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体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。これまでに、酵素合成法によるβ-Ala-Dopa ならびにペプチド分解酵素である PepD の欠損変異を付与した大腸菌宿主を利用する菌体反応系で対基質モル変換率 70%を越える高収率を達成した。昨年度は、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収率 98%を達成しているβ-Ala-Tyr を *Ralstonia solanaceaum* 由来チロシナーゼでβ-Ala-Dopa に変換する酵素反応プロセスにおいて、アスコルビン酸(AsA)の添加効果と合わせて、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. 1)。

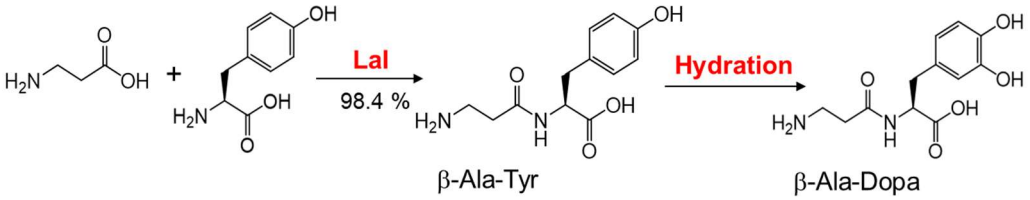


Fig. 1　β-Ala-Tyr からのβ-Ala-Dopa への変換するプロセス

今年度は、生体内におけるβ-Ala-Dopa の動態解析の結果、任意の L-アミノ酸 Xaa から成る Dopa 含有ジペプチドの合成法を検討した。Xaa-Dopa は宿主大腸菌が有する各種ペプチダーゼによって容易に分解されるため、菌体反応系は利用できない。そこで、ATP 再生を可能とするポリリン酸キナーゼ(PKK)と共役させる精製酵素反応系を検討した（Fig.2)。

当該反応に最適な PPK として ADP から ATP へ高い変換効率を示した Class I PPK2 である *Pseudomonas aeruginosa* 由来 Pa0141 を選択し、供与ポリリン酸は $PolyP_{10\sim15}$ を使用することとした。Ala-Tyr をモデルジペプチドとして初期投入 ATP 量、ポリリン酸添加量の影響を検討し、ATP 当量添加系とほぼ同等の Ala-Tyr 合成を達成した。さらに、Ala-Tyr を基質として NP_518458 で

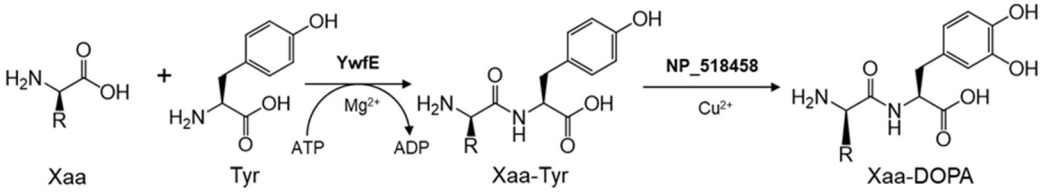


Fig. 2. 任意の L-アミノ酸 Xaa と Dopa から成るジペプチド合成

処理すると、極めて短時間で Ala-Tyr を Ala-Dopa に変換した。Fig.3 では、反応 15 min でモル変換率 80%を達成したが、反応時間が長くなると反応溶液は呈色度を増した。これは、NP_518458 が有するジフェノラーゼ活性による Ala-Dopa のメラニン類への酸化が促進されたからだと推察した。

