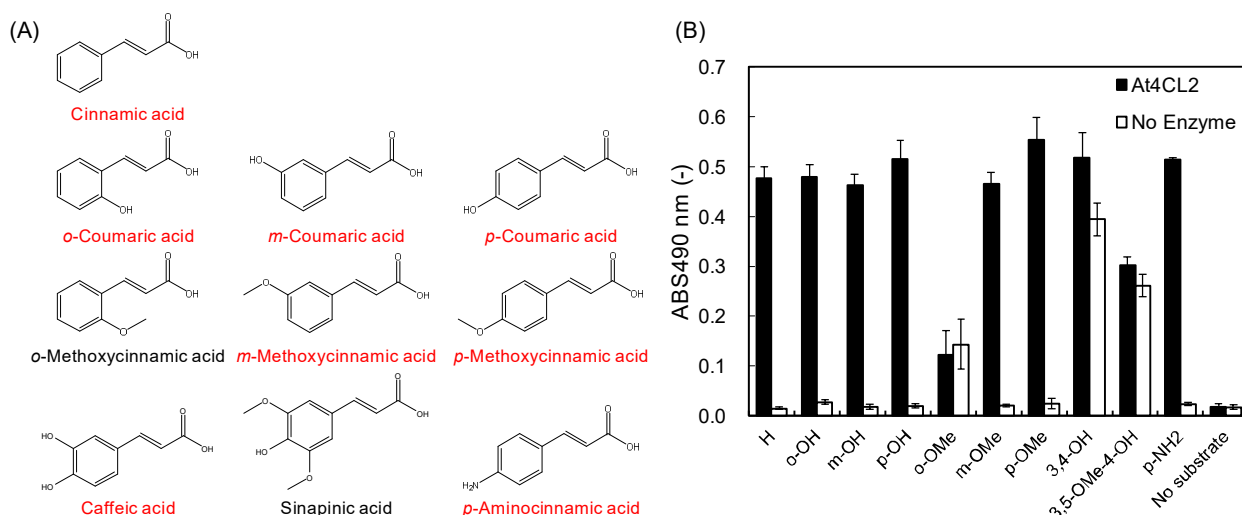


Fig. 10. At4CL2 の基質特異性解析 (A) 評価対象化合物 (B) 比色分析による評価結果

(4) ペプチド類似体の合成

ペプチドは様々な生理活性を示すことから医薬への展開が期待されているが、生体内で加水分解を受けやすく膜透過性が低いなど課題が多い。そこでペプチドを構成するアミノ酸を、類似構造を有する他の分子種に置換し、ペプチド類似体とすることでこれらを克服できるのではないかと考えた。具体的にはアミノ酸と構造が類似する α -ケト酸や α -ヒドロキシ酸とアミノ酸から成るジペプチド類似体 (Fig. 11) の合成法開発を試みた。

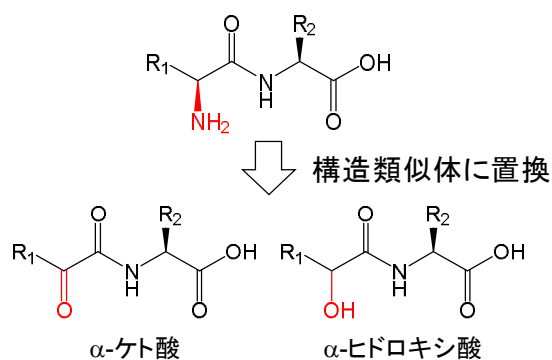


Fig. 11. ジペプチドとジペプチド類似体

まず、 α -ケト酸をターゲットとし、これをアデニル化可能な酵素を探索し、*Streptomyces tsusimaensis* NBRC 13782由来valinomycin synthetaseにおいてピルビン酸のアデニル化を担うAドメイン(Vlm2A)と*Streptomyces* sp. LZ35由来のechoside合成に参与するEchAにおいて、フェニルピルビン酸をアデニル化するAドメイン(EchA-A)に着目した。Vlm2AとLZ35由来EchA-Aのホモログタンパク質である*S. hygroscopicus* NBRC 109436由来EchA-Aの2種類のAドメインを利用して、 α -ケト酸のアミド化によるケトアミド合成を検討した。各酵素の生理基質であるピルビン酸とフェニルピルビン酸に対してL-Proを求核剤として反応させたところ、それぞれ予想されるケトアミドであるpyruvoyl-L-Proおよびphenylpyruvoyl-L-Proの生成が確認できた。

