

# 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、主に多様な生理機能を有するジペプチドやその誘導體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その概要を報告する。

## 2. 主な研究成果

### 2.1 カテコール代謝を活性化する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。昨年度、酵素合成法によるβ-Ala-Dopa 生産では、アスコルビン酸(AsA)10mM により不要な酸化反応を抑制することで約 90%の高収率を達成した。また、菌体反応系を利用した低コストプロセスでは、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対基質モル変換率 70%を越える高収率を達成した。今年度は、基質 Dopa の不安定性と価格の観点から、既に菌体反応系で対基質モル変換率 98%を達成しているβ-Ala-Tyr をβ-Ala-Dopa に変換する酵素反応プロセスを検討した (Fig. 1)。

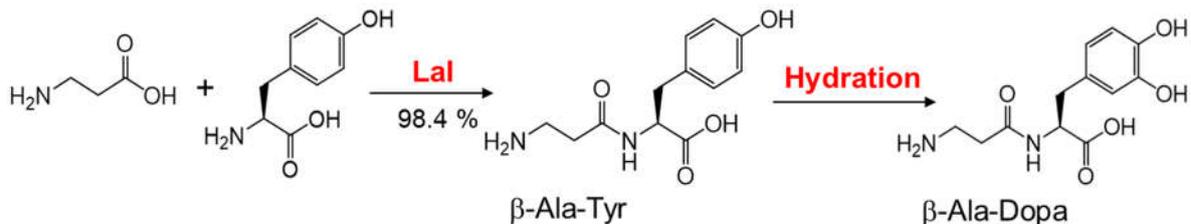


Fig. 1 β-Ala-Tyr からのβ-Ala-Dopa への変換するプロセス

そこで、Tyr を Dopa に変換するチロシナーゼに着目した。ジペプチドであるβ-Ala-Tyr にも作用し、かつモノフェラーゼ活性が優先するチロシナーゼを探索し、*Ralstonia solanacearum* 由来 NP\_518458 を最適酵素として選定した (Fig.2)。

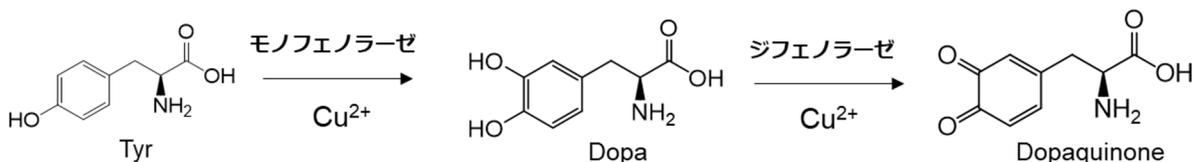


Fig. 2. *Ralstonia solanacearum* 由来チロシナーゼによる Tyr の酸化

Cu<sup>2+</sup>を要求するフェノラーゼ NP\_518458 によるβ-Ala-Tyr からβ-Ala-Dopa への変換反応では、Dopa やβ-Ala-Dopa の余計な酸化反応によるロス回避のために昨年度見出したアスコルビン酸(AsA)の添加を試み、その効果を検証した。予想通り、AsA の効果を確認し、β-Ala-Tyr からモル変換率 90%以上でβ-Ala-Dopa の合成に成功した (Fig.3)。

