

スマートバイオプロセス

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、合成生物学的手法によって機能が高度化した微生物菌体を創製し、産業有用性の高い機能性化合物や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炭酸固定による芳香族カルボン酸合成法の開発、有用ジペプチドやアミド化合物さらには特殊構造を有する環状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 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を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を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。

2.1.1 フランジカルボン酸合成プロセスの開発

近年、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。これまでにバイオプロセスによる FDCA 合成法として、酸化酵素を用いた hydroxymethylfurfural (HMF) からの合成が報告されている (Fig. 1A)。しかし、原料である HMF はバイオマスからの工業的な合成法に課題がある。一方、HMF に類似した C5 化合物である furfural 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、furfural から FDCA を合成できれば、効率的な FDCA 合成が可能になると考えた。Furfural からの FDCA 合成法として、まず furfural を酸化し、その酸化体である 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. 1B)。この FDCA 合成経路構築に必要な FDCA を合成可能な可逆的脱炭酸酵素 (FDCC) は既に自然界から探索した微生物起源の酵素として取得に成功しており、昨年度の ASTE にて報告している。本年度はもう 1 つの鍵酵素である furfural 酸化酵素の探索およびそれらを組み合わせた FDCA 合成プロセスの開発について報告する。

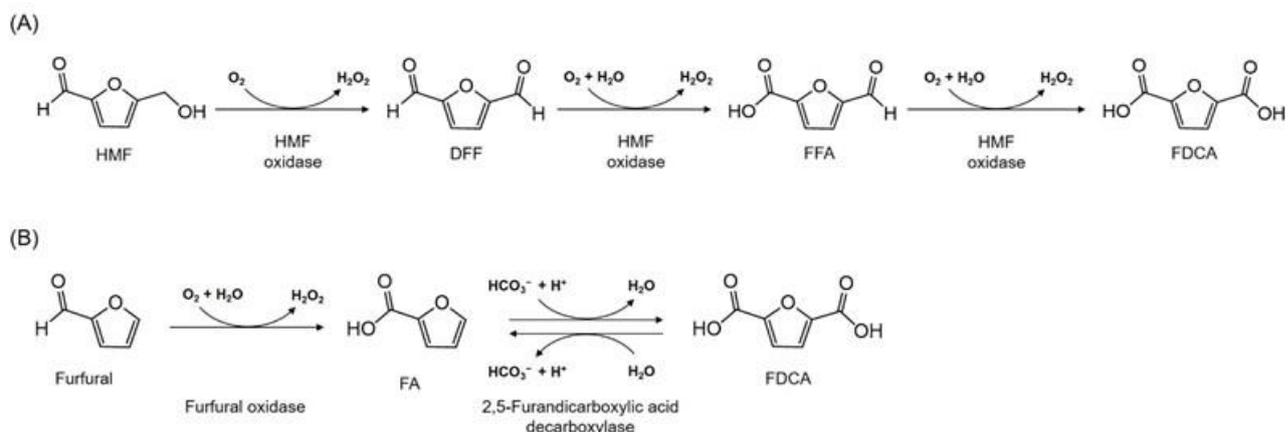


Fig. 1. バイオプロセスによる FDCA 合成経路.

昨年度、FDCC 保有菌株として土壌より取得した *Paraburkholderia fungorum* KK1 が furfural 酸化活性を示したため、当該遺伝子をクローニングして組換えタンパク質の発現を試みたが、大腸菌では不溶化発現してしまった。そこで、大腸菌内で可溶化発現して HMF 酸化活性を有すると報告されている *Methylovorus* sp. MP688 由来 HMF oxidase (HMFO) を検討したところ、可溶化発現した HMFO は furfural に対しても酸化活性を有することを明らかにした。

そこで、HMFO と FDCC を組み合わせた furfural から FDCA 合成経路の開発を検討した (Fig. 1A)。HMFO/FDCC 共発現大腸菌を調製して FDCA 合成を検討したが、収率はわずか 0.5%であった。その原因が HMFO 反応で副産物として生じる過酸化水素に起因すると予想し、アスコルビン酸などの還元剤を系に添加したところ、収率は約 20 倍に向上した。さらに温度等の反応条件を検討し、現在 10%の収率で FDCA 合成に成功している (Fig. 2)。