続いて Vlm2A および EchA-A がどのようなカルボン酸を基質とするかどうかを明らかにするため、基質特異性解析を行った。Vlm2A は生理基質のピルビン酸に対応する α -ヒドロキシ酸である L-乳酸および D-乳酸、 α -アミノ酸である L-Ala および D-Ala や炭素鎖の長い α -ケト酪酸も基質とした (Fig. 12)。EchA-A については、生理基質フェニルピルビン酸と構造が類似する芳香族の α -ケト酸、 α -ヒドロキシ酸、 α -アミノ酸など計 17 種類に対して評価を行った。その結果、L-および D-フェニル乳酸や L-Phe, D-Phe をはじめとする 12 種類が基質となることが判明した (Fig. 13)。これら酵素は α -ケト酸、 α -ヒドロキシ酸、 α -アミノ酸をセットで認識可能な点で非常に興味深く、またこのユニ

ークな特性を利用することで、 α -ケト酸や α -ヒドロキシ酸を構成要素とする様々なジペプチド類似体の合成に広く展開できる有用な酵素であると考えている。

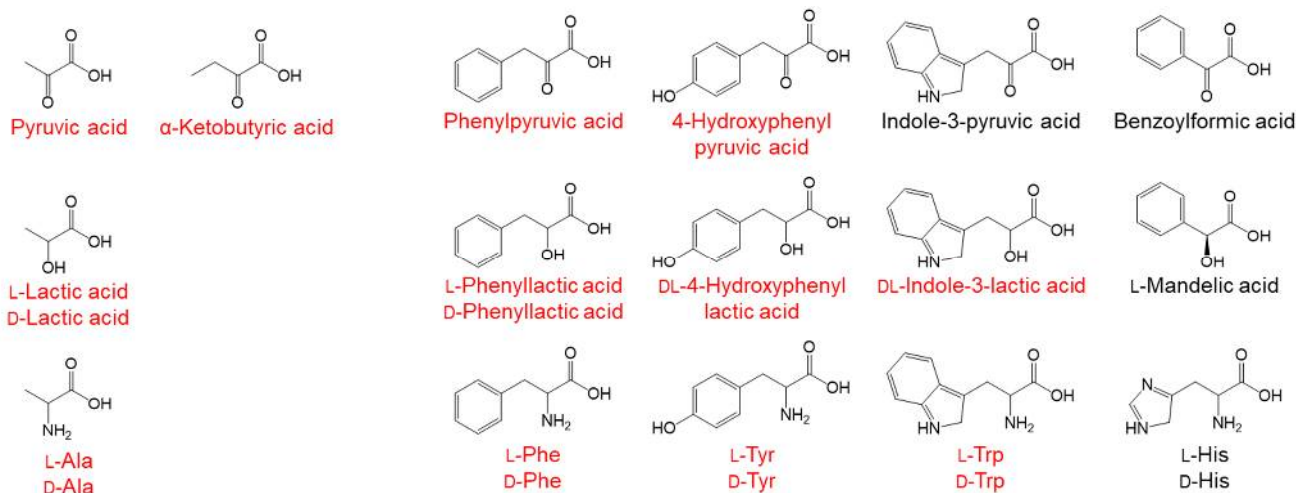


Fig. 12. Vlm2A の基質特異性解析

Fig. 13. EchA-A の基質特異性解析

2.4 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。

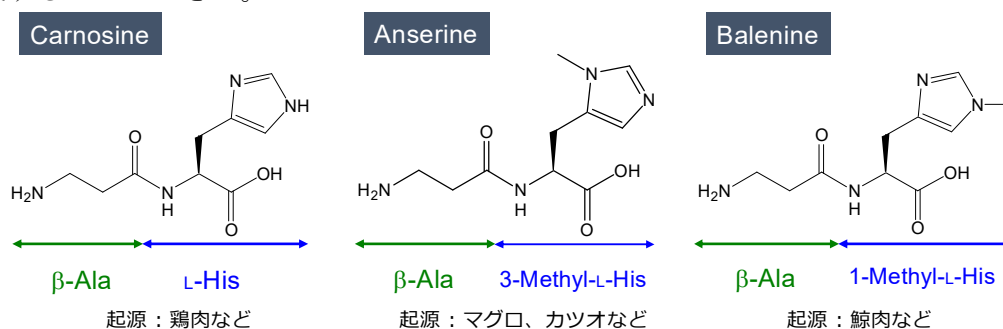


Fig. 14. 抗酸化効果や疲労軽減効果を有するイミダゾールジペプチド

また、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、ヒドロキシプロリルグリシン(*trans*-4-hydroxyprolyl-glycine : OG)を対象に我々の開発したアミノ酸リガーゼを用いる合成可能性を検討した。