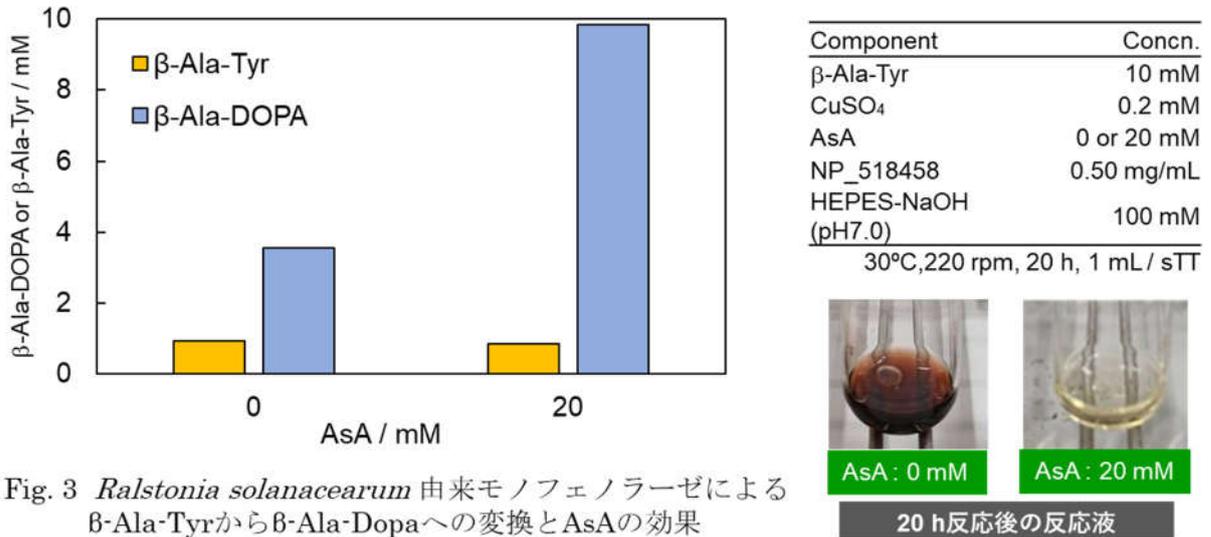


Fig. 3 *Ralstonia solanacearum* 由来モノフェノラーゼによるβ-Ala-Tyrからβ-Ala-Dopaへの変換とAsAの効果

## 2.2. イミダゾールジペプチドの効率的合成法の開発

アミノ酸リガーゼ (Lal) を利用して合成可能な有用化合物に、抗酸化作用や抗疲労効果、認知症予防効果など、高齢化社会における機能性サプリメントとして潜在的需要のあるイミダゾールジペプチドがある。イミダゾールジペプチドは、β-アラニンと L-ヒスチジンを構成成分とするジペプチドで、脊椎動物の骨格筋や脳内に広く存在し、代表的なものとしてカルノシン、アンセリンなどが知られている。市場には化学合成された安価なカルノシンが流通しているが、アンセリンはその機能性の高さからカルノシンより期待されているものの合成法が確立されていないため、純度は低い鶏肉やサケやマグロなどの天然資源からの抽出法に依存している。カルノシンに関しては、我々は

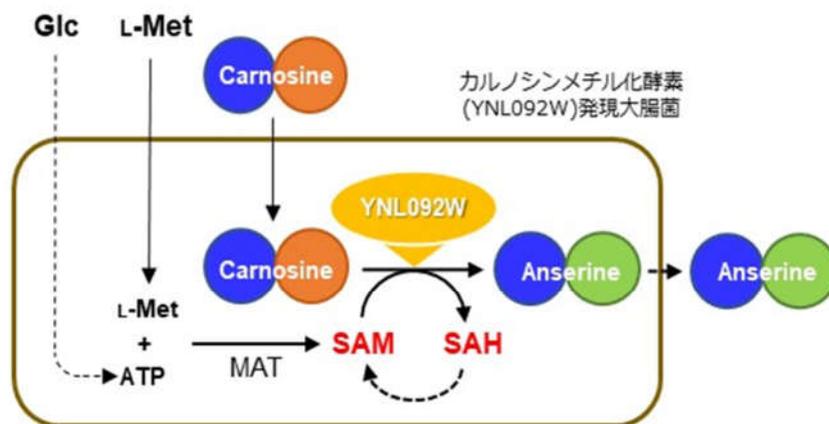


Fig.4 菌体反応系によるカルノシンからのアンセリン生産

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

$\beta$ -アラニンと L-ヒスチジンを原料とする酵素法や、縮合反応に当量必要な補酵素 ATP の外部添加の必要のない菌体反応系による低コストでの実生産プロセスを確立している。アンセリンについても、 $\beta$ -アラニンと 3-メチル-L-ヒスチジンを原料として約 85% のモル変換率で合成することが可能であるが、原料の 3-メチル-L-ヒスチジンが極めて高価であるため、コスト低減を目的に地球環境にも優しい新たな合成法を検討している。我々は、NEDO の委託事業「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発」の中で「バイオプロセスによるイミダゾールジペプチドの効率的生産方法の開発」をテーマとして技術開発を行っている。

