

# 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を高度化させた酵素やそれら酵素を発現させた菌体を創製し、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的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を主に報告する。

## 2. 主な研究成果

### 2.1 微生物由来可逆的脱炭酸酵素の探索システムの開発

脱炭素社会の実現に向けてカーボンニュートラルな技術開発が世界的に求められているが、バイオマス資源を利用するバイオリファイナリー技術の開発が進められている。微生物機能を利活用する技術は、この社会的要望を満たすものとして期待されているが、本研究では微生物由来の非酸化的可逆的脱炭酸酵素を利用した化合物への炭酸固定によるカルボン酸化合物合成法の開発を目指している。バイオマス資源を原料とするものづくりに本技術を適用することで、完全リサイクル型のカーボンニュートラルを達成する革新的なバイオプロセスとなる。

我々は、これまでに未利用バイオマスであるリグニンから調製可能な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が、その多くは、サリチル酸骨格の化合物に対してのみ活性を示す Amidohydrolase 型可逆的脱炭酸酵素である。一方、広範な基質に活性を有する UbiD/UbiX 型の可逆的脱炭酸酵素は、ポリマー原料など有用なカルボン酸合成を可能とする工業的に利用価値の高い酵素として注目されているが、この酵素システムに関する研究はまだ新しく、取得されている酵素の種類も少ない状況である。昨年度までに、大腸菌を宿主として DMAPP と FMN から prFMN を合成する大腸菌由来 UbiX (*Ec*\_UbiX) の高発現系を構築しており、本発現系において UbiD 酵素 2,5-Furandicarboxylic acid decarboxylase (FDDC) の活性化にも成功している。

そこで、合成可能な芳香族カルボン酸の多様性の拡張を目的に、上記の大腸菌発現システムを基盤として、より実効性のある UbiD 探索システムの構築を目指した。具体的には、UbiD 活性を高めるような酵素誘導条件の検討を行い、FDDC 以外の UbiD 酵素を対象として本探索システムの有用性と汎用性を検証した。

誘導培養時に好気-嫌気条件を利用することで、*Ec*\_UbiX 系において補酵素 prFMN の安定性が向上し、FDDC 活性の向上に成功した。また prFMN 原料供給の検討として比較的安価で安定に供給可能な prenol から prFMN の前駆体である DMAP(ジメチルアリルリン酸)を合成する *Ec*\_ThiM 及び DMAP から prFMN を合成する *Pa*\_UbiX を共発現する系を構築した。*Pa*\_UbiX 利用時に

*Ec\_ThiM* の高発現や prenol 添加は FDDC 活性化に有効だったが、*Ec\_UbiX* 系の方が高発現する酵素の種類が少なく、prenol の外部添加無しに *Pa\_UbiX/Ec\_ThiM* 系と同等の活性を有することから、UbiD の活性化には *Ec\_UbiX* 系の方が適していると考えた。また、既に報告のある可逆的脱炭酸酵素 *HaFdc* や *Pa\_UbiD* の活性化にも成功し、本系 FDDC のみならず、様々な UbiD 酵素の活性化に利用可能であることを示した。