これまでに、我々は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 合成を検討したところ、問題なく生成を確認した。但し、合成収率が高くなかったため、これまでに TabS で得られている酵素の活性と立体構造相関性に知見を踏まえ、TabS の改変体の作製と活性評価を実施した。

これまでに二重変異体において基質アミノ酸からのモル変換率約 75%を達成しており、さらなる活性向上変異酵素の取得とカルノシンやアンセリン合成と同じように ATP 添加の必要のない菌体反応系による効率的な生産プロセスの開発を検討している。

2.5 水素社会の実現に資するアンモニア生産システムの開発

L-アミノ酸デアミナーゼ(LAAD)は、多様な L-アミノ酸を基質としてアミノ基を酸化的に脱離して α -ケト酸およびアンモニアを生成する酵素である。*Proteus* 属細菌の LAAD は FAD を補酵素とする膜結合型酵素であり、芳香族および脂肪族アミノ酸に作用する type1、塩基性アミノ酸に作用する type2 の基質特異性の異なる二種類が報告されている。*P. vulgaris* 由来 LAAD では type1 の機能は明らかとなっていない。そこで我々は、ゲノム情報から *pv*LAAD の type1 を初めて見出し、大腸菌で発現させた組換え酵素の機能解析を行い、type2 との基質特異性の違いを明らかにした。

これまで活性が低かった脂肪族アミノ酸を含む広範な基質特異性を示す LAAD は、産業上有用な生理活性を有する α -ケト酸だけでなく、水素エネルギーのキャリアとして近年注目を集めているアンモニアを効率的に生産可能である。食品廃棄物などのバイオマス資源に対して LAAD を利用するアンモニアの環境調和型生産プロセスの構築は、持続可能な社会の実現に貢献すると考える。

