

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-ジケトモルフォリンの合成法の改良

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り、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ている。2分子のアミノ酸が縮合・環化した環状ジペプチドである2,5-ジケトピペラジン(DKP)とともに医薬・創薬分野で注目されている化合物群である。

本研究ではこれまでに、アミノ酸とアミノ酸エステルを原料としたDKPのワンポット合成法を確立している。さらに、DKPとDKMの構造類似性に着目し、本手法を応用することでヒドロキシ酸とアミノ酸エステルを原料としたDKMのワンポット合成にも成功している(図1)。しかしながら、DKPと比較してDKMの合成量は極めて少なかった。これは、DKPの合成中間体であるジペプチドエステルの末端アミノ基に比べて、DKMの合成中間体であるヒドロキシアミドエステルの末端ヒドロキシ基の求核活性が低いため、自発的環化反応が律速となっているものと推測した。

そこで、今年度はDKMの合成量向上を目指し、合成プロセスの改良を行った。具体的には、まずアデニル化酵素を用いてヒドロキシ酸とアミノ酸を原料としてヒドロキシアミドを合成し(1stステップ)、続いて反応促進を狙って酸触媒を添加した条件で環化反応を行う(2ndステップ)、2ステップ合成法(図2)を考案し、検討を行った。

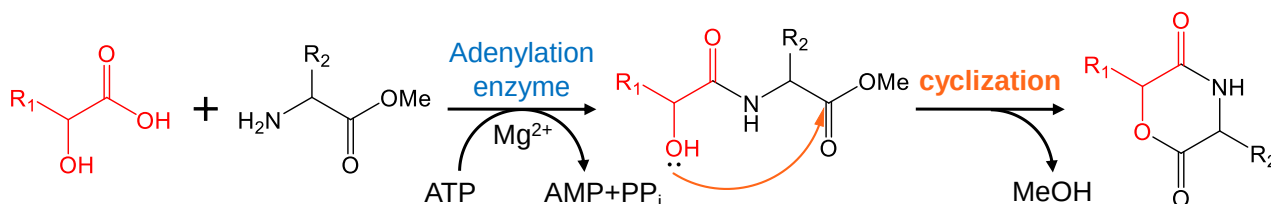
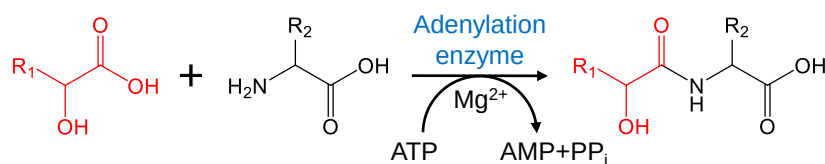


図1. アデニル化酵素を利用したDKMのワンポット合成法

1st step: Hydroxyamide synthesis by adenylation enzyme



2nd step: Acid catalyzed intramolecular cyclization

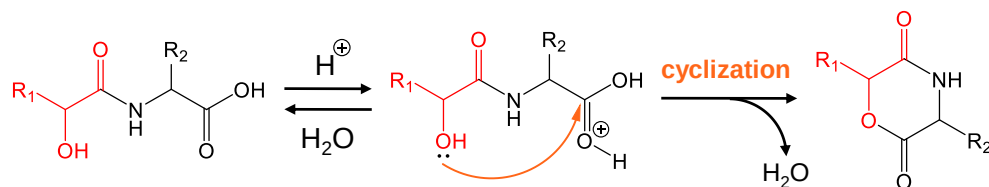


図 2. アデニル化酵素を利用した DKM の 2 ステップ合成法

基質認識が寛容で複数の芳香族ヒドロキシ酸に対してアデニル化活性を示す *Brevibacillus parabrevis* IAM1031 由来 TycA-A を用いて、L-フェニル乳酸(L-PLA)と L-プロリン(L-Pro)を原料とした cyclo(L-PLA-L-Pro)の合成を試みた。

1st ステップでは TycA-A 添加条件においてヒドロキシアミドである L-PLA-L-Pro の生成を確認できた。さらに、この反応液に対して酸触媒として希硫酸を添加して 2nd ステップの環化反応を行ったところ、HPLC 分析において cyclo(L-PLA-L-Pro)のピークを検出できた(図 3)。酸触媒の添加により環化反応が促進されることで、ワンポット合成法のように原料をエステル体にすることなく DKM の合成が可能となった。

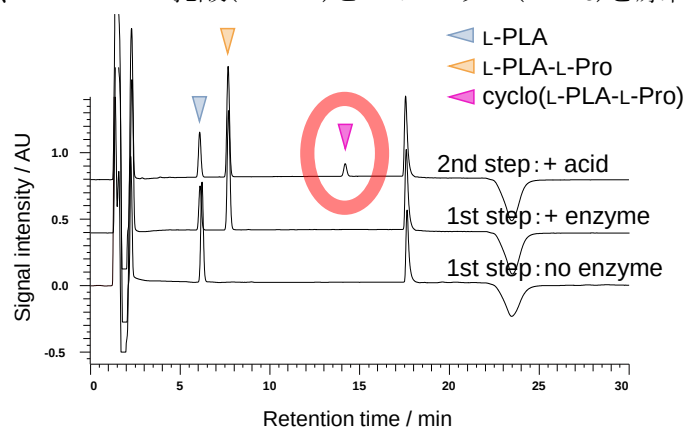


図 3. 酸触媒添加による cyclo(L-PLA-L-Pro)合成

DKM 合成における環化反応はエステル結合形成反応であり、反応系内の水によって逆反応が進行する。これを防止するために 1st ステップ終了後の反応液から水を除去し、有機溶媒へと置換して 2nd ステップの環化反応を行った。8 種類の有機溶媒へ置換した場合と溶媒置換を行わずに水のまま反応させた場合の cyclo(L-PLA-L-Pro)合成量を比較した。