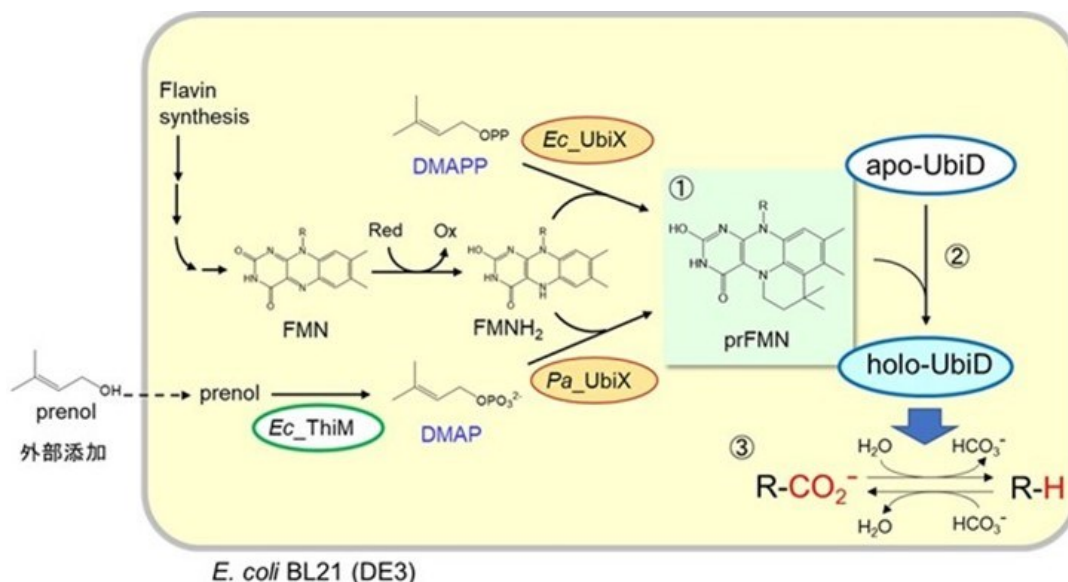


Fig. 1. UbiD 活性化システムを備えた大腸菌を宿主とする UbiD 探索システム。

【用語】 prFMN : prenylated FMN、EC\_ThiM : 大腸菌(*E.coli*)由来 DMAP 合成酵素、Pa\_UbiX : シュードモナス属細菌(*Pseudomonas aeruginosa*)由来 prFMN 合成酵素、Ec\_UbiX : 大腸菌由来 prFMN 合成酵素、HaFdc : *Hypocrea atroviridis* 由来 UbiD (フェルラ酸脱炭酸酵素)

## 2.2 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。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. 2)、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。

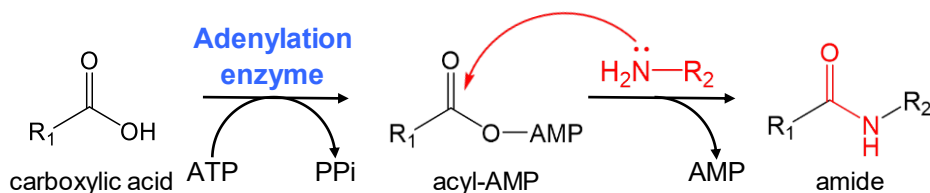


Fig. 2. アデニル化酵素と化学的求核置換反応が共役したアミド化合物合成

我々は、エピメリ化ドメインの上流に存在する A ドメインは、基質アミノ酸の光学異性に関わらずアデニル化するものが多いことを明らかにしている（生化学, **93**(3), 338 (2021))。その実験的事実を踏まえ、 $\alpha$ -ケト酸を含有するペプチド合成を担う NRPS において、そのモジュール構成と A ドメインの基質認識においても、ケトレダクターゼドメイン(KR ドメイン)の上流に位置する A ドメインは生理基質である  $\alpha$ -ケト酸に加え  $\alpha$ -ヒドロキシ酸も基質にするという仮説を立てた。そこで、*Streptomyces orinoci* NBRC 13466 由来 neoantimycin synthetase の中から候補となる 3 つの A ドメイン(NatB2-A, NatB3-A, NatD-A)を選択し、L-Pro を求核剤とした化学酵素的アミド結合形成反応によるジペプチド類似体の合成の可否によってこの仮説の検証を行った。その結果、予想通り、全ての A ドメインが生理基質である  $\alpha$ -ケト酸に加え  $\alpha$ -ヒドロキシ酸を認識し、ケトイソ吉草酸など 16 種類のカルボン酸への拡張に成功した (Fig. 4.)。