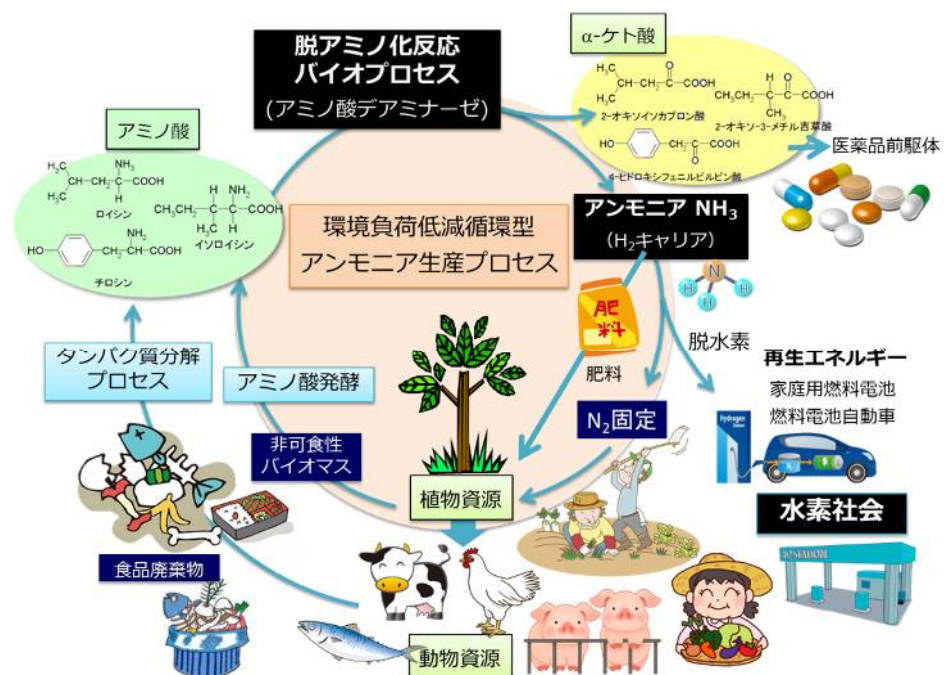


Fig. 15. 環境調和循環型のアンモニア生産プロセスとその概念図

3. 共同研究者

原 良太郎 (京都大学大学院農学研究科・特定准教授)

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 寛 (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3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)

古屋 俊樹 (東京理科大学・理工学部・応用生物科学科・講師)

4. 研究業績

4.1 学術論文

1. 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.*, **85**(13): e00120-19. (2019).
DOI: 10.1128/AEM.00120-19
2. 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.*, **103**(14), 5689-5698 (2019).
DOI: 10.1007/s00253-019-09868-y
3. Toshiki Furuya, Naoto Imaki, Kosuke Shigei, Masahiko Sai, and Kuniki Kino, “Isolation and characterization of Gram-negative and Gram-positive bacteria capable of producing poceatannol from resveratrol”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **103**(14), 5811-5820 (2019).
DOI: 10.1007/s00253-019-09875-z
4. Satoru Umezawa, Shunsuke Konishi, and Kuniki Kino, “Development of a synthesis method for ordor sesquiterupenoid, (-)-rotundone, using non-heme Fe²⁺ chelate catalyst and ferric-chelate reductase”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **83**(10), 1875-1883 (2019).
DOI: 10.1080/09168451.2019.1625264
5. Satoru Umezawa, Hiroko Akao, Mio Kubota and Kuniki Kino, “Chemoenzymatic oxygenation method for sesquiterupenoid synthesis based on Fe-chelate and ferric-chelate reductase”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **84**(4), 780-788 (2020).
DOI: 10.1080/09168451.2019.1707062

4.2 総説・著書

1. Ryotaro Hara, and Kuniki Kino, “Enzymatic reactions and microorganisms producing the various isomers of hydroxyproline”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, in press
DOI: 10.1007/s00253-020-10603-1

4.3 招待講演

1. 木野邦器, “アミノ酸リガーゼを用いたイミダゾールジペプチド合成法の開発”, 第73回日本・栄養食糧学会大会シンポジウム 12「カルノシン・アンセリンの研究の新展開—新しい機能性と実験手法の開発—」, 講演要旨集 p.171, 静岡県立大学 (静岡) 2019年5月19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プロセスの開発”, 公益社団法人 徳山科学技術振興財団 第 22 回研究成果報告会, 株式会社トクヤマ (山口県周南市) 2019 年 11 月 28 日

4.4 受賞・表彰

1. 日本生物工学会 第 27 回生物工学論文賞 2019 年 6 月
受賞論文: Shin Suzuki, Ryotaro Hara, and Kuniki Kino “Production of aminoacyl prolines using the adenylation domain of nonribosomal peptide synthetase with class polyphosphate kinase 2-mediated ATP regeneration”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **125**, 644-648 (2018).
2. 第 21 回生体触媒化学シンポジウム ベストプレゼンテーション賞 2019 年 8 月
松出めぐみ, 岡本姫佳, 木野邦器, “ジオキシゲナーゼを利用した 2-phenyl ethanol からのポリフェノール類の合成”, 第 21 回生体触媒化学シンポジウム, P-39 要旨集: p.78, 金沢工業大学 (石川)
3. 日本生物工学会 トピックス選定発表 2019 年 9 月
宮澤沙哉佳, 梅澤寛, 木野邦器, “*Proteus vulgaris* 由来 L-アミノ酸デアミナーゼの機能解析とアンモニア生産への応用”, 第 71 回日本生物工学会大会, 2Ap17 要旨集: p.193, 岡山大学 (岡山)
4. 日本農芸化学会 優秀発表選定 2020 年 3 月
佐々木 楓, 鈴木 伸, 木野 邦器, “化学酵素的アミド結合形成法を用いたジペプチド類似体の合成”, 日本農芸化学会 2020 年度福岡大会, 講演番号: 4A12a08, P139, 九州大学 (福岡)

