

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 2,5-ジケトピペラジンの効率的生産プロセスの開発

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。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、アミノ酸とアミノ酸エステル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)を開発している。これまでに *Brevibacillus parabrevis* IAM1031 由来 TycA-A により、100 種類を超える DKP の合成に成功しているが、中間体の蓄積や副生成物など生産効率には改良の余地がある。

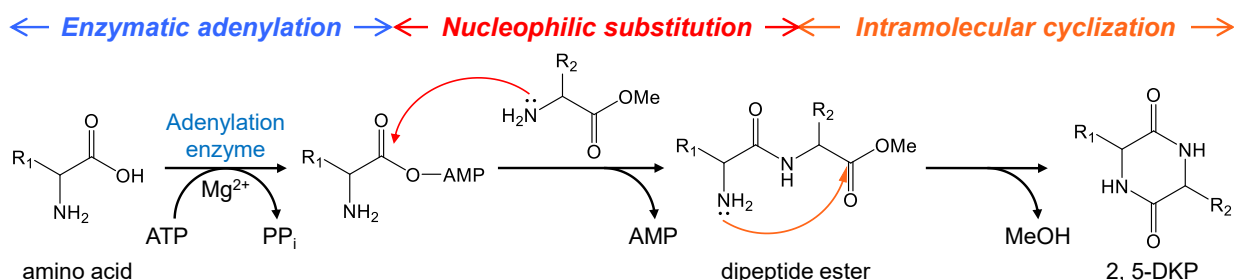


図 1. アデニル化酵素を利用した DKP のワンポット合成経路

DKP 合成に関連する各反応はいずれも pH 依存的であると考え、昨年度までに 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。酵素反応は 8.0 が最適で 6.5~11.0 で進行、環化反応は 6.5~9.5 で効率的に進行、Pro-OMe の加水分解は塩基性条件下で顕著に進行し副生成物の原因となることを見出している。以上の結果を総合し、反応液 pH を中性付近(6.5~7.3)で継続的に維持することで、DKP の合成効率を向上させることができると推測した。

そこで、pH スタットによる制御系を導入した試験管スケールのバイオリアクター(図 2)を構築し、下限 pH を 6.5, 6.7, 6.9, 7.1 に設定して cyclo(L-Trp-L-Pro)合成量を比較した。その結果 6.9 に設定した際に合成量が最大となった。この条件で反応の経時変化を測定したところ、10 h で基質 L-Trp が完全に消費され、最終的に 24 h で最大 4.1 mM(1.1 g/L)の cyclo(L-Trp-L-Pro)合成を達成した。初期の反応条件(緩衝液による)と比較して対 L-Trp 収率は 1.9 倍、反応スケールを加味した生産量は 86 倍となり、反応効率の向上とスケールアップに成功した。

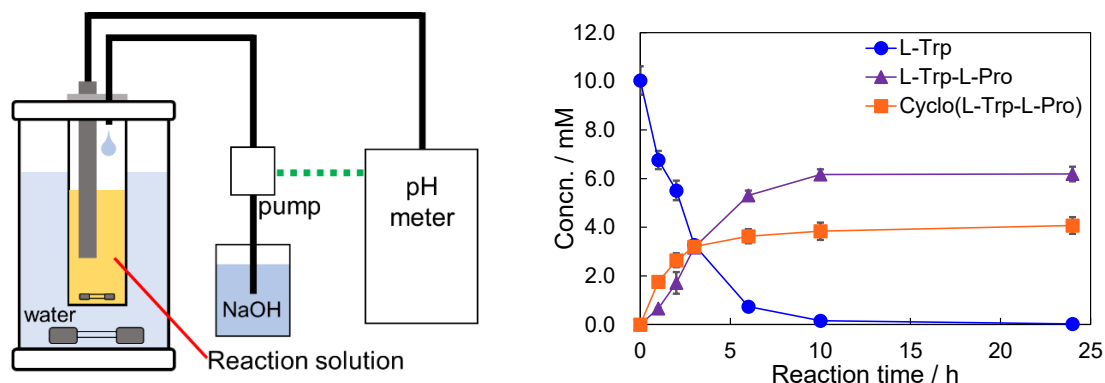


図 2. pH 制御系を導入した cyclo(L-Trp-L-Pro)合成の経時変化(下限 pH 6.9)