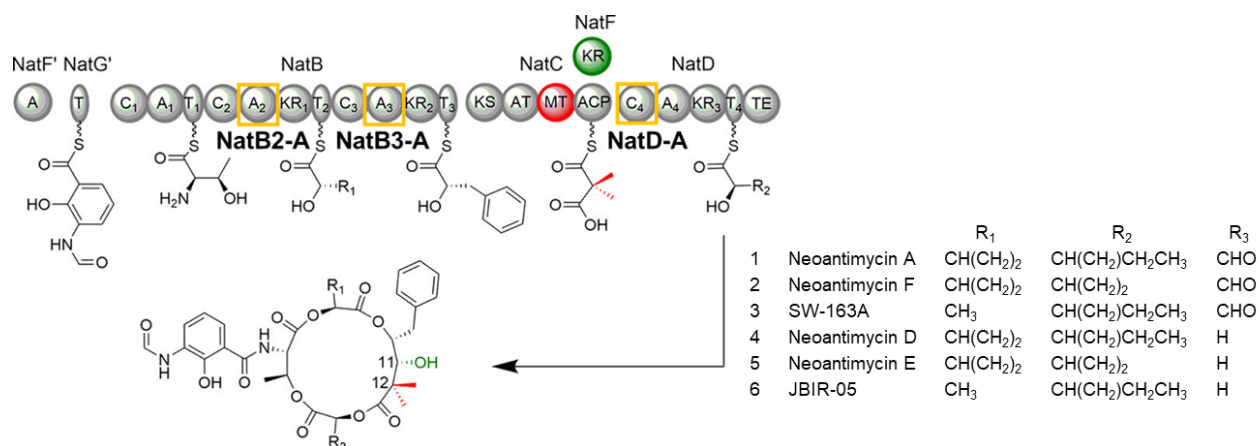


Fig. 3. *Streptomyces orinoci* NBRC13466 由来 neoantimycin synthetase  
ref : Will S., et al., *ACS Chem. Biol.*, **80**, 5723 (2018).

| Substrate | NatB2-A | NatB3-A | NatD-A |
|-----------|---------|---------|--------|
| 1         | +       | +       | +      |
| 2         | +       | +       | +      |
| 3         | +       | +       | +      |
| 4         | +       | +       | +      |
| 5         | +       | +       | +      |
| 6         | +       | -       | +      |
| 7         | +       | +       | +      |
| 8         | +       | -       | +      |
| 9         | +       | +       | +      |
| 10        | +       | -       | +      |
| 11        | +       | +       | +      |
| 12        | +       | -       | +      |

+ :Substrate for which product was detected by LC/MS  
- :Substrate for which product was not detected by LC/MS

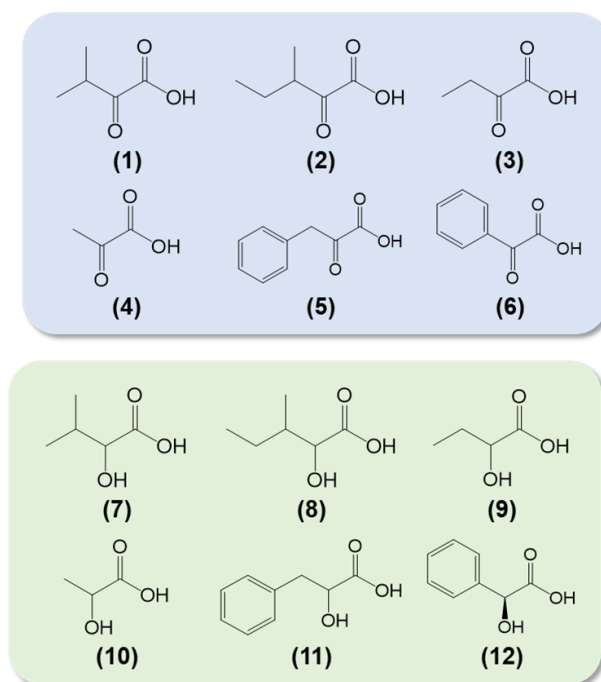
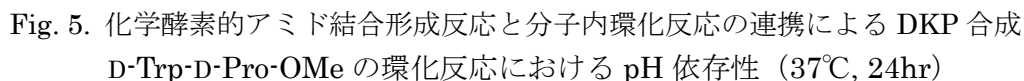


