

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ている。

2. 主な研究成果

2.1 α -ケト酸・ α -ヒドロキシ酸アデニル化酵素の探索とペプチド類似体合成

ジペプチドをはじめとするペプチド化合物は単体のアミノ酸にはない有用な生理活性を示すものが数多く知られている。しかしながら、一般的なL-アミノ酸のみからなるペプチドは生体内で加水分解を受けやすいことや膜透過性が低いことなどが創薬研究において課題となっている。これらの課題に対して、我々は天然に存在する特殊ペプチドの構造に倣い、構成アミノ酸を α -ケト酸や α -ヒドロキシ酸といった構造類似体に置換したペプチド類似体の合成法開発を検討した。

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)である Vlm2A や EchA-A などが複数の α -ケト酸や α -ヒドロキシ酸を基質とすることを見出し、ジペプチド類似体の合成にも成功している。本研究ではさらに合成可能なペプチド類似体の拡張を目的として、NRPS のモジュール構成に着目した新規 A ドメインの探索を行った。

我々は NRPS において L-アミノ酸を D-アミノ酸へ変換するエピメリ化ドメインの上流に存在する A ドメインは L-アミノ酸と D-アミノ酸の両方をアデニル化可能であることが多いことを明らかにしている。この実験的事実を踏まえ、 α -ケト酸を α -ヒドロキシ酸へ変換する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 ドメインはこれら両方を認識する可能性が高いのではないかと仮説を立てた。検証には *Streptomyces orinoci* NBRC13466 由来ネオアンチマイシン合成酵素の3種類の A ドメイン NatB2-A, NatB3-A, NatD-A(図1)を選択し、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生成確認により行った。

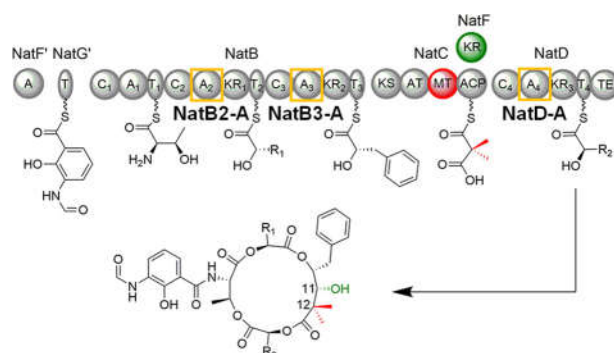


図1. *Streptomyces orinoci* NBRC13466 由来ネオアンチマイシン合成酵素のモジュール構成

各 A ドメインの生理基質を含む 6 種類の α -ケト酸とそれに対応する 6 種類の α -ヒドロキシ酸を基質とし、L-Pro と反応させることでジペプチド類似体合成試験を行った。LC-MS 分析による評価を行ったところ、NatB2-A と NatD-A は 12 種類の基質すべてに対応するジペプチド類似体の合成が確認できた。NatB3-A は 5 種類の α -ケト酸と 3 種類の α -ヒドロキシ酸の計 8 種類に対して合成が確認された(図 2)。

以上の結果より、選択したすべての A ドメインが α -ケト酸のみならず α -ヒドロキシ酸も基質として認識しており、KR ドメインがヒドロキシ酸を認識可能な A ドメインの探索指標となりえるという仮説を実証できた。また、これら A ドメインが多岐にわたる α -ケト酸と α -ヒドロキシ酸を基質とすることも明らかとなり、合成可能なペプチド類似体の種類拡張にも成功した。