4.5 学会および社会的活動

1. 木野邦器, “基質多様性を有するアデニル化酵素の探索と D-アミノ酸ジペプチド生産法の開発”, 公益財団発酵研究所 平成 29 年度一般研究助成成果報告会(ポスター発表), 講演要旨集 p.19, 千里ライフサイエンスセンター (大阪) 2019 年 6 月 7 日.
2. Toshiki Furuya, Masahiko Sai, and Kuniki Kino, “Biocatalytic synthesis of piceatannol from reveratrol by *Ensifer* and *Arthrobacter* strains”, *Biotrans2019*, Poster149, p.207, July 8, 2019 in MartiniPlaza, Groningen (The Netherlands).
3. Satoru Umezawa and Kuniki Kino, “Development of synthesis methods of odor sesquiterpenoids using ferric-chelate reductase”, *Biotrans2019*, Poster467, p.527, July 8, 2019 in MartiniPlaza, Groningen (The Netherlands).
4. Riku Aono, Tomoya Yoshihara, Hotaka Nishida and Kuniki Kino, “A novel reversible decarboxylase towards aromatic dicarboxylic acid”, *Biotrans2019*, Poster13, p.69, July 8, 2019 in MartiniPlaza, Groningen (The Netherlands).
5. 松出めぐみ, 岡本姫佳, 木野邦器, “ジオキシゲナーゼを利用した 2-phenyl ethanol からのポリフェノール類の合成”, 第 21 回生体触媒化学シンポジウム (2019), P-39, p.78, 金沢工業大学 (石川)
6. 梅澤寛, 木野邦器, “ferric-chelate reductase を利用した化学的酵素的的手法によるセシキテルペノイド合成”, 第 21 回生体触媒化学シンポジウム (2019), P-22, p.61, 金沢工業大学 (石川)