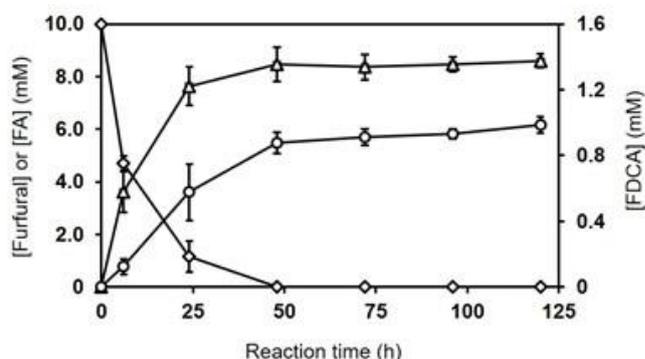


Fig. 2. フルフラールからの FDCA 合成

2.1.2 新規可逆的脱炭酸酵素の探索システムの開発

FDCC 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 UbiD 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群の Amidohydrolase family とは異なる炭酸固定反応システムが期待できる。上述の通り、FDCC 高発現大腸菌を用いた菌体反応で、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。この結果を生かして、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構築を検討した。UbiD が活性を発現するためには prenylated FMN (prFMN) と呼ばれる特殊な補酵素が必要であるが、prFMN は安定性が低く、非売品であるため外部添加が困難である。そこで、生体内で prFMN を供給する UbiX の高活性条件を検討したところ、FMN と dimethylallyl phosphate (DMAP)から prFMN を生合成する *Pseudomonas aeruginosa* 由来 UbiX を用いた反応システムで良好な結果を得た。本系において新規 UbiD の探索を実施する予定

である。

2.2 3-ヒドロキシエチルカテコール合成プロセスの開発

ポリフェノールである 3-ヒドロキシエチルカテコール (HEC) は抗酸化作用や美白作用を示すと期待されている化合物である。比較的安価な化合物である 2-フェニルエタノール (2-PE) への水酸基導入による HEC 合成を目指し、これまでに土壌より当該活性を示す *Pseudomonas* sp. K17 を取得し、目的遺伝子を同定しているが、当該遺伝子高発現株を用いて 2-PE からの HEC 合成を試みたが、HEC の生成は観察されなかった。高発現株の挙動や性状に基づいて、培養時に阻害剤が生成している可能性を考え、遺伝子工学的的手法によりその生成抑制を試みたところ、高効率で HEC を合成するプロセスの開発に成功した。本年度はその阻害物質を抽出して分子量測定等の解析を行った。それらの結果を考えあわせると、当該阻害物質がインディゴ誘導体である可能性が示唆された。また本阻害物質は培養時にグルコースを添加することによっても生成が抑制されるが、HEC 合成速度の観点から、我々が用いた遺伝子工学的的手法による生成抑制の方が効率的に HEC を合成できることを明らかにし、当該プロセスの有用性を証明した。

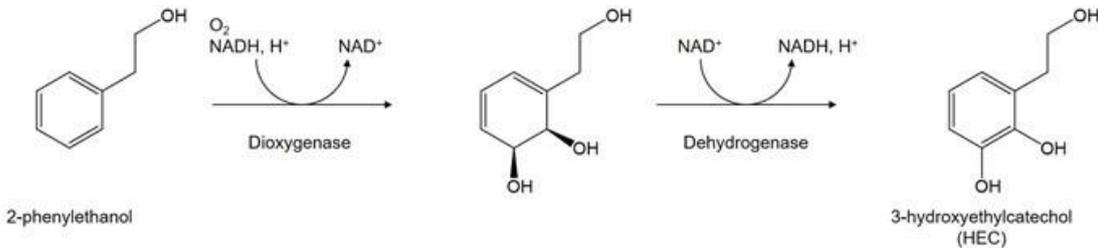


Fig. 3. 水酸基導入による HEC の合成

2.3 アデニル化酵素を利用した化学酵素的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. 4)、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ジケトモルフォリンの合成法の開発を検討した。