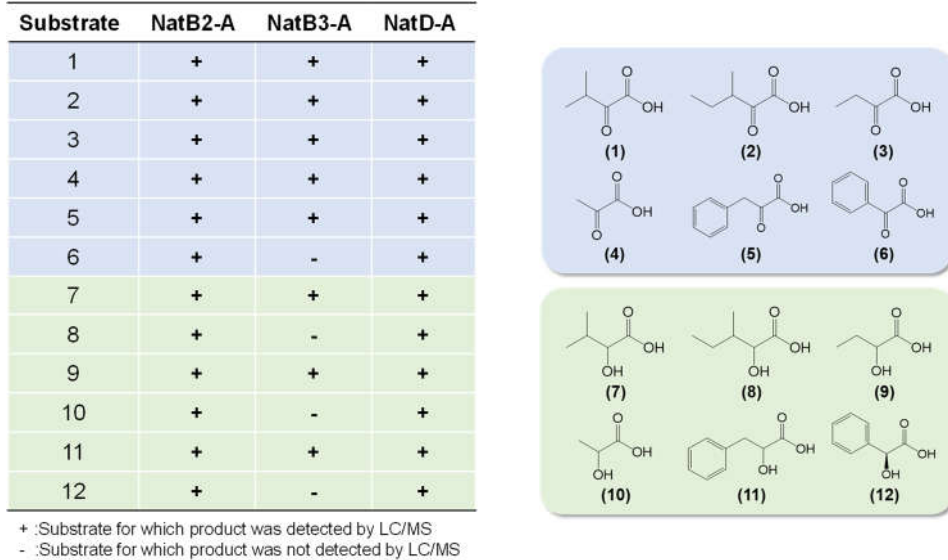


図 2. NatB2-A, NatB3-A, NatD-A の α -ケト酸および α -ヒドロキシ酸に対する基質特異性評価

2.2 ジペプチド類似体の分解性試験

L-アミノ酸のみからなるジペプチド L-Phe-L-Pro と、L-Phe を L-フェニル乳酸(L-PLA)に置換したジペプチド類似体 L-PLA-L-Pro の生体における加水分解抵抗性の比較を行った。アデニル化酵素を用いて両化合物を合成し、その反応液に対して大腸菌の細胞抽出液、ドライイースト、土壤微生物の細胞抽出液を添加して加水分解試験を行った。大腸菌抽出液を作用させた場合、L-Phe-L-Pro は時間経過に伴って分解されているのに対して、L-PLA-L-Pro では 24 時間の反応後でも分解されていなかった(図 3)。ドライイーストや土壤微生物抽出液でも同様の結果が得られ、ジペプチド類似体はペプチダーゼ等の加水分解酵素に対して分解抵抗性を示すことが示唆された。

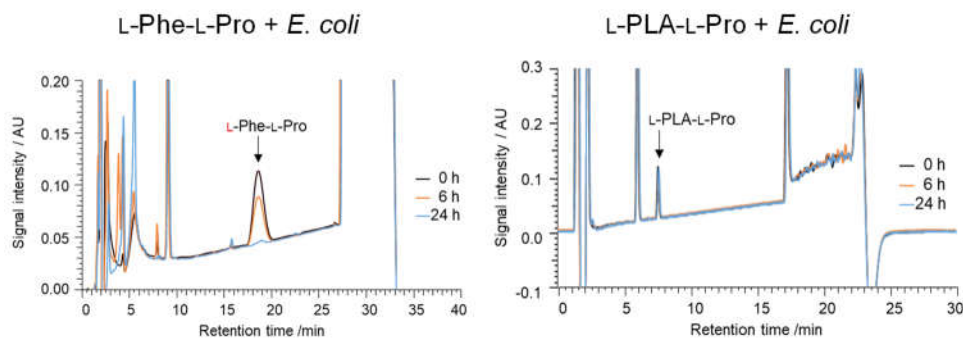


図 3. ジペプチド(L-Phe-L-Pro)とジペプチド類似体(L-PLA-L-Pro)の加水分解抵抗性の比較

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

- 1) Shota Karakama, Shin Suzuki, Kuniki Kino, "One-pot synthesis of 2,5-diketopiperazine with high titer and versatility using adenylation enzyme", *Applied Microbiology and Biotechnology*, **106**, 4469-4479(2022), doi:10.1007/s00253-022-12004-y

4.2 総説・著書

- 1) 倉本 歩, 佐藤 謙一郎, 鈴木 伸, 木野 邦器, 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生産技術の開発", 生物工学会誌, **101**(4), 204-205(2023)

4.3 招待講演

4.4 受賞・表彰

- 1) 第74回日本生物工学会大会 大会トピックス
選定講演「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」
鈴木 達也, 唐鎌 翔大, 鈴木 伸, 木野 邦器, 第74回日本生物工学会大会トピックス集, 18-19

4.5 学会および社会的活動

- 1) 鈴木 達也, 唐鎌 翔大, 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, 3A01-06, オンライン(大阪)
- 2) 内田 頌太郎, 唐鎌 翔大, 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", 第12回CSJ化学フェスタ, P5-072, タワーホール船堀(東京)
- 3) 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", 第12回CSJ化学フェスタ, P9-069, タワーホール船堀(東京)
- 4) 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2022年度大会, P-55, 東京農業大学(東京)

5. 研究活動の課題と展望

NRPS のモジュール構成に着目した新規 A ドメインの探索手法を実証するとともに、幅広い α -ケト酸および α -ヒドロキシ酸を基質とすることが可能な A ドメインを複数見出すことができた。これら A ドメインは α -ケトアミドや α -ヒドロキシアミドなど様々なジペプチド類似体の合成に適用できるほか、 α -ヒドロキシアミドの環化体であるジケトモルフォリン(DKM)の合成にも展開可能である。定量的解析と効率的な生産法の開発を推進する。また、ジペプチドとジペプチド類似体の機能性比較の一例として微生物を利用した加水分解試験を行い、後者の方が優位であることを示した。分解抵抗性以外にも高い機能性や新規な機能を有することが期待されるため、各種生理活性評価や機能性評価も実施していきたい。