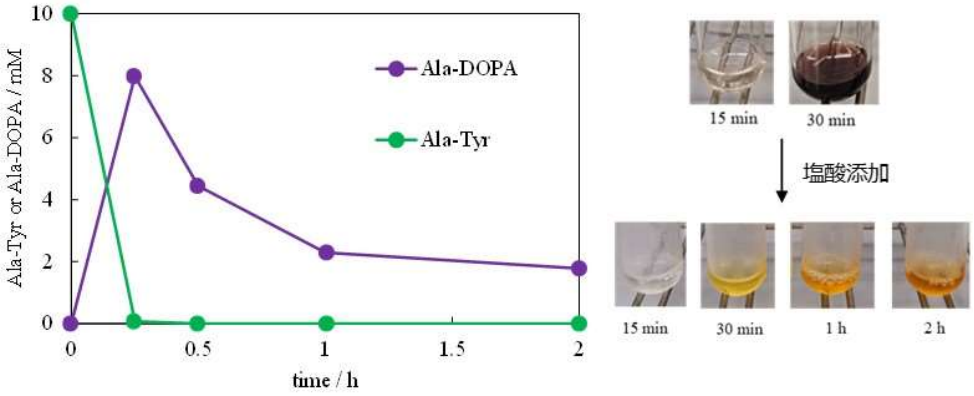


Fig. 3. チロシナーゼ NP_518458 による Ala-Tyr から Ala-Dopa への変換反応と呈色

2.2. イミダゾールジペプチドの効率的合成法の開発

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して潜在的需要のあるイミダゾールジペプチド (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) がある。我々はアミノ酸リガーゼ（Lal）を利用して ATP の必要のない菌体反応系によるカルノシンの低コストでの実生産プロセスを確立しているが、NEDO の支援を受けてカルノシンをさらにメチル化してアンセリンに変換する工業的プロセスの開発研究を行っている（Fig. 4.)。

昨年度に続き、カルノシンのメチル化による変換率向上を鋭意検討した。メチル化酵素の可溶化発現を高めることが最も効果的だと思っていたが、メチル化酵素発現条件などを検討し、単に酵素発現量の向上だけでなく、SAM をメチル基供与体とするカルノシンのメチル化反応に関わる菌体の状態や培養・反応時の通気攪拌や糖質などの供給方法などが変換率に大きく影響を及ぼすことなどを見出した。当初の目標変換率 40%を達成できる可能性を見出した。

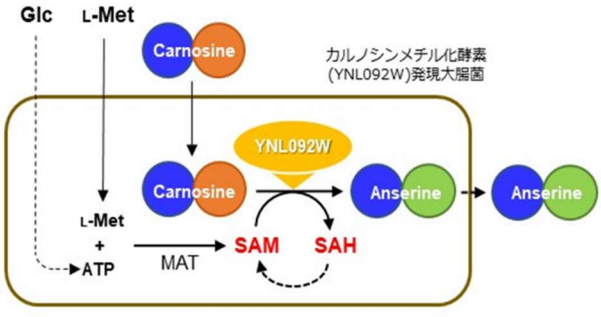


Fig.4 菌体反応系によるカルノシンからのアンセリン生産

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

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。

昨年度はアデニル化酵素を利用するアミド結合形成反応の特性を踏まえ、求核活性を有するペプチドの連結によるオリゴマー（2〜9 mer からなるポリアミノ酸）合成が可能であることを明らかにした。但し、鎖長制御や合成量に課題が残った。そこで、今年度はアデニル化酵素（本研究では NRPS のアデニル化ドメインをモデュールから切り離して単独発現させたアデニル化活性体）の基質多様性に改めて着目し、ジペプチドを基質にし得る可能性を検討した。具体的には、*Brevibacillus brevis* ATCC8155 のチロシジン合成酵素由来のアデニル化ドメイン“TycA-A”は、生理基質である L-Phe 以外に 7 種類の D, L-アミノ酸やヒドロキシ酸など様々な化合物に対して活性を示す。TycA-A の寛容な基質認識活性から、ジペプチド以上の化合物のアデニル化の可能性を期待した。例えば、ジペプチドをアデニル化基質として認識すれば、これまでのアミド結合形成反応を適用することで、求核的反応によるヘテロジペプチドの連結によるテトラペプチドの新たな合成を達成することができ、それは実用性の高いオリゴペプチド合成プロセスの開発につながる（Fig. 5）。