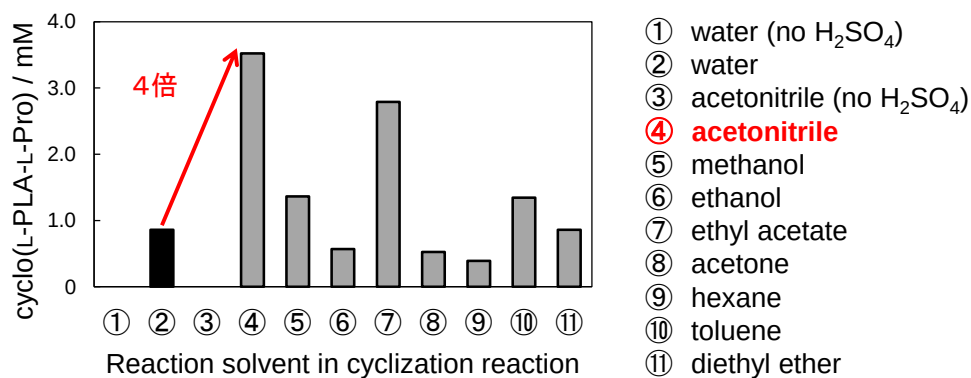


図 4. 環化反応における溶媒の効果

その結果、④アセトニトリル、⑤メタノール、⑦酢酸エチル、⑩トルエンに置換した場合に合成

量が増加した(図 4)。特に④アセトニトリルへの置換が最も効果的であり、cyclo(L-PLA-L-Pro)の合成量は水の場合の約 4 倍となった。なお、希硫酸を添加しない条件においては、①水のまま、③アセトニトリルへ置換した場合を含めていずれの有機溶媒に置換した場合でも DKM は合成されなかったため、酸触媒が環化促進において非常に重要であることが改めて明らかとなった。

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

4.2 総説・著書

4.3 招待講演

4.4 受賞・表彰

1) 第 76 回日本生物工学会大会 トピックス選定

選定講演「NRPS 由来アデニル化ドメインを用いたジケトモルフォリンの効率的合成法の開発」

4.5 学会および社会的活動

1) 稲垣 南, 市位 友理奈, 鈴木 伸, 木野 邦器, “L-ヒスチジンを位置特異的にメチル化する酵素の開発”, 日本農芸化学会 2025 年度大会, 5C004, 札幌コンベンションセンター(北海道)

2) 桐木 理沙, 永田 理彩子, 鈴木 伸, 木野 邦器, “NRPS 由来アデニル化ドメインを利用したジペプチドの連結によるテトラペプチドの合成”, 第 76 回日本生物工学会大会, 3Fp07, 東京工業大学(東京)

3) 星 くるみ, 唐鎌 翔大, 鈴木 伸, 木野 邦器, “NRPS 由来アデニル化ドメインを用いたジケトモルフォリンの効率的合成法の開発”, 第 76 回日本生物工学会大会, 3Fp08, 東京工業大学(東京)

4) 鈴木 伸, 柳川 洋晟, 佐怒賀 悠, 仁科 龍一, 木野 邦器, “カルノシン-N-メチルトランスフェラーゼを利用したアンセリン合成法の開発”, 第 76 回日本生物工学会大会, 3Fp09, 東京工業大学(東京)

5. 研究活動の課題と展望

アデニル化酵素を利用したヒドロキシアミド合成と酸触媒を用いた環化反応を組み合わせた DKM の 2 ステップ合成法を構築した。これまでに開発していたワンポット合成法では HPLC 分析では検出できず、より高感度な MS 分析にて検出可能な程度の合成量であったが、2 ステップ合成法を利用することで HPLC 分析でも十分に検出可能なレベルとなり、DKM 合成量を飛躍的に増加させることに成功した。DKP と比較して天然における存在量が少なく、合成における環状化難易度も高いことから入手性の低い DKM の効率的な合成を可能としたことは、創薬分野をはじめとした有用生理活性物質の開発研究に大きく貢献するものと考えられる。本研究においても合成した DKM の単離・精製技術の開発と、生理活性評価や機能性評価を実施していきたい。また、DKM 合成の中間体であるヒドロキシアミドは生体における分解抵抗性を示すことを見出しているため、アデニル化酵素を発現させた微生物を生体触媒とした菌体反応プロセスも検討し、酵素精製工程を省いた簡便で工業的にも導入しやすい生産法の開発を目指したい。