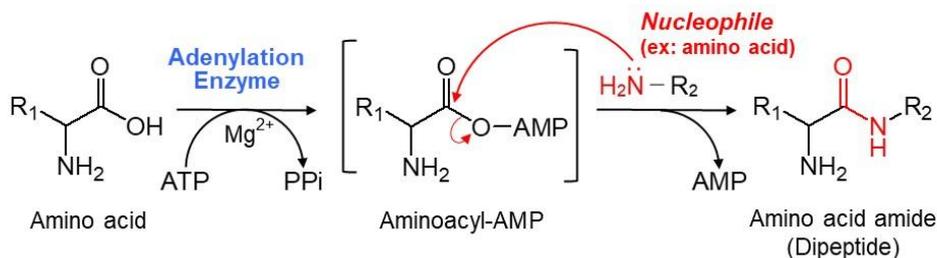


Fig. 4. アデニル化酵素と化学的求核置換反応がドッキングしたアミド化合物合成

2.3.1 D-アミノ酸を含むジペプチドの合成

Fig. 4 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。昨年度までに 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 *Bacillus subtilis* 168 由来の DltA に着目し、Fig. 4 の機構を利用することで C 末端側基質は L-Cys に限定されないことを実証した。さらに、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討したところ、D-Ala を N 末端側基質とした時に、C 末端側基質には様々な性質のアミノ酸(Cys, Pro, Leu, Phe, Gln, Glu, Lys)の L-体および D-体が導入可能であることを示した。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。今年度は、DltA の基質特異性を改めて検討したところ、Gly, L-Ala, L-Ser と D-Ala に加えて、D-Val, D-Cys, D-Ser, D-Tyr の新たに 4 種類の D-アミノ酸を N 末端側に導入したジペプチド合成が可能であることを明らかにした。また、D-Ala-D-Pro 生産において副生するピロリン酸を Pyrophosphatase(PPase)で分解すると、平衡が生成物側に傾いて合成反応が進行し、収量が約 30 倍に向上することも明らかにした。

2.3.2 α -ケトアミドや α -ヒドロキシアミドの合成

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. 5) の合成法開発を試みた。 α -ケトアミドや α -ヒドロキシアミドを骨格に持つ化合物は免疫抑制剤や抗菌剤などの生理活性を有する。 α -ケトアミドは多重結合形成などの有機合成反応に利用されており、 α -ヒドロキシアミドは生理活性を有する天然化合物、特にデブシペプチドの合成において有用な構造となっている。

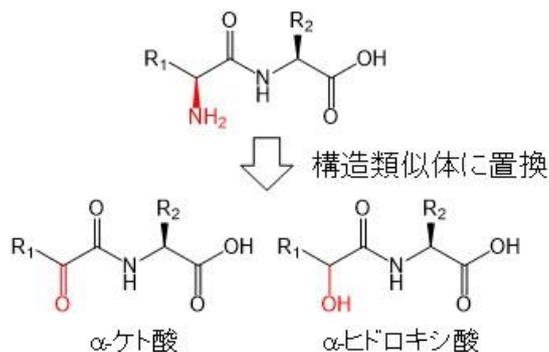


Fig. 5. ジペプチドとジペプチド類似体

そこで、Fig.4 の反応システムの利用を考えて、*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。いずれのアデニル化ドメインもそれぞれの生体内反応を踏まえると α -ケトアミド合成に利用可能と考えた。しかし、LZ35 株は入手困難であったので、LZ35 由来 EchA の A ドメインと 90.82%の identity を有する *S. hygroscopicus* NBRC109436 由来の推定 EchA-A を用いて諸性質を検討した。Vlm2A と EchA-A 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 の生成が確認され、さらにそれぞれは多くの α -ケト酸や α -ヒドロキシ酸を基質することが明らかになった。その一部は昨年報告したが、 α -ケト酸、 α -ヒドロキシ酸、 α -アミノ酸など多様な基質特異性を有することが新たに判明し、このアデニル化酵素を利用することで α -ケトアミドや α -ヒドロキシアミド、さらには D-, L-アミノ酸を任意に含むジ