安価に生産が可能なカルノシンを原料として、カルノシンメチル化酵素によってアンセリンに変換するプロセスで、理想的にはカルノシンの原料である  $\beta$ -アラニンと L-ヒスチジンを原料として、カルノシン合成と引き続くアンセリンへの変換反応を 1 ポットで行うバイオプロセスの開発を目指している (Fig. 4)。現在までに変換率約 20% を達成したが、カルノシンメチル化 (アンセリン) 合成酵素の活性が低く、その可溶化高発現を鋭意検討している。

### 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

アミド化合物は医薬品や機能性素材など幅広い用途に利用される有用化合物である。我々はアデニル化酵素を利用した革新的な化学酵素的アミド結合形成反応を開発しており、キラリティを制御したジペプチドをはじめ構造多岐にわたる様々なアミド化合物の合成に成功している。本研究では、当該技術をさらに拡張させて、機能性素材として工業的利用が期待される多様なポリアミド化合物の合成法への展開可能性を検証した。先ず、化学酵素的アミド結合形成反応の特性を踏まえ、アデニル化されるカルボキシ基と求核攻撃を行うアミノ基を有する化合物を基質とすれば、ホモポリアミドの合成が可能と考えた (Fig.5)。

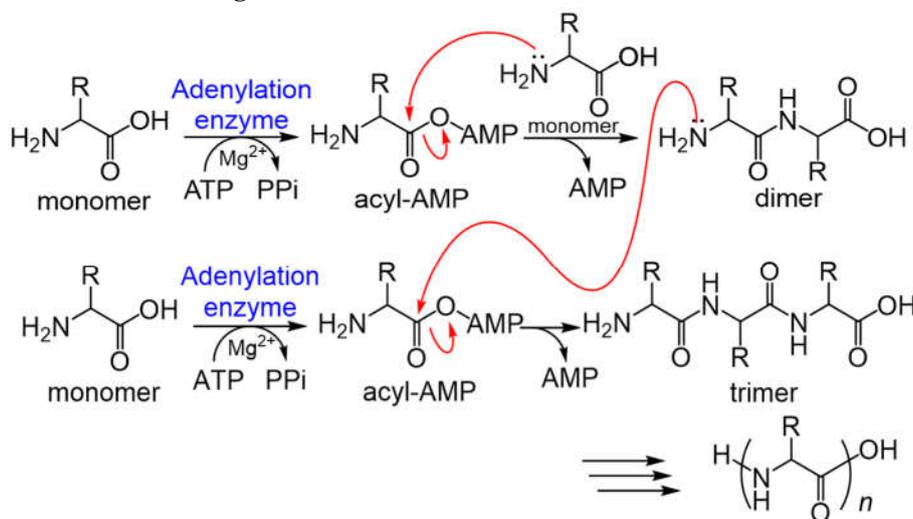
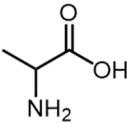
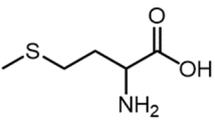
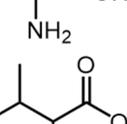
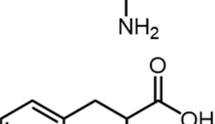
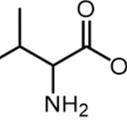
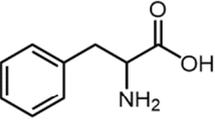
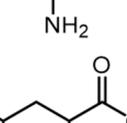
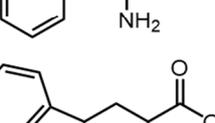
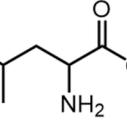
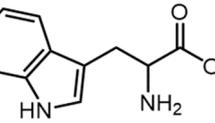
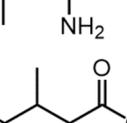
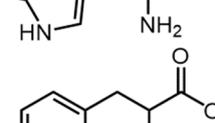
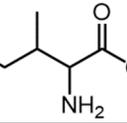
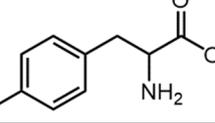
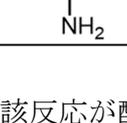
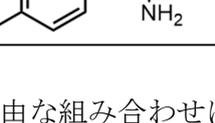


