

アデニル化酵素を利用したアミド化合物生産法の開発

研究代表者 鈴木 伸
(理工学術院総合研究所 次席研究員)

1. 研究課題

現代社会は環境問題、エネルギー問題など様々な課題に直面している。これらを解決し、持続可能な社会の実現に向けた動きが加速する中で、化学産業ではより環境調和性の高いプロセスへの転換が求められている。近年、微生物や酵素の有する高い機能性を活用したバイオテクノロジーに期待が寄せられており、バイオ手法による物質生産法の開発はこれに大きく貢献すると考えている。

本研究では、化成品や医薬品、機能性食品素材など様々な分野・用途で利用されるアミド化合物を合成ターゲットとし、我々が開発した“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”を基盤技術として、多様なアミド化合物の生産への応用を検討した。

2. 主な研究成果

2.1 2,5-ジケトピペラジンの合成

2, 5-ジケトピペラジン(DKP)は 2 分子のアミノ酸が縮合・環化した化合物である。DKP はその構成成分であるアミノ酸の種類と光学異性により様々な生理活性を発現することが知られており、これらを制御した合成法の開発には、大きな意義がある。そこで、本研究では、L-アミノ酸と D-アミノ酸の両方を基質とするアデニル化酵素を用い、アミノ酸(Xaa)とアミノ酸メチルエステル(Yaa-OMe)を原料としたジペプチドエステル合成反応と、その自発的な分子内環化反応を組み合わせた、DKP のワンポット合成経路(図 1)の開発を行った。

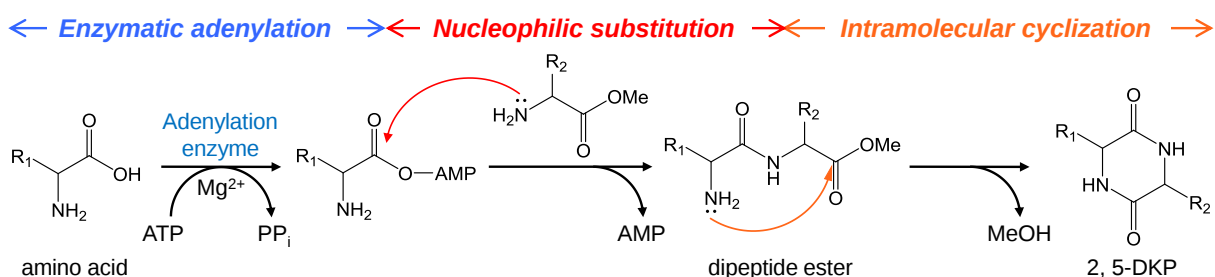


図 1. アデニル化酵素を利用した DKP のワンポット合成経路

2.1.1 合成可能な DKP のライブラリー化

これまで *Brevibacillus parabrevis* IAM1031 由来 TycA-A を用いることで、cyclo(Trp-Pro)の 4 種類の光学異性体の作り分けをはじめとして、複数の Xaa と Yaa-OMe の組み合わせで DKP 合成に成功している。本年度はこれをさらに拡張し、合成可能な DKP のライブラリー化を目指した。

TycA-A がアデニル化可能な 16 種類の L-および D-Xaa (Xaa=Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Tyr, Trp) と、6 種類の Yaa-OMe (Yaa=Gly, L-Pro, D-Pro, L-Ser, D-Ser, *trans*-4-L-Hyp)との組み合わせで DKP 合成反応を行った。HPLC によるピーク分取または酢酸エチルによる抽出操作の後、LC-MS

分析にて反応生成物の同定を行った。その結果、試験した 96 通りの組み合わせ全てにおいて予想される DKP である cyclo(Xaa-Yaa)の分子量と一致するピークが検出された。Pro-OMe や Ser-OMe を使用した場合にはその光学異性により LC における保持時間に差が見られ、異なる立体構造の化合物が生成していることを確認している。基質アミノ酸の光学異性に対しても同様であった。以上より、原料とするアミノ酸およびアミノ酸エステルを選択することで光学異性体も含めた DKP ライブラリーを構築でき、今後もその充実を図ることが可能な拡張性の高い手法であると考えている。

2.1.2 Cyclo(Trp-Pro)合成における反応条件検討

DKP 合成の現状の課題として、中間生成物であるジペプチドエステルの残存とアミノ酸エステルの加水分解に起因する副生成物の生成が挙げられる。環化反応、加水分解反応はいずれも pH 依存적であり、酵素的アデニル化反応も含む DKP 合成反応では pH 条件は重要なパラメータであると考えられる。そこで TycA-A を用いた cyclo(Trp-Pro)合成をモデルとして pH 条件を検討した。

TycA-A の反応 pH に関してはこれまでの知見から 8.0 が最適であり、7.0~11.0 の範囲では十分な活性が得られる。環化反応については cyclo(D-Trp-D-Pro)合成で蓄積していた D-Trp-D-Pro-OMe を HPLC 分取にて単離し、各 pH の緩衝液に添加することで検討した。pH 7.0~9.0 ではほぼ完全に環化反応が進行し、9.5 でも十分に進行した(図 2)。一方 Pro-OMe は pH 7.5 以上で顕著に加水分解された。以上から、反応 pH を 7.0 付近に制御することができれば、収率向上に繋がると思われる。