ペプチド類似アミド化合物の合成が可能であることを示した。本技術は、創薬研究において貢献する成果であると考えられる。

2.3.3 特殊構造を有する環状ジペプチドの合成

新薬開発の主役は抗体医薬であるが、製造コストが高いなど多くの課題があるため、ペプチド医薬が期待されているが、単純な直鎖状ペプチドでは薬効が低いうえ、生体内では直ちにアミノ酸に分解されてしまうため、これまでに製品化されているペプチド医薬は数少ない。このような状況において、近年は光学異性や環状構造を有する特殊構造ペプチドが注目されている。例えば、環状ペプチドである2,5-ジケトピペラジン(DKP)類では、加齢とともに増加する関節性疾患や抗腫瘍活性などが報告されている。また、DKPは脳血液関門を透過するだけでなく、高分子物質の透過を促進する作用があるなど、医薬品キャリアとしての応用も期待でき、抗菌剤や抗ウイルス剤としての効果も報告されている。DKP化合物起源の農業用抗菌剤は、有機リン系薬剤よりヒトに無害で自然環境汚染も引き起こさない。このように特殊構造を有する低分子ペプチドの利用可能性は大きく、医療分野のみならず環境分野にまで幅広い需要の拡大が予想される。

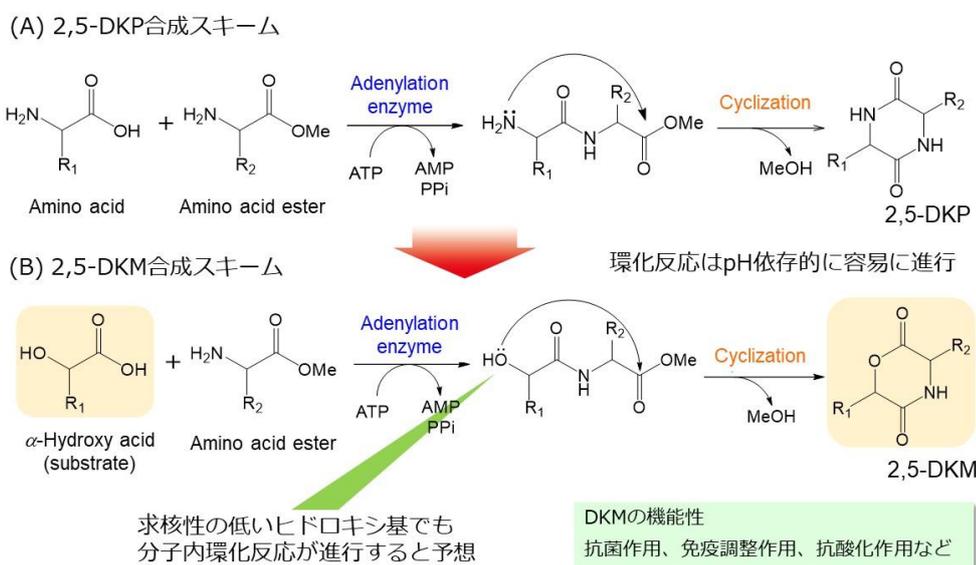


Fig. 6. ジペプチドエステルの生成と分子内環化によるDKP合成と類似環状化合物DKM合成

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されている。実際に、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2,5-DKP合成が可能であることを検証した(Fig. 6-A)。

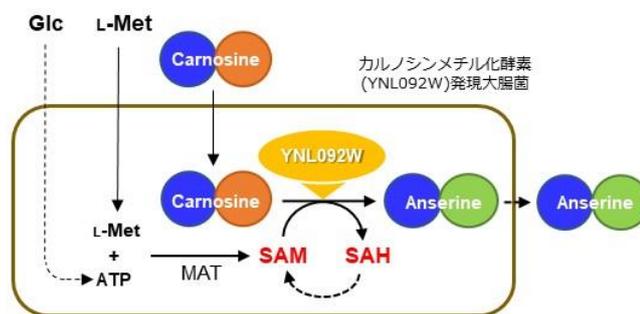
一方、上述のDKP合成スキームに α -ヒドロキシ酸をアデニル化する酵素を使うと、2,5-ジケトモルフォリン(2,5-DKM)が生成する(Fig. 6-B)。DKMはアミド結合とエステル結合を有する最小の環状デプシペプチドであり、これまでに抗菌活性、抗酸化活性、免疫調整作用などが報告されており、DKPでの報告例から推察するに多様な生理活性が期待できる。なお、DKP合成に比較すると