7. 木野邦器, “SDGs に対する生物工学研究のあり方”, シンポジウム「持続可能な開発目標 (SDGs) を生物工学にどう活用するか」: 第 71 回日本生物工学会大会(2019), 2S-S1p01, p.146, 岡山大学 (岡山)
8. 原良太郎, 西川健幸, 奥原拓也, 瀬瀬健人, 木野邦器, “*trans*-3-ヒドロキシプロリンの実用生産に向けたバイオプロセス開発”, 第 71 回日本生物工学会大会(2019), 2Ap14, p.193, 岡山大学 (岡山)
9. 梅澤覚, 木野邦器, “Fe²⁺-chelate および ferric-chelate reductase を組み合わせたセスキテルペノイド合成法の開発”, 第 71 回日本生物工学会大会(2019), 2Bp11, p.196, 岡山大学 (岡山)
10. 宮澤沙哉佳, 梅澤覚, 木野邦器, “*Proteus vulgaris* 由来 L-アミノ酸デアミナーゼの機能解析とアンモニア生産への応用”, 第 71 回日本生物工学会大会(2019), 2Ap17, p.193, 岡山大学 (岡山)
11. 青野陸, 森弘樹, 原良太郎, 木野邦器, “4-メトキシサリチル酸を生成する 6-メトキシサリチル酸脱炭酸酵素の発見”, 第 71 回日本生物工学会大会(2019), 2Bp12, p.197, 岡山大学 (岡山)
12. 鈴木伸, 早田優理, 木野邦器, “アデニル化酵素を利用したフェルラ酸アミド合成法の開発”, 第 71 回日本生物工学会大会(2019), 2Ap16, p.193, 岡山大学 (岡山)
13. 勝目智也, 鈴木伸, 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”, 第 71 回日本生物工学会大会(2019), 2Ap15, p.193, 岡山大学 (岡山)
14. 佐々木楓, 鈴木伸, 木野邦器, “Chemoenzymatic なアミド結合形成反応によるケトアミドおよびヒドロキシ酸アミドの合成”, 酵素工学会第 82 回講演会, ポスターB-9, p.62, 東京工業大学 (東京) 2019.11.1.
15. 青木瑠花, 重井宏介, 古屋俊樹, 木野邦器, “グラム陰性細菌およびグラム陽性細菌を用いたポリフェノールの生産”, 酵素工学会第 82 回講演会, ポスターB-10, p.63, 東京工業大学 (東京) 2019.11.1.
16. 柳川洋晟, 勝又智哉, 中島悠太, 原良太郎, 平沢泉, 木野邦器, “ヒスチジンおよびグルタミンを基質とする新規水酸化酵素による反応生成物の絶対構造解析”, 酵素工学会第 82 回講演会, ポスターB-11, p.64, 東京工業大学 (東京) 2019.11.1.
17. 吉原 朋矢, ○青野 陸, 木野 邦器, “新規可逆的脱炭酸酵素 4-hydroxyisophthalic acid decarboxylase の諸性質解明”, 日本農芸化学会 2020 年度福岡大会, 3A15a10, 九州大学 (福岡) 2020.3.27.
18. 佐怒賀 悠, 木野 邦器, “脳神経疾患予防ならびに脳機能改善に資するチロシン含有ジペプチドの生産”, 日本農芸化学会 2020 年度福岡大会, 4A16a03 要旨集: 九州大学 (福岡) 2020.3.28.
19. 川鍋 一樹, 青野 陸, 木野 邦器, “バイオプロセスによるフルフラールからの 2,5-フランジカルボン酸生産”, 日本農芸化学会 2020 年度福岡大会, 4A16a04, 九州大学 (福岡) 2020.3.28.
20. 佐々木 楓, ○鈴木 伸, 木野 邦器, “化学酵素的アミド結合形成法を用いたジペプチド類似体の合成”, 日本農芸化学会 2020 年度福岡大会, 4A12a08, Poster No. P139 優秀発表選定 九州大学 (福岡) 2020.3.28.
21. 唐鎌 翔大, 横田 光希, 鈴木 伸, 木野 邦器, “化学酵素的アミド結合形成システムを応用したキラリティ制御可能なジケトピペラジン合成法の開発”, 日本農芸化学会 2020 年度福岡大会, 4A12a0, 九州大学 (福岡) 2020.3.28.

5. 研究活動の課題と展望

「微生物機能高度活用プロジェクト」も理工総研の支援などを得て、3期にわたり研究を推進してきた。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、従来の技術や知見を踏まえつつ、独創的な戦略と新たな技術の開発によって、これまで報告の無かった新たな酵素機能を微生物に見出し、従来にない革新的なプロセスを開発することもできた。

我々の研究で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。鉄還元酵素を用いたセスキテルペノイド合成も、このアミド結合形成反応と同様に、化学酵素的反応に基づく新たな方法論であり、今後の研究によって大きく展開するものと思われる。

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、宿主の特性を利用した菌体反応系による生産プロセスの開発は、生分解性の高いペプチドの発酵生産への可能性を示す成果となった。菌体反応系によって、ATP の添加の必要のない単純なプロセスでほぼ 100%の変換率でイミダゾールジペプチドの生産が可能となった。今後、企業との連携を強化して工業化を実現していく予定である。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基本的プロセスの開発にも成功した。さらに、新たな炭酸固定酵素群である UbiD/UbiX の利用により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。理工総研において「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、本研究プロジェクトの成果を次期理工総研 PJ「スマートバイオプロセス」に引き継いで、新たな研究手法や技術も取り込みながら着実に研究と技術開発を推進していくつもりである。