Fig. 5. アデニル化酵素と化学的求核置換反応が共役したアミド化合物合成とポリアミノ酸合成

そこで、チロシジン合成を担う NRPS のアデニル化ドメインの TycA-A の基質となる 8 種類のアミノ酸の L-,D-体を単独基質として反応を行った。LC-MS 分析にて解析した結果、何れのアミノ酸においてもオリゴマーの生成を確認し、Table 1 に示す鎖長のホモポリアミノ酸に相当するピークを検出した。本結果は、Fig.5 のスキームで合成が進行したことを示唆するものであり、鎖長に課題はあるがポリアミノ酸合成への可能性を明らかにすることができた。

Table 1 TycA-A を利用したポリアミノ酸合成

Substrate	Length	Substrate	Length
 L-Ala	2~9 mer	 L-Met	2~6 mer
 D-Ala	2~9 mer	 D-Met	2~6 mer
 L-Val	2~6 mer	 L-Phe	2~4 mer
 D-Val	2~6 mer	 D-Phe	2~4 mer
 L-Leu	2~6 mer	 L-Trp	2~4 mer
 D-Leu	2~5 mer	 D-Trp	2~4 mer
 L-Ile	2~5 mer	 L-Tyr	2~5 mer
 D-Ile	2~6 mer	 D-Tyr	2~5 mer

さらに、当該反応が酵素・基質・求核剤の自由な組み合わせにより多様なアミド化合物の合成が可能であることから、クリック反応との連携によるポリアミドの合成法を検討した。クリック反応に必要な反応部位を両末端に有する二官能性のアミド化合物を当該反応によって調製し、クリック反応を試みた。その結果、そのアミド化合物をモノマー単位とするオリゴマーの合成を確認することができ、ポリアミド合成展開への可能性を見出した。本手法により、合成可能なポリアミドの多様性がさらに拡張され、新たな機能性高分子素材の開発の道を切り拓く有力な手段になり得ると期待する。

#### 2.4 特殊構造を有する環状ジペプチドの多様な機能評価

前年度に引き続き、特殊構造を有する環状ジペプチドであるジケトピペラジン(DKP)の効率的合成法を検討した。DKPは2分子のアミノ酸が縮合・環化した化合物であり、構成アミノ酸の種類や立体異性により抗菌性や抗腫瘍性、抗高血糖性など様々な機能性を発揮する。我々はアデニル化酵素を利用した化学酵素的アミド結合形成反応によるジペプチドエステル合成とその自発的な分子内環化反応を連携させたDKPのワンポット合成法を開発しており (Fig. 6)、100種類を超えるDKPの合成に成功している。さらに今年度は、DKPの多様な機能や生物活性を評価するために、不斉有機触媒としての活性確認や、本学人間科学学術院教授の原太一先生の協力を得てオートファジー活性の評価を行った。

