

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 ジケトピペラジンの機能性評価

2,5-ジケトピペラジン(DKP)は2分子のアミノ酸が互いのアミノ基とカルボキシ基により脱水縮合した環状化合物であり、構成するアミノ酸の種類や立体異性により様々な機能性を示すことが報告されている。本研究ではこれまでに、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ることで、立体化学を制御した多種多様なDKPの合成を可能とするワンポット合成法(図1)を開発している。今年度は、本手法により合成したDKPの機能性評価として、不斉有機触媒活性およびオートファジー調節活性について検討した。

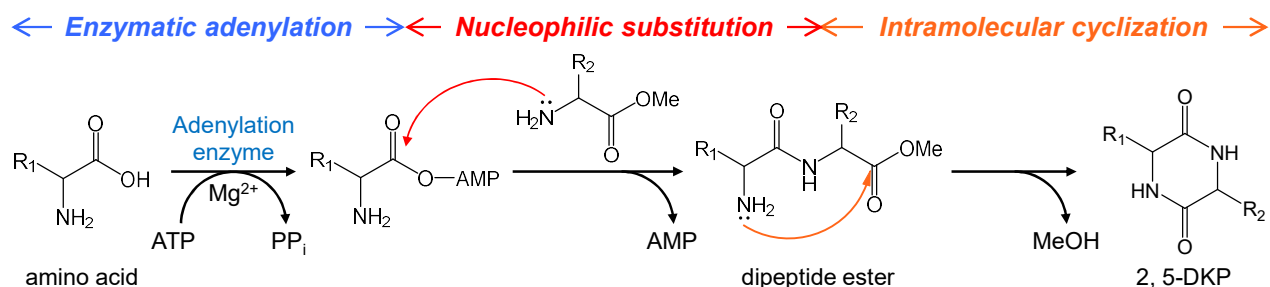


図1. アデニル化酵素を利用したDKPのワンポット合成法

(1) 不斉有機触媒活性

アセトンと4-ニトロベンズアルデヒドとの不斉アルドール反応(図2)をモデル反応とし、DKPの有機触媒活性を評価した。Tyrocidine synthetase 由来のアデニル化酵素 TycA-A が基質とする14種類のL-, D-アミノ酸(Trp, Phe, Tyr, Met, Val, Leu, Ile)と5種類のアミノ酸エステル(L-Pro-OMe, D-Pro-OMe, L-Ser-OMe, D-Ser-OMe, Gly-OMe)の組み合わせから成る計70種類のDKPを評価対象とした。



図 2. 不斉アルドール反応(モデル反応)

評価の結果、L-Trp または D-Trp と L-Pro-OMe または D-Pro-OMe の組み合わせからなる 4 種類の cyclo(Trp-Pro) に触媒活性を見出すことができた。さらに、構成アミノ酸に関して、Trp が L-体の場合に活性(変換率)が高い傾向にあり、Pro のキラリティによってエナンチオ選択性が反転することが判明した。Pro の不斉アルドール反応触媒活性は既知であり、その触媒機構においてはカルボキシ基によるケトンの活性化と 2 級アミノ基によるエナミン中間体形成を経て反応が進行するが、cyclo(Trp-Pro)においては縮合・環化によりこれらの官能基を失っているため、プロリンとは異なる触媒機構により反応が進行しているものと推察される。

(2) オートファジー調節活性

オートファジー調節活性の評価は早稲田大学人間科学部健康福祉科学科の原太一教授、矢野敏史助教に実施していただいた。GFP-LC3-RFP プローブを導入したヒト結腸癌由来細胞(Caco-2)をサンプル溶液で処理した後、GFP/RFP 強度比を測定することによりオートファジー活性の変化を捉える手法である。TycA-A が基質とする 14 種類の L-, D-アミノ酸(Trp, Phe, Tyr, Met, Val, Leu, Ile) と 2 種類のアミノ酸エステル(L-Pro-OMe, D-Pro-OMe)の組み合わせからなる計 28 種類の DKP を評価した。

その結果、cyclo(D-Phe-D-Pro), cyclo(D-Met-L-Pro), cyclo(D-Trp-L-Pro), cyclo(D-Trp-D-Pro) の 4 種が有意なオートファジー活性向上を、cyclo(L-Tyr-D-Pro), cyclo(D-Ile-D-Pro), cyclo(L-Trp-L-Pro) の 3 種がオートファジー活性抑制を示すことを見出した。Cyclo(Trp-Pro)のように同じアミノ酸組成であっても全く逆の活性を発現する例もあり、キラリティが生理活性に大きな影響を与えることが示された。

さらにオートファジー活性向上が確認された 4 種類の DKP に関して、その作用機序の解析を試みた。一般にオートファジー活性は栄養飢餓シグナルによって引き起こされることが知られているため、これら DKP の栄養飢餓シグナルへの影響を測定したところ、既知化合物(Torin1)のような効果はみられず、異なる活性化機構の存在が示唆された。

3. 共同研究者

木野 邦器 （先進理工学部・応用化学科・教授）
原 太一 （人間科学部・健康福祉科学科・教授）
矢野 敏史 （人間科学部・健康福祉科学科・助教）

4. 研究業績

4.1 学術論文

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

4.5 学会および社会的活動

- 1) 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, 1Ap02, 名古屋大学(愛知)
- 2) 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, 1Ap03, 名古屋大学(愛知)
- 3) 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”, 日本農芸化学会 2024 年度大会, 2B3p07, 東京農業大学(東京)

5. 研究活動の課題と展望

本研究で開発したアデニル化酵素を利用したワンポット合成法により合成可能となった種々のアミノ酸組成・立体異性の DKP について機能性評価を実施し、有機触媒活性やオートファジー調節活性を有する DKP を複数見出すことができた。特に DKP のオートファジーに関する報告は現在ほとんどなく、機能性成分としての活用や作用機序の解明へ展開可能な有用な知見であると考えられる。DKP のみならず本研究課題で合成法を開発したペプチド類似体やジケトモルフォリン(DKM)などにおいても、多様な機能性を発現することが期待されるため、引き続き生理活性評価や機能性評価を実施していきたい。