Fig. 4. ケト酸及びヒドロキシ酸を認識するアデニル化酵素とジペプチド類似体の合成

### 2.3 特殊構造を有する環状ジペプチドの効率的合成法の開発



50 mM HEPES 緩衝液中での反応では、開始から 3 h で pH が 6.0 まで低下し、cyclo(L-Trp-L-Pro)の合成が停止していた。pH 低下を防止するため緩衝液濃度を上昇させると、100 mM では 3 h 時点で pH が 6.5 と低下が緩やかになり cyclo(L-Trp-L-Pro)の合成量が増加した。一方、400 mM では pH は 7.4 で維持されるが L-Pro-OMe から L-Pro への加水分解に起因する L-Trp-L-Pro の副生が顕著になった。本結果より、pH を中性付近で維持することで DKP の合成効率向上が可能であると推測した。そこで、pH スタットによる制御系を導入し、下限 pH を 6.5, 6.7, 6.9, 7.1 に設定して合成量を比較した。その結果、下限 pH 6.9 の場合に 24 h で最大 4.1 mM の cyclo(L-Trp-L-Pro) 合成(対 L-Trp モル収率 41%)を達成した (Fig. 6.)。

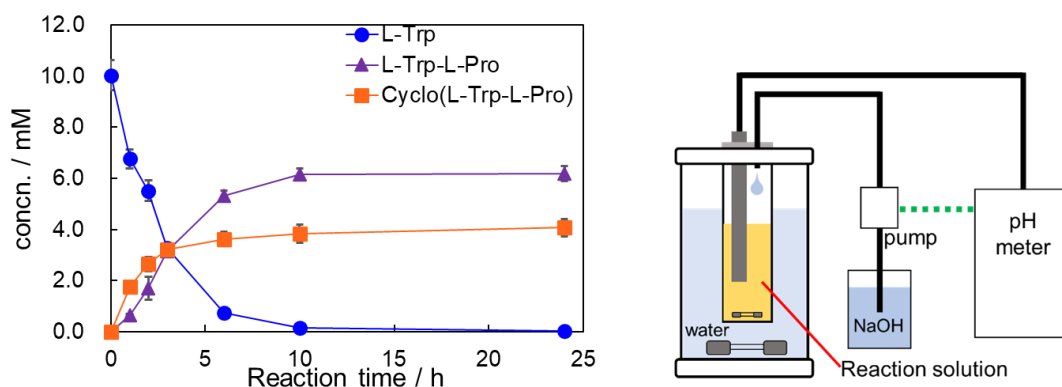


Fig. 6. pH下限制御によるジペプチドエステルの生成と分子内環化によるDKP合成

## 2.4 機能性ジペプチド合成法の開発

L-チロシン(Tyr)やその水酸化物である L-3,4-dihydroxyphenylalanine (Dopa)は、血液脳関門を容易に通過し、脳内では神経伝達物質であるカテコールアミンの前駆体としての役割を有するため、脳機能改善に資する医薬品やサプリメントとして利用されている。一方、Tyr 含有ジペプチドの服用による脳内カテコールアミン代謝の活性化が報告されていることから、我々は Tyr 含有ジペプチドの効率的な酵素合成法を検討し、L-アミノ酸リガーゼ (Lal)を用いる菌体反応法により、難分解性のβ-Ala-Tyr を対象として基質アミノ酸に対してモル変換率 70%の高生産プロセスを前年度報告した。本プロセスは当該合成反応に必須である補酵素 ATP の外部添加を必要としない工業的にも有用なプロセスである。しかしながら、生体内では Tyr の水酸化が律速であることから、カテコールアミン濃度を高めるには Dopa を含有するジペプチドの利用がより望ましいと考えた。