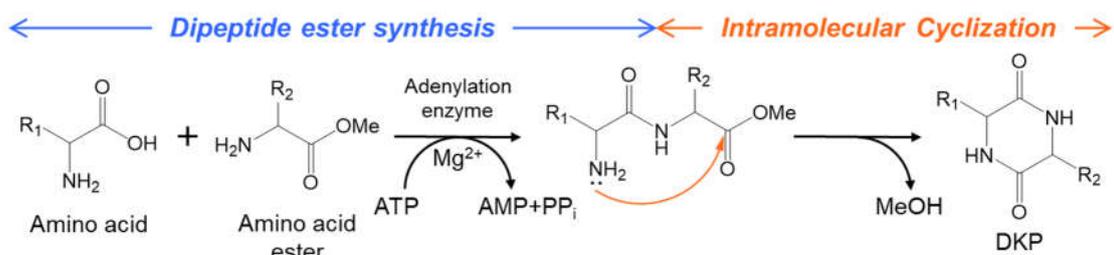


Fig. 6. 化学酵素的アミド結合形成反応と分子内環化反応の連携によるDKP合成

本手法によって合成される多様な DKP は水系の反応溶液中から酢酸エチルで容易に抽出・単離することができる。DKP に期待される機能性の評価を目的に、遊離アミノ酸である L-Proline(Pro)で報告されている不斉アルドール反応触媒能に着目し、ペプチドである DKP の不斉有機触媒としての利用を検討した。DMSO 溶媒中での Acetone と *p*-nitrobenzaldehyde の不斉アルドール反応において、Pro 含有 DKP に不斉有機触媒としての活性を見出すことができた。

また、DKP に期待される生物活性評価は、細胞内リサイクリングシステムで、様々な疾患の予防やアンチエイジングに関与しているオートファジーへの影響を検討した。本学人間科学学術院の原太一教授と矢野敏史助教の協力を得て行ったところ、オートファジーを活性化する DKP を 4 種類、反対に抑制する DKP 4 種類を見出した。また、その作用機序の解析から、オートファジーの主要な制御に関わる mTORC1 キナーゼに依存しないシグナルを介してオートファジーを活性化していることが示唆された。詳細は、別途報告を予定している。

以上、非標準アミノ酸を任意に含み特殊構造を有する環状ジペプチドでは、遊離アミノ酸とは異なる物性や構造特性に起因する多様な生物活性が期待でき、今後、具体的な評価系によって新たな機能を有する環状ジペプチドである DKP や前年度報告した DKM (ジケトモルフォリン：ヒドロキシ酸とアミノ酸が縮合・環化した環状デブシペプチド) が見出されると考えている。こうしたアミノ酸誘導体やペプチドは、生体に取り込まれたタンパク質が分解されて生成し、生体内シグナルとして機能している可能性が高く、食と健康（生命維持）における新たなメカニズムの発見につながるように思う。

## 2.5 麴菌の形態変化を指標とする AI 駆動型抗真菌剤スクリーニング

既存の抗真菌剤における耐性菌出現に対し、新規作用機序を有する抗真菌剤の創出が強く求められている。共同研究先の理化学研究所 CSRS では、薬剤が誘導する細胞形態変化をデータベース化したモルフォベースを構築し、新規抗真菌剤や抗がん剤を見出している。そこで、人工知能で形態を判別する第二世代モルフォベースを構築し、天然物スクリーニングへの適用を試みた。他の真菌に比べ薬剤感受性が低い麴菌を被験菌とし、抗真菌薬を含む標的既知の化合物約 120 種類の麴菌への生育阻害と形態変化を調べた。顕著な生育阻害が観察された化合物を作用機作ごとに分類し、その代表的な化合物を種々の濃度で添加した時の麴菌の形態データ（数百万枚）を用いてデータベースを構築した。その結果、80%以上の精度で麴菌の形態から作用機作を類推できるようになった。構築したデータベースを用いて、微生物培養エキス 6,418 種類を対象にスクリーニングを行ったところ、一部の微生物培養エキスが標的既知化合物とは異なる特徴的な形態変化を伴い顕著な抗真菌活性を示した。現在、当該微生物培養エキスからの形態変化の影響を及ぼす責任化合物の単離と同定を鋭意検討している。

従来の人間の目で判別していた微生物の形態変化を画像情報として蓄積し、その膨大な画像情報から AI を用いて識別することが可能になった。極めて高精度で効率的な探索手法として進化しており、作用機序の異なる新規候補化合物が探索できるようになると期待している。詳細は別途報告の予定である。

## 3. 共同研究者

長田 裕之（早稲田大学理工学術院・総合研究所・客員上級研究員）

二村 友史（早稲田大学理工学術院・総合研究所・次席研究員）

古屋 俊樹（東京理科大学・理工学部・応用生物科学科・准教授）

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）

駒 大輔（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. Kuniki Kino, Takuma Komabayashi, Ayaka Hashida, and Ayumu Kuramoto, “Improving the enzymatic activity of L-amino acid α-ligase for imidazole dipeptide production by site-directed mutagenesis”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **87**(4), 389-394 (2023). DOI: 10.1093/bbb/zbac213
2. Shota Karakama, Shin Suzuki, and Kuniki Kino, “One-pot synthesis of 2,5-diketopiperazine with high titer and versatility using adenylation enzyme”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **106**(12), 4469-4479 (2022). DOI: 10.1007/s00253-022-12004-y