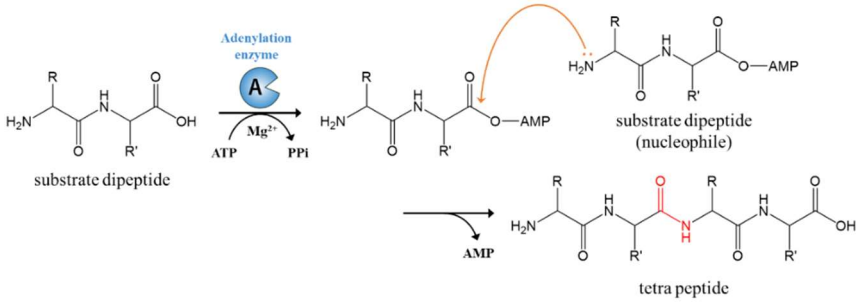


Fig. 5.　アデニル化酵素を利用する化学酵素的アミド結合形成反応によるオリゴペプチド合成

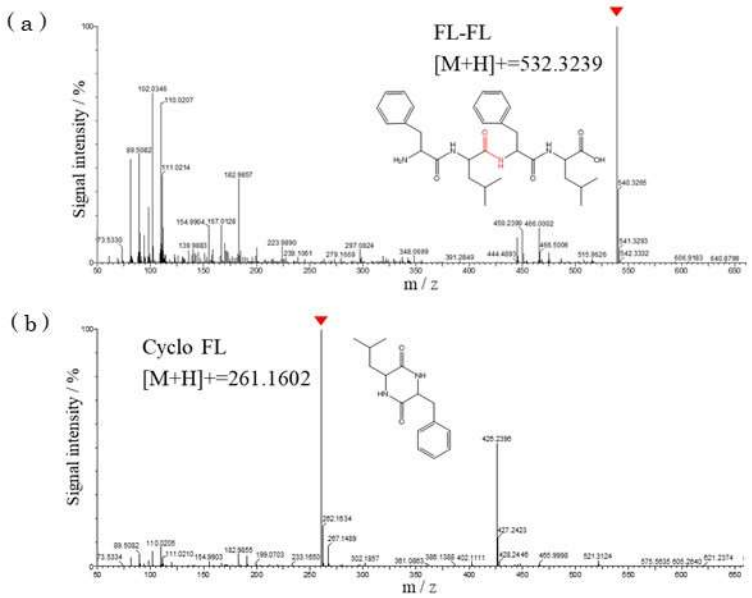


Fig. 6.　Phe-Leu を基質とした(a)テトラペプチド及び(b)ジケトピペラジン合成の LC-MS 解析

比色分析による基質特異性評価の結果、TycA-A は Phe や Trp を含有する様々なジペプチドに対しても活性があることが明らかになった（データ略）。そこで、実際にそれら多様なジペプチドを基質として、テトラペプチドの合成可否を検証した。

LC-MS 分析では、Phe-Leu を基質した時の結果を Fig. 6 で示したが、複数のジペプチドにおいて対応するテトラペプチドの MS ピークが検出された(a)。さらに、ジペプチドが環化したジケトピペラジン（DKP）に相当する MS ピークも確認した（Fig. 6. (b)）。これは、ジペプチドがアデニル化されたのちに分子内環化して生成したと考えられる。テトラペプチドよりも DKP の方が多く検出されていることから（データ略）、反応液中で基質の周囲にある別のジペプチドのアミノ基よりも、基質分子内のアミノ基の方が素早く求核攻撃をした結果であると推察している。

以上、我々がこれまでに明らかにしてきた NRPS 由来アデニル化酵素の寛容な基質特異性によって、極めて多様なジペプチドやオリゴペプチドならびにジペプチドが環化したジケトピペラジン（DKP）が容易に合成可能であることを見出した。この成果は、「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」の成果と併せ、キラリティを制御した多様なテトラペプチドをはじめとするオリゴペプチドの創製と新たな機能性を創出する基盤技術として貢献するものである。

2.4　特殊構造を有する環状ジペプチド及びその類縁体の合成法の検討と機能評価

前年度に検討した環状ジペプチドであるジケトピペラジン(DKP)の効率的合成法に加えて、その類縁体であるジケトモルホリン(DKM)の合成法を検討した。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。これまでに、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。