2.2 2,5-ジケトモルフォリンの合成法開発

2,5-ジケトモルフォリン(DKM)はヒドロキシ酸とアミノ酸が縮合・環化した環状デブシジペプチドである。開環重合によりポリエステルアミドに変換可能で高分子素材の原料となるほか、近年様々な生理活性を示すことが報告され、DKP とともに医薬・創薬分野で注目されている。

本研究では DKP と DKM の構造類似性に着目し、我々が開発した DKP のワンポット合成法を応用することで、アミノ酸の構造類似体であるヒドロキシ酸とアミノ酸エステルを原料とした DKM 合成へと展開可能であると推測した(図 3)。

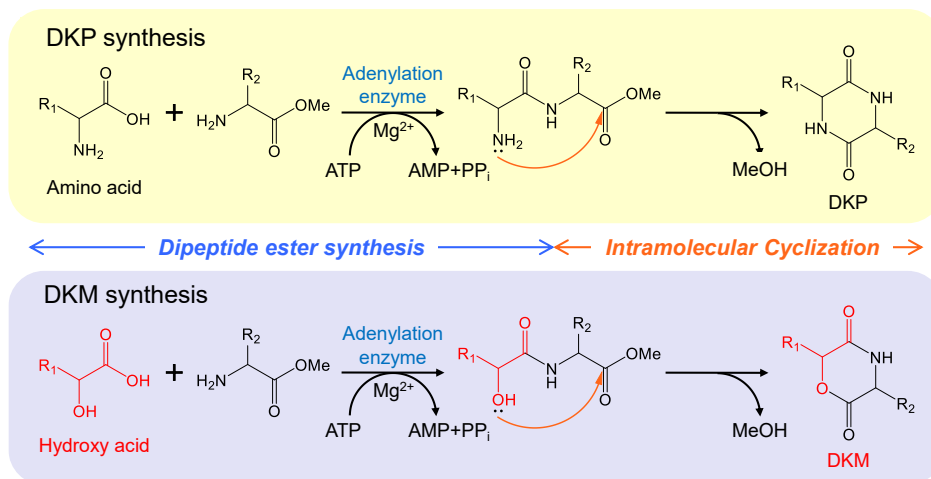


図 3. DKP 合成反応と DKM 合成反応の類似性

DKM 合成に必要なヒドロキシ酸を基質とするアデニル化酵素として L-乳酸(L-Lac)と D-乳酸(D-Lac)を認識する *Streptomyces tsusimaensis* NBRC 13782 由来 Vlm2A に着目し、L-Lac または D-Lac を L-Pro-OMe と反応させたところ、LC/MS 分析において、cyclo(L-Lac-L-Pro)および cyclo(D-Lac-L-Pro)の分子量と一致するピークがそれぞれ検出され、目的とする DKM の生成を確認できた。

さらに、使用可能なヒドロキシ酸の種類拡張を狙った。Vlm2A が乳酸のみならず L-, D-Ala も基質としたことから、逆にアミノ酸を基質とするアデニル化酵素の中にヒドロキシ酸に対する活性の存在を考えた。基質認識が寛容で多種類の L-, D-アミノ酸を基質とする TycA-A を評価したところ、L-, D-フェニル乳酸(PLA), DL-4-ヒドロキシフェニル乳酸, DL-インドール-3-乳酸を認識した。これら 4 種類のヒドロキシ酸を L-Pro-OMe と反応させると、各ヒドロキシ酸に対応する DKM が生成した。また、L-PLA 及び D-PLA に対してさらに 4 種類のアミノ酸エステル Xaa-OMe (Xaa = Gly, L-Ser, L-Thr, *trans*-4-L-Hyp)を検討したところ、すべての組み合わせで DKM 合成を確認した。ヒドロキシ酸を基質とするアデニル化酵素を利用することで、DKM 合成を実証することができた。

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*, Under revision

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, **93**, 338-348 (2021)

4.3 招待講演

4.4 受賞・表彰

4.5 学会および社会的活動

- 1) 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, G2H3-0204, オンライン(沖縄)
- 2) 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, G2H3-0205, オンライン(沖縄)
- 3) 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, 4B09-03, オンライン(京都)
- 4) 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, 4B09-08, オンライン(京都)

5. 研究活動の課題と展望

DKP 合成においては pH 制御系の導入により生産性を大きく向上させることができた。一方で副生成物量は未だ多く、今後の条件検討により改善を目指す。また、ヒドロキシ酸を基質とする酵素の利用により DKM のワンポット合成へと展開できた。基質の範囲や活性の面でより高機能な新規酵素の探索にも取り組んでおり、これらを活用した DKM やペプチド類似体の合成を進める。