DKM合成では副生する化合物が限定され、特にホモペプチドが生成しないため合成収率や精製の面でメリットがある。

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

2.4.1 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L-アミノ酸リガーゼを利用する合成法を開発し、カルノシン(β -Ala-L-His)に関しては菌体反応系を用いる収率 90%以上の効率的な生産プロセスを昨年度までに開発している。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が、原料となる3-メチルヒスチジンが高価なため工業化は困難である。そこで、カルノシンをアンセリンに変換するNメチル化酵素に着目し、安価に供給可能なカルノシンを原料としてアンセリンに変換するプロセスを検討した。大腸菌で調製した酵母 *Saccharomyces cerevisiae* X33 株由来のカルノシンメチル化酵素(YNL092W)を用いて、アンセリンへの変換活性を精製酵素反応系で評価したところ、微小ながら活性を確認することができた。YNL092W の結晶構造情報(PDB ID: 5X62)を踏まえた変異導入によって活性の向上にも成功し、今後の可能性を示すことができた。実際の生産プロセスの検討は、カルノシンと同様、ATP 添加の必要のない菌体系での変換反応で行っている。メチル化反応に必須の高価な S-アデノシルメチオニン(SAM)は生体内での生合成前駆体である L-



SAM : S-adenosylmethionine, SAH : S-adenosylhomocystein
 MAT : methionine adenosyltransferase
 YNL092W : carnosine methyltransferase from *S.cerevisiae*

メチオニンの少量添加で対応可能である点は大きなメリットである。

Fig. 7.- 菌体反応系によるカルノシンからのアンセリンへの変換

2.4.2 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)を対象にアミノ酸リガーゼを用いる合成可能性を検討した。塩味増強効果のあるジペプチドとして見出した Pro-Gly の合成酵素であるアミノ酸リガーゼ TabS を用いて OG 合成を検討したところ、問題なく生成を確認したものの、合成収率が高くなかった。そこで、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。興味深いことに、反応条件等の比較対象として Pro-Gly の合成を観察したところ、基質のヒドロキシプロリン(HYP)の取り込み活性において、Pro と大きく

異なっていることを見出し、**HYP** の取り込み活性を高める方法を考案して検討したところ、**ATP** 添加の必要のない効率的な菌体反応系で大幅な収率の向上を達成した。

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)
鈴木 伸(先進理工学部・応用化学科・助手)
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. Ryotaro Hara, Kuniki Kino, “Enzymatic reactions and microorganisms producing the various isomers of hydroxyproline”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **104**(11), 4771-4779 (2020).
DOI:10.1007/s00253-020-10603-1
2. Tsubasa Saito, Riku Aono, Toshiki Furuya and Kuniki Kino, “Efficient and long-term vanillin production from 4-vinylguaiacol using immobilized whole cells expressing Cso2 protein”, *J. Biosci. Bioeng.*, **130**(3), 260-264 (2020). DOI: 10.1016/j.jbiosc.2020.04.012
3. Kuniki Kino, Yasutaka Hirokawa, Ryo Gawasawa, Ryota Murase, Ryohei Tsuchihashi, and Ryotaro Hara, “Screening, gene cloning, and characterization of orsellinic acid decarboxylase from *Arthrobacter* sp. K8 for regio-selective carboxylation of resorcinol derivatives”, *J. Biotechnol.*, **323**, 128-135 (2020). DOI: 10.1016/j.jbiotec.2020.08.011
4. 木野邦器, “有用微生物酵素の探索とバイオプロセス開発への応用研究”, *生物工学会誌*, **99**(1), 2-14 (2021). DOI: 10.34565/seibutsukogaku.99.1_2
5. Kazuki Kawanabe, Riku Aono, and Kuniki Kino, “2,5-Furandicarboxylic acid production from furfural by sequential biocatalytic reactions”, *J. Biosci. Bioeng.*, accepted 1 Mar 2021. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2021.03.001

4.2 総説・著書

1. 古屋俊樹, 木野邦器 (分担執筆): バイオリアクターのスケールアップと物質生産, 第7章 バイオリアクターを利用した物質生産の事例: 医薬品・食品・化粧品編◇, 9節 固定化酵素・微生物を用いた香料化合物の生産, p.296 -p.302, 技術情報協会, 東京, 2021年4月20日. ISBN978-4-86104-830-2, 総頁数: 515 https://www.gijutu.co.jp/doc/b_2090.htm#7