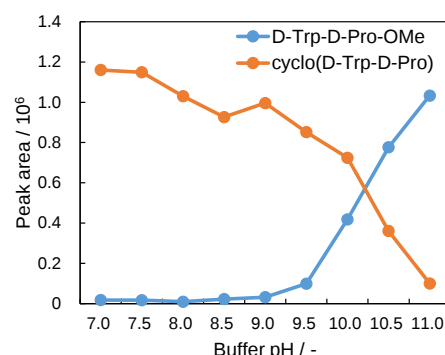


図2. 環化反応のpH依存性

2.2 ポリアミド化合物の合成

ポリアミドは単量体(モノマー)分子同士がアミド結合を介して複数連結した高分子化合物であり、モノマーの分子種により異なる機能性を示す多様なポリアミド化合物が存在する。しかしながら、酵素を利用したポリアミドの合成例としては、少数のポリアミノ酸合成酵素が知られるのみで、合成可能なポリアミド化合物の種類は非常に少ない。そこで、本研究ではカルボキシ基とアミノ基の両方を有する化合物をモノマーとし、これらを基質とするアデニル化酵素を利用することで、モノマーの活性化と生成した多量体(オリゴマー)との縮合を繰り返す図 3 のようなスキームによるポリアミド合成反応の開発を目的とした。

本報告では、アミノ酸をモノマーとし保湿作用や生体適合性を示すため医薬・医療分野での利用が期待されているポリアミノ酸の合成と、高耐久性や高耐熱性を示すことからエンジニアリングプラスチックとして利用される芳香族ポリアミド(アラミド)の合成に関する検討について述べる。

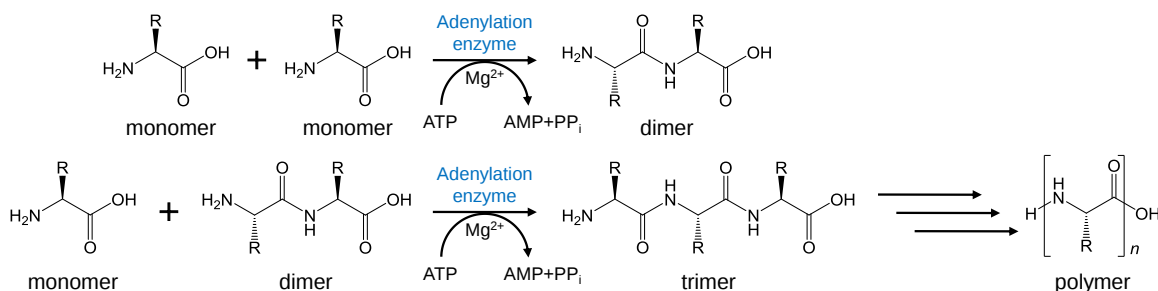


図 3. アデニル化酵素を利用したポリアミド合成反応(ポリアミノ酸合成の例)

2.2.1 ポリアミノ酸合成

TycA-A が認識可能な基質のうち 14 種類の L-および D-アミノ酸を原料としてポリアミノ酸合成を行い、反応生成物を LC-MS 分析にて解析した。表 1 に示す鎖長のポリアミノ酸に相当するピークが検出され、試験した全てのアミノ酸で 4 量体までは生成しており、D-Ala では最長 10 量体までの生成が確認できた。本結果より図 x の反応スキームによるポリアミド合成が可能であることを実証できた。

表1. 合成が確認できたポリアミノ酸

Substrate	Length	Substrate	Length
L-Ala	2-9 mer	D-Ala	2-10 mer
L-Val	2-6 mer	D-Val	2-6 mer
L-Leu	2-5 mer	D-Leu	2-5 mer
L-Met	2-6 mer	D-Met	2-6 mer
L-Phe	2-4 mer	D-Phe	2-4 mer
L-Tyr	2-6 mer	D-Tyr	2-5 mer
L-Trp	2-4 mer	D-Trp	2-4 mer

2.2.2 芳香族ポリアミド合成に向けた検討

芳香族ポリアミドの合成においては、モノマーとなるアミノ安息香酸およびその構造類似体を基質とするアデニル化酵素が必要である。そこで、様々な芳香族カルボン酸を基質とする *Bacillus subtilis* str. 168 由来 DhbE がこれらに対するアデニル化活性を示すか基質特異性評価を行った。その結果、アミノ安息香酸の 3 種類の異性体および 3 種類の *N*-メチルアミノ安息香酸、7 種類のヒドロキシアミノ安息香酸を含む計 15 種類のアミノ安息香酸類を基質とすることが判明した。

続いてこれら 15 種類のアミノ安息香酸類を原料とした芳香族ポリアミド合成反応を行い、反応生成物を LC-MS 分析にて解析した。12 種類の原料において二量体(ダイマー)の分子量に相当するピークが検出され、DhbE の基質になると同時に求核剤としても反応することが確認できた。しかしながら、三量体(トリマー)以上の分子量に相当するピークは検出されず、今後長鎖化に向けた更なる検討が必要である。

3. 共同研究者

木野 邦器 (先進理工学部・応用化学科・教授)

4. 研究業績

4.1 学術論文

4.2 総説・著書

4.3 招待講演

4.4 受賞・表彰

4.5 学会および社会的活動

5. 研究活動の課題と展望

本年度は主に DKP 合成およびポリアミド合成に関する検討を行った。DKP 合成においては、様々なアミノ酸およびアミノ酸エステルの組み合わせで立体構造を制御した合成を達成し、拡張性の高い DKP ライブラリーを構築した。今後更に種類を充実させることで、生理活性評価を通じた新規機能性 DKP の創出にも繋がるものと考えている。また、引き続き反応条件の最適化を行い DKP 生産性の向上を目指す。ポリアミド合成においては、アミノ酸をモノマーとした場合には多量体の合成が確認でき、想定した反応スキームは実証できたものの、アミノ安息香酸類を用いた場合には 3 量体以上の合成は確認できなかった。ポリマーの長鎖化に向けて反応条件検討を進めていく。さらに、脂肪族ポリアミドなど他の分子種をモノマーとするポリアミドの合成にも展開していきたい。