### 4.2 総説・著書

1. 木野邦器, 住友グループ\_一水会東京 2 月度例会講演紹介: “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”, 令和 4 年度一水会 会報春季号、2022 年 7 月
2. 木野邦器, “次代の羅針盤: 若さゆえの荒々しさがほしい”, ハリマ化成グループ広報誌: Harima Quarterly, No.152 Autumn, 2022 年 8 月
3. 木野邦器, 古屋俊樹, “3-6 酵素探索・改良技術”, p.39-41, 日本生物工学会 100 年史: 第 3 章 生物工学の研究 100 年, 2022 年 10 月

### 4.3 招待講演

1. 木野邦器, “脱炭素化社会の実現に貢献するバイオテクノロジー”, 早稲田応用化学会中部支部 第 18 回交流会講演会, 2022 年 11 月

### 4.4 受賞・表彰

木野 邦器: 早稲田大学 2022 年度大隈記念学術褒賞 (記念賞) 2022.11.24.  
受賞研究課題名 「微生物機能の高度活用による革新的バイオプロセスの開発」

### 4.5 出願特許

該当なし

### 4.6 学会および社会的活動

1. Yushi Futamura, Fauze Bin Mahmud, Harumi Aono, Nobumoto Watanabe, Kuniki Kino, Hiroyuki Osada, “Mode of action study of a potent antimalarial compound, dihydrolucilactaene”, EP069, p.10, IUMS 2022, Rotterdam, Netherlands, 20-22 June (2022).
2. 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におけるモジュール構

- 成とアデニル化ドメインの基質認識との関係性”，日本農芸化学会関東支部大会，東農大，P-55 講演要旨集 p.53，ポスター発表 2022.8.27
3. 本元敦也，佐怒賀悠，木野邦器，“菌体反応系を用いたチロシン及び Dopa 含有ジペプチドの効率的合成法の開発”，日本農芸化学会関東支部大会，東農大，O-6 講演要旨集 p.8，一般講演\_口頭発表，2022.8.27
  4. 卯野宏幸，二村友史，長田裕之，木野邦器，“麹菌の形態変化を指標とする機械学習を用いた抗真菌剤探索法の開発”，No.7 p.5，第 32 回新薬創製談話会，研究奨励賞受賞
  5. 鈴木達也，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を利用したポリアミド合成への展開”，第 74 回日本生物工学会大会，講演番号 3A01-06，講演要旨集 \_p.149，2022.10.19 オンライン 大会トピックス選定課題
  6. 坂本紗津記，木野邦器，古屋俊樹，“炭素間二重結合を酸化開裂する酵素の機能改変とバニリン合成への応用”，第 74 回日本生物工学会大会，講演番号 3A03-05，講演要旨集 \_p.152，2022.10.19 オンライン
  7. 本元敦也，佐怒賀悠，木野邦器，“脳機能改善に資する生体内安定ジペプチドの創製と効率的生産法の開発”，P3-078，第 12 回 CSJ 化学フェスタ 2022，タワーホール船堀，2022.10.18
  8. 内田頌太郎，唐鎌翔太，鈴木伸，木野邦器，“アデニル化酵素を利用した環状ジペプチドの化学酵素的合成と機能性評価”，P5-072，第 12 回 CSJ 化学フェスタ 2022，タワーホール船堀，2022.10.19
  9. 永瀬あゆみ，鈴木伸，木野邦器，“化学酵素的アミド結合形成反応によって合成可能なジペプチド類似体を拡張するアデニル化ドメインの効率的探索法の開発”，P8-070，第 12 回 CSJ 化学フェスタ 2022，タワーホール船堀，2022.10.20
  10. 卯野宏幸，二村友史，長田裕之，木野邦器，“麹菌の形態変化を指標とする機械学習を用いた抗真菌剤探索法の開発”，P9-069，第 12 回 CSJ 化学フェスタ 2022，タワーホール船堀，2022.10.20
  11. Futamura, Y., Abdelhakim, I. A., Motoyama, T, Mahmud, F. B., Aono, H., Watanabe, N., Takahashi, S., Kino, K., and Osada, H.: “Identification of new Iucilactaene derivatives, with potent antimalarial activity”, P80, p.6, International Conference on Natural Product Discovery and Development in the Genomic Era, Jan. 8-12, 2023, Manchester Grand Hyatt Hotel, San Diego, CA.
  12. Uno, H., Futamura, Y., Kino, K., and Osada, H.: “Construction of AI-based screening system for antifungal substances based on morphological changes of *Aspergillus oryzae*”, Future Drug Discovery Empowered by Chemical Biology, P-37, p.37, Feb. 21-22, 2023, Nara, Japan
  13. Yushi Futamura, Fauze Bin Mahmud, Harumi Aono, Nobumoto Watanabe, Kuniki Kino, and Hiroyuki Osada, “SAR and mode of action study on potent antimalarial compounds, iucilactaenes”, Future Drug Discovery Empowered by Chemical Biology, P-07, p.7, Feb. 21-22, 2023, Nara, Japan
  14. 卯野宏幸，二村友史，長田裕之，木野邦器，“麹菌の形態変化を指標とする AI 駆動型抗真菌剤スクリーニング系の開発”，2E08-03，p.50，日本農芸化学会 2023 年度大会
  15. 青野晴美，二村友史，堀康宏，室井誠，平野弘之，西浦正芳，侯召民，木野邦器，長田裕