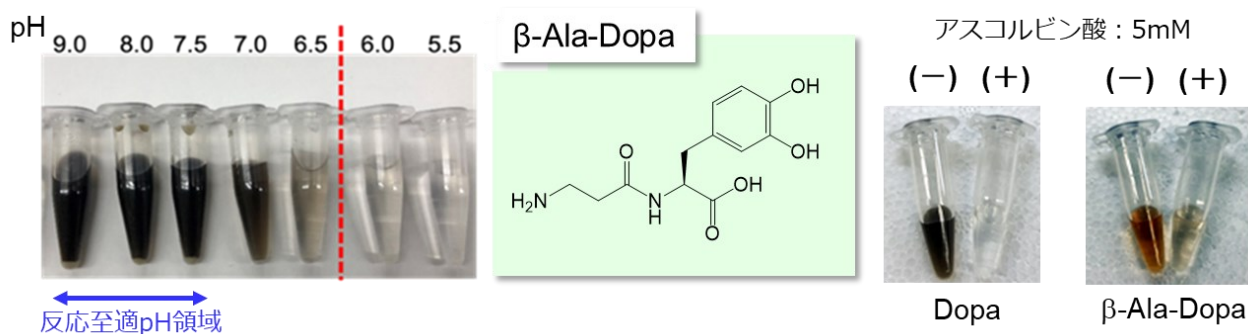


Fig. 7. Dopa およびβ-Ala-Dopa の pH 安定性とアスコルビン酸の添加効果

本研究では、 $\beta$ -Ala-Tyr の生産法を踏まえて $\beta$ -Ala-Dopa の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た。 $\beta$ -Ala-Dopa も Lal の精製酵素を用いた反応で合成は可能であったが、反応至適 pH であるアルカリ領域において Dopa の酸化による反応液の黒色化と低収率を観察した (Fig. 7.)。そこで、還元剤の種類と添加条件を検討することで改善し、アスコルビン酸 10mM を添加することで約 90% の高収率を達成した。一方、菌体反応系を利用した低コストプロセスでは、宿主大腸菌における基質の分解や透過性には問題はなかったが、 $\beta$ -Ala-Dopa の分解が顕在化した。ペプチド分解酵素である PepD の欠損変異を付与することで分解を部分的に抑制することができ、対基質モル変換率 70% を越える高収率を達成した。 $\beta$ -Ala-Tyr は大腸菌で分解されなかったが、Tyr に水酸基が導入された $\beta$ -Ala-Dopa が大腸菌で分解されるようになったことは興味深い。

### 3. 共同研究者

古屋 俊樹 (東京理科大学・理工学部・応用生物科学科・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、現：立命館大学生命科学部)

鈴木 伸 (早稲田大学理工学術院・総合研究所・次席研究員)

倉本 歩 (早稲田大学理工学術院・総合研究所・招聘研究員)

### 4. 研究業績

#### 4.1 学術論文

1. Ryotaro Hara, Yuta Nakajima, Hiroaki Yanagawa, Ryo Gawasawa, Izumi Hirasawa, and Kuniki Kino, "Enzymatic synthesis of L-threo- $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -amino acids via asymmetric hydroxylation using stand-alone 2-oxoglutarate-dependent hydroxylase from *Sulfobacillus thermotolerans* Y0017", *Appl. Environ. Microbiol.*, **87**: Issue 20 e01335-21 (2021). DOI: 10.1128/AEM.01335-21
2. Megumi Matsude, Himeka Okamoto, Riku Aono, and Kuniki Kino, "Tryptophanase gene deficiency improves the application of dioxygenase to 3-(2-hydroxyethyl) catechol production", *J. Biosci. Bioeng.*, **132**(3), 241-246 (2021). DOI: 10.1061/j.jbiosc.2021.06.001
3. Riku Aono, Tomoya Yoshihara, Hotaka Nishide, and Kuniki Kino, "Screening and characterization of a novel reversible 4-hydroxyisophthalic acid decarboxylase from *Cystobasidium slooffiae* HTK3", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **85**(7), 1658-1664 (2021). DOI: 10.1016/j.jbiotec.2020.08.011

#### 4.2 総説・著書

1. 木野邦器, 鈴木伸, 原良太郎, "アミノ酸リガーゼやアデニル化酵素を利用したジペプチドの合成", 生化学: Journal of Japanese Biochemical Society, **93**(3), 338-348 (2021). DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930338
2. 木野邦器, "地球存続の鍵を握るバイオテクノロジー: 生き物たちの生存戦略に学ぶこれからの科学技術", HASEGAWA LETTER No.40 自然科学香話 (2022). <https://hasegawa-letter.com/>

#### 4.3 招待講演

1. 木野邦器, “有用物質生産のための酵素反応系の開発”, 理化学研究所(和光)セミナーの招待講演(オンライン併用), 2022年3月
2. 木野邦器, “地球存続の鍵を握るバイオテクノロジーとバイオエコノミー社会の実現”, 東京一水会例会における講演会: 基調講演(オンライン併用), アサヒグループホールディングス株式会社, 2022年2月
3. 木野邦器, “脱炭素社会の実現に貢献するバイオテクノロジーと科学技術開発研究の方向性”, 株式会社トクヤマ(オンライン開催), 2021年11月.