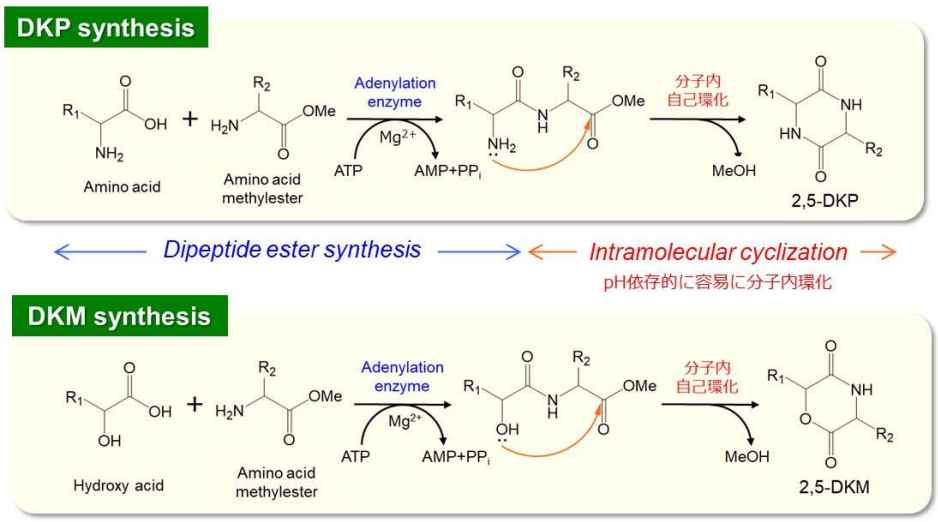


Fig. 7. 化学酵素的アミド結合形成反応と分子内環化反応の連携による DKP 及び DKM 合成

一部の DKP では、グラムオーダーでの合成に成功はしているが、さらに合成量を高めるために L-アミノ酸リガーゼ(Lal)の利用を検討した。C 末端基質となるアミノ酸メチルエステルを認識するオリゴペプチド合成酵素で検討を行った。*Streptococcus pneumoniae* 由来の spr0969 では、Leu

と Leu-OMe を基質して cyclo(Leu-Leu)を変換率 27%で合成したが、Leu のホモジペプチドやオリゴペプチド合成の方が活性は高く、単一化合物としての合成活性量を高めることはできなかった。

一方、DKM はヒドロキシ酸とアミノ酸がアミド結合したものが環化してエステル結合を有する環状のデプシペプチドで、合成法や生物活性に関する研究報告は DKP より少ないもののその構造から予想される生物活性は DKP よりも多様であることが期待されている。DKM も DKP と同じ反応プロセスで合成は可能だが、Fig. 8.に示したように DKP 合成に比較し、DKM 合成の末端の求核性が弱いため自己環化はしにくい。そのため、Fig. 7.で示したようなワンポットワンフェーズでの合成プロセスは不適切であると考えた。

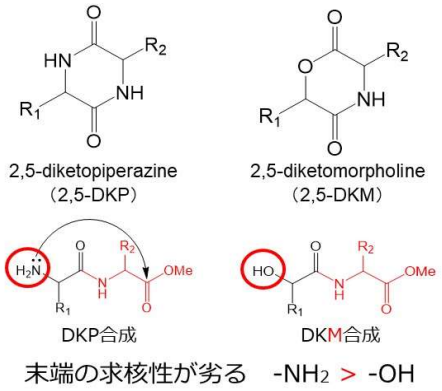


Fig. 8. DKP 及び DKM の合成における環化活性比較

そこで、アデニル化ドメインによるヒドロキシ酸とアミノ酸の結合反応と、水を除去して有機溶媒と酸を添加して環化させるワンポットツーフェーズでの DKM 合成を検討した（Fig. 9.）。

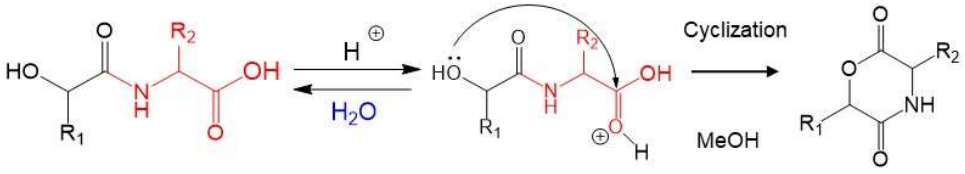


Fig. 9. 新たな環状化プロセスによる DKM 合成法

詳細は 2024 年度に検討・報告するが、Fig. 9. の反応プロセスにおいて酸の添加により DKM 合成量の増加を確認しており、また、非水系雰囲気を形成する種類の溶媒を使用する方が DKM の合成量は増加することを確認している。