4.3 招待講演

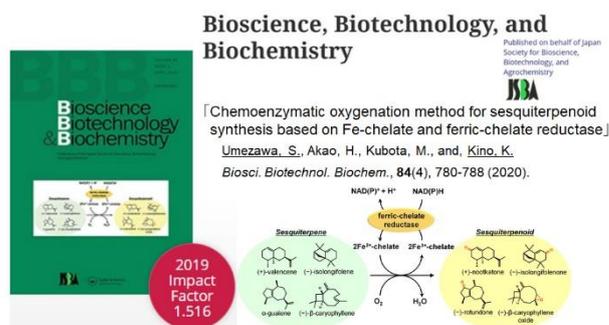
1. 木野邦器, “有用微生物酵素の探索とバイオプロセス開発への応用研究”, 第72回日本生物工学会大会学会賞受賞記念講演: WEB シンポジウム 2020, 講演要旨集 p.1-2, 2020年9月2日.
2. 原良太郎, “微生物由来アミノ酸修飾酵素を利用した有用アミノ酸生産プロセスの開発”, 第21回酵素応用シンポジウム受賞講演(講演会は中止), 2020年6月12日.
3. 原良太郎, “有用微生物酵素の探索を基盤とした有用化合物生産プロセスの開発”, 2020年度バイオインダストリー奨励賞記念講演, パシフィコ横浜, 2020年10月15日
4. 原良太郎, “微生物酵素の探索と有用化合物生産への応用”, 第84回講演会: WEB 開催, 2020年11月20日.

4.4 受賞・表彰

1. 梅澤寛, 木野邦器, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*の表紙タイトル画として採用 (下図参照)
対象となった論文: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **84**(4), 780-788 (2020).
2. 原良太郎, 2020 年度酵素応用シンポジウム研究奨励賞
受賞タイトル「微生物由来アミノ酸修飾酵素を利用した有用アミノ酸生産プロセスの開発」
天野エンザイム科学技術振興財団, 2020 年 6 月 21 日
3. 木野邦器, 2020 年度日本生物工学会学会賞 第 39 回生物工学賞
受賞タイトル「有用微生物酵素の探索とバイオプロセス開発への応用研究」
公益社団法人日本生物工学会, 2020 年 9 月 2 日
4. 原良太郎, 第 4 回バイオインダストリー奨励賞
受賞タイトル「有用微生物酵素の探索を基盤とした有用化合物生産プロセスの開発」
一般財団法人バイオインダストリー協会, 2020 年 10 月 15 日
5. 原良太郎, 2020 年度酵素工学奨励賞
受賞タイトル「微生物酵素の探索と有用化合物生産への応用」
酵素工学会, 2020 年 11 月 20 日

4.5 学会および社会的活動

1. 木野邦器, “プラスチックの持続可能な消費と生産に向けて”, BioJapan2020 主催者 (JBA) セミナー・コーディネーター, O-12, ANNEX ホール, Pacifico Yokohama, (横浜) 2020 年 10 月 15 日.



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」の成果を踏まえて、今期から「スマートバイオプロセス」を開始した。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、独創的な戦略と新たな技術の開発によって、これまでに無かった新たな酵素機能を微生物に見出し、革新的なプロセスを開発することができた。発酵は微生物（高度に育種された生産菌株）という究極的なバイオリクターによって成立し、効率的な物質生産を達成している。現在は、生命の設計図ともいべきゲノム情報も容易に手に入れることができるようになってきた。それを完全に読み解くまでにはまだ時間はかかるが、革新的発展を遂げている情報通信技術と人工知能を使った大量なデータ処理技術がバイオと連携することで、最適なプロセスの構築が可能となっている。

現代社会の課題である持続的かつ脱炭素社会の実現に向けて、バイオテクノロジーへの期待は益々大きくなると感じている。生命の進化の過程で多様化した遺伝子やその産物であるタンパク質、そして生命体は、決して理想的な完全体ではないと思う。微生物に限定すれば、有用な遺伝子や制御システムを工業的に育種された微生物に集約して、究極的なバイオプロセスを達成することが可能であると思っている。こうした「合成生物学」の観点で、究極的なバイオリクターであるスマート細胞を構築し、効率的なスマートバイオプロセスの技術開発を推進していくつもりである。