#### 4.4 受賞・表彰

該当無し

#### 4.5 出願特許

1. 特願 2021-167756、出願日: 令和3年10月12日, “ヒドロキシプロリルグリシンの製造方法”, 木野邦器、出願人: 焼津水産化学工業株式会社
2. 特願 2022-032913 (2022年3月日), “ $\beta$ -Ala-DOPA の製造方法”, 木野邦器, 中森俊宏、出願人: 不二製油グループ本社株式会社、早稲田大学

#### 4.6 学会および社会的活動

1. 木野邦器, “2050年カーボンニュートラルの実現に向けて”, BioJapan2021 主催者(JBA) セミナー・コーディネーター: O-6, アネックスホール, パシフィコ横浜(横浜) 2021年10月14日.
2. 古渡翔, 木野邦器, “コラーゲン由来ジペプチドであるヒドロキシプロリルグリシンの菌体反応系による生産”, 第73回日本生物工学会大会(2021), 要旨集: G2H3-0211, p.115, オンライン(沖縄) 10.28. トピックス集掲載テーマ
3. 唐鎌翔太, 鈴木伸, 木野邦器, “化学酵素的アミド結合形成反応と分子内環化反応の連携による環状ジペプチド化合物のワンポット合成法の開発: ジケトピペラジンの合成”, 第73回日本生物工学会大会(2021), 要旨集: G2H3-0204, p.114, オンライン(沖縄) 10.28.
4. 唐鎌翔太, 鈴木伸, 木野邦器, “化学酵素的アミド結合形成反応と分子内環化反応の連携による環状ジペプチド化合物のワンポット合成法の開発: ジケトモルフォリンの合成”, 第73回日本生物工学会大会(2021), 要旨集: G2H3-0205, p.114, オンライン(沖縄) 10.28.
5. 倉本歩, 木野邦器, 佐藤謙一郎, 岡田行夫, “バイオプロセスによるイミダゾールジペプチドの工業的生産技術”, 日本農芸化学会 2022年度大会講演番号: 4B09-02, オンライン(京都)
6. 唐鎌翔太, 鈴木伸, 木野邦器, “化学酵素的アミド結合形成反応と分子内環化反応の連携によるジケトピペラジン合成における pH の影響と制御系導入による生産性向上”, 日本農芸化学会 2022年度大会講演番号: 4B09-08, オンライン(京都)
7. 永瀬あゆみ, 鈴木伸, 木野邦器, “非リボソーム型ペプチド合成酵素のモジュール構成に着目したアデニル化ドメインの探索とジペプチド類似体合成への展開”, 日本農芸化学会 2022年度大会講演番号: 4B09-03, オンライン(京都)

8. 本元敦也, 佐怒賀悠, 古渡翔, 中森俊宏, 木野邦器, “脳機能改善に資するチロシンあるいは Dopa を含むジペプチドの効率的生産”, 日本農芸化学会 2022 年度大会講演番号: 4B09-01, オンライン (京都)
9. 土井淳平, 村瀬諒太, 笹原遥介, 市村遼, 青野陸, 木野邦器, “可逆的脱炭酸酵素 UbiD の探索システムの構築”, 日本農芸化学会 2022 年度大会講演番号: 3C05-05, オンライン (京都)

## 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、昨年度から「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、従来報告の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。現在は、生命の設計図ともいえる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。また、生命の進化の過程で構築されてきた生命システムは精緻で厳密に制御されているが、本研究によって曖昧さ故にタンパク質機能に柔軟性があることも明らかになった。こうした生命システムの曖昧さを活用することで、より革新的なバイオプロセスの開発が達成できるものと確信している。

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。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期待されており、引き続き、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。

## 6. 謝 辞

本研究において、「微生物由来可逆的脱炭酸酵素の探索システムの開発」は科研費基盤(B) (18H01802) の支援を、また、「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」は、科研費基盤(B) (21H01734) 「生物のキラリティ制御に学ぶ生理活性物質の新規合成法の開発」の支援を一部受けて実施しているものです。その他、民間企業との共同研究によって研究費等の支援を受けました。厚くお礼申し上げます。