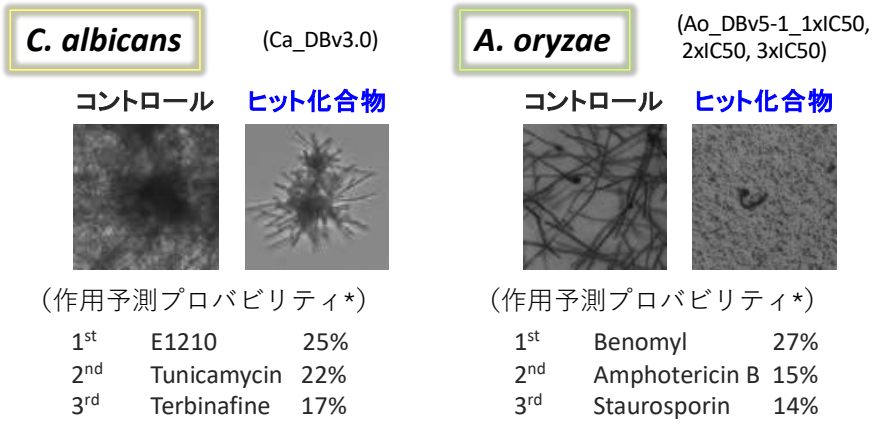
昨年度既に報告しているが、本学人間科学学術院教授の原太一先生と矢野敏史助教の協力を得て、各種 DKP のオートファジー活性の評価を行った。オートファジーを活性化する DKP と、反対に抑制する DKP をそれぞれ 4 種類見出していたが、それら DKP の類縁体（構成アミノ酸を置換した DKP）での評価を行い、構成するアミノ酸に大きく依存することが明らかになった。また、その作用機序の解析から、一般に知られる栄養飢餓シグナルとは異なるオートファジー活性化機構の存在が示唆された。さらに、構成するアミノ酸の D/L 立体異性によって、オートファジー活性に異なる効果を示すことも見出した。現在のところ、DKP のオートファジーに関する報告はほとんどなく、本研究成果は DKP を機能性成分として活用する上で、有用な知見となると考えられる。詳細は、2024 年度の学会で報告を予定している。また、DKM の合成法が構築され生物活性を評価できるようになると、また、新たな生理機能や生物活性が見出されることが期待でき、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　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

新規作用機序を有する抗真菌剤を創出するため、理化学研究所 CSRS との共同研究で、麹菌

Aspergillus oryzae の形態変化を人工知能（AI）で判別する第二世代モルフォベースを構築した。今年度は、ヒト三大真菌症の病原菌 *Candida albicans* を被験菌とし、顕著な生育阻害が観察された抗真菌薬を含む標的既知の化合物 20 種類を添加した時の *C. albicans* の形態データ（54,000 枚）を用いてデータベースを構築した。その結果、90%以上の精度でカンジダの形態から作用機作を類推できるようになった。理研化合物ライブラリーNPDepo の化合物 2,758 種類を対象にスクリーニングを行い、*C. albicans* や *A. oryzae* に対して強力な抗菌活性を示す化合物を 1 種類見出した。本化合物がこれらの菌に対して誘導する形態変化を AI で解析したところ、類似度の高い表現型はモルフォベースに収載されておらず、標的既知化合物とは作用が異なることが示唆された。ヒット化合物の作用機序は *C. albicans* の遺伝子破壊株コレクションを用いた薬剤感受性プロファイリングで予測した。さらに推定した効果を細胞レベルで検証し、同化合物が新規作用機序を有する First-in-class の抗真菌剤であることを見出した。詳細は別途報告の予定である。

麹菌だけでなく、カンジダの形態変化情報を組み合わせた AI 解析で、より高精度で効率的に新規作用機序をもった化合物を見出すことができた。現在、植物病原菌の形態解析プラットフォームの整備も進めており、医薬のみならず農薬に資する新規抗真菌剤の発見が期待できる。



* プロバビリティが 70% 以上で対象化合物との類似性あり

Fig. 10. ヒット化合物が誘導する形態変化と AI モルフォベースでの解析結果

３． 共同研究者

長田 裕之（理化学研究所、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（理化学研究所・主任研究員、早稲田大学理工学術院総合研究所・招聘研究員）
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（東海物産株式会社・研究員、早稲田大学理工学術院総合研究所・嘱託研究員）
原 太一（早稲田大学人間科学学術院・教授）
矢野 敏史（早稲田大学人間科学学術院・助教）
駒 大輔（大阪産業技術研究所・主任研究員、早稲田大学理工学術院総合研究所・招聘研究員）
鈴木 俊二（山梨大学ワイン科学研究センター・教授）
青木 是直（山梨大学ワイン科学研究センター・果実遺伝子工学研究部門・助教）

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).
2. Jun Ohnuki, Yasuhiro Arimura, Tomonori Kono, Kuniki Kino, Hitoshi Kurumizaka, and Mitsunori Takano, “Electrostatic ratchet for successive peptide synthesis in nonribosomal molecular machine RimK”, *J. Am. Chem. Soc.*, **145**(29), 15963-15970 (2023).
3. Shizuka Fujimaki, Satsuki Sakamoto, Shota Shimada, Kuniki Kino, and Toshiki Furuya, "Engineering a coenzyme-independent dioxygenase for one-step production of vanillin from ferulic acid", *Appl. Environ. Microbiol.*, *in press* Paper #AEM00233-24R1