- 之，“抗カンジダ物質 TPPB の作用機序解析”，2E08-02，p.50，日本農芸化学会 2023 年度大会
16. 二村友史，青野晴美，山本甲斐，清水猛，R. Uson-Lopez，堀康宏，木野邦器，長田裕之，“カンジダ二形性を阻害する SF2768 の作用機序解析”，2E08-01，p.50，日本農芸化学会 2023 年度大会
17. 藤巻静香，木野邦器，古屋俊樹，“指向性進化法によるバニリン合成酵素の機能改変”，日本生物工学会東日本支部主催第 11 回コロキウム学生ポスター，2023.3.9.，早稲田大学
18. 二村友史，卯野宏幸，木野邦器，長田裕之，“麹菌の細胞形態を学習させた AI モデルによる抗真菌剤の探索”日本ケミカルバイオロジー学会第 17 回年会，大阪大学会館（大阪）2023.5.29-31

## 5. 研究活動の課題と展望

“スマートバイオプロセス”は第一期を 2022 年度で終了するが、次年度以降は第二期として本プロジェクト研究を継続する。これまでに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。バイオ研究を推進するための解析ツールや技術開発の進展は著しく、人工知能との連携もあって研究の効率化やスピードアップが可能となっている。それらを適宜駆使しながら研究を推進していく予定である。一方、これまでの研究を通して生命システムの緻密さとその裏に生物進化の原動力とも言うべき“ゆらぎ”の存在を知ることができた。こうした生命システムの特性を知り、それを研究の考え方や具体的な技術開発に活用することで、自然に摂理に沿った柔軟性のあるこれまでとは異なる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ってきている。地球上の生物の機能を潜在的な可能性も含めて最大限に活用し、究極的なバイオプロセスを達成していくことが、本プロジェクト研究“スマートバイオプロセス”の目指すものと位置付けて鋭意研究を推進していくつもりである。

## 6. 謝辞

本研究において、「イミダゾールジペプチドの効率的合成法の開発」は（国研）新エネルギー・産業技術総合開発機構の委託事業：開発項目「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発/産業用物質生産システム実証/バイオプロセスによるイミダゾールジペプチドの効率的生産方法の開発」JM08（本学代表：木野邦器）の、「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」と「特殊構造を有する環状ジペプチドの多様な機能評価」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」（代表：木野邦器）の、「麹菌の形態変化を指標とする AI 駆動型抗真菌剤スクリーニング」は科研費基盤 A（21H04720）「人工知能を活用した抗真菌剤の開発研究」（代表：長田裕之）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。