4.2 総説・著書

該当なし

4.3 招待講演

1. 木野邦器, “生命システムの曖昧さを利用した特構造ペプチド合成法の開発”第 10 回 SBJ シンポジウム　―微生物利用の大展開と未来社会―　日本生物工学会, 2023.5.31. 大阪千里ライフサイエンスセンター
2. 木野邦器, “創薬研究に資する低分子アミノ酸誘導体合成法の開発”理研-早稲田シンポジウム 2023　―化学と微生物の接点―, 2023.6.24. 早稲田大学

4.4 受賞・表彰

木野邦器, 倉本歩：2023 年度日本農芸化学会英文誌 BBB 論文賞
Biosci. Biotechnol. Biochem., **87**(4), 389-394 (2023).　　DOI: 10.1093/bbb/zbac213

4.5 出願特許

該当なし

4.6 学会および社会的活動

1. 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, P-102、大阪大学会館（大阪）2023.5.29-31
2. 神谷愛香, 鈴木伸, 木野邦器, “Fatty acyl-AMP ligase を用いた *N*-アシルエタノールアミンの化学酵素的合成”, 第 75 回日本生物工学会大会, 講演番号 1Ap02, 講演要旨集_p.81, 2023.09.04, 名古屋大学
3. 永田理彩子, 鈴木伸, 木野邦器, “非リボソーム型ペプチド合成酵素由来エピメリ化ドメインの単独発現と活性評価”, 第 75 回日本生物工学会大会, 講演番号 1Ap03, 講演要旨集_p.81, 2023.09.04, 名古屋大学
4. 倉本歩, 木野邦器, 佐藤謙一, 岡田行夫, “バイオプロセスによるカルノシン生産法の開発”, 第 75 回日本生物工学会大会, 講演番号 3Lp05, 講演要旨集_p.270, 2022.09.04, 名古屋大学,

大会トピックス選定講演：トピックス要旨集_74-75

5. 梅澤覚, 徳良雄貴, 木野邦器, “ラッカーゼを用いた有機香気成分 rotundone の合成と単離精製”Laccase-catalysed synthesis of an ordor-active compound, rotundone, and purification, 第 23 回生体触媒化学シンポジウム, 講演番号 P26, 講演要旨集_p.70, 2023.09.28,鹿児島大学
6. Harumi Aono, Yushi Futamura, Hiroyuki Uno, Kuniki Kino, and Hiroyuki Osada, “AI-based screening system for antifungal substances by monitoring morphological changes of *Aspergillus oryzae*”, 5th KRIBB-RIKEN Chemical Biology Joint Symposium, P14, p.39, Ochang, Korea, 17th, Oct., 2023
7. 藤巻静香, 木野邦器, 廣瀬修一, 白坂直輝, 牛尾慎平, 古屋俊樹, “指向性進化法による新規バニリン合成酵素の開発” , 2E5p11, p.662, 日本農芸化学会 2024 年度大会, 2024. 3.25, 東京農業大学（東京）
8. 矢野敏史, 内田頌太郎, 唐鎌翔大, 鈴木伸, 木野邦器, 原太一, “オートファジーを制御するジケトピペラジンのスクリーニングと栄養シグナルに及ぼす影響の検討”2B3p07, p.131, 日本農芸化学会 2024 年度大会, 2024. 3.25, 東京農業大学（東京）
9. 青野晴美, 二村友史, 堀康宏, 室井誠, 平野弘之, 本田香織, 西浦正芳, 侯召民, 木野邦器, 長田裕之, “抗カンジダ物質 TPPB の構造活性相関とタンパク質-化合物間相互作用解析”, 2C4p02, p.270, 日本農芸化学会 2024 年度大会, 2024. 3.25, 東京農業大学（東京）

５． 研究活動の課題と展望

2023 年度は“スマートバイオプロセス”の第二期初年度であった。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を推進することによって、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、また、生物活性評価など学外研究機関との連携によって研究を推進していく予定である。昨年度の研究成果で、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。それは、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。具体的には、化学酵素的アミド結合形成反応を利用してヘテロ体を含むジペプチド同士を連結してテトラペプチドを簡単に合成するプロセスの発見につながった。

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及びその類縁体の合成法の検討と機能評価」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。