

博士論文概要

論文題目

アデニル化酵素を利用した
アミド化合物生産法の開発

Development of Production Method for
Various Amide Compounds Utilizing
Adenylation Enzymes

申請者

鈴木	伸
Shin	SUZUKI

応用化学専攻 応用生物化学研究

2018年11月

アミド化合物は構造中にアミド結合(-CO-NH-)を有する化合物であり、化成品や医薬品、機能性食品として利用される産業上有用な物質である。現在、主に有機合成法により合成されているが、当量の縮合剤を必要とし、目的物によっては副反応を抑制するために官能基の保護と脱保護の操作が必要となる。この煩雑なプロセスに代わる手法として、近年触媒的なアミド合成法のひとつとして酵素法が高い注目を集めている。温和な反応条件と廃棄物が少ないことが利点であるが、高度な基質特異性により合成可能な化合物が限定される課題がある。

自然界においてカルボキシ基の変換反応を触媒するアデニル化酵素がある。当該酵素は、アデノシン三リン酸(ATP)のエネルギーを用いて基質のカルボキシ基をアデニル化することで活性化する。その後、各酵素の特性に従ってエステル結合やチオエステル結合、あるいはアミド結合を形成する。この2段階の反応のうち、最初の反応で基質のカルボキシ基がアデニル化されれば、アミンを求核剤として共存させることで化学的に求核置換反応が進行し、アミド結合を形成すると考えた。低分子求核剤は酵素の基質特異性の影響を受けにくい反応となり、既存の酵素法の課題を克服できる新たな合成プロセスを開発できると推察した。

本反応プロセスの開発にあたっては、アミド結合を有するペプチド性抗生物質の生合成に関与する非リボソーム型ペプチド合成酵素(NRPS)の構成単位で基質のアデニル化反応を触媒するドメイン(Aドメイン)を用いて、その反応の可否と有効性を検証した(第2章)。続いて、化合物の多様化を目的として、カルボン酸に対する基質特異性の異なる多様なアデニル化酵素を利用するアミド化合物合成について検討を行った(第3章)。さらに、アデニル化のエネルギー源として重要なATPの効率的な供給を可能とするため、反応により生成するアデノシン一リン酸(AMP)からのATP再生系を構築した(第4章)。アデニル化酵素を利用したアミド結合形成反応は、酵素反応と化学反応を組み合わせた極めて革新的かつ実用性の高いものであり、その学術的知見と工業利用に向けた検討について記述した。

本論文は全5章で構成されている。

第1章では、アミド化合物の有用性および既存の合成法について概説した。さらに、アデニル化酵素を利用したアミド結合形成反応の利点および課題について述べ、本研究の戦略と意義を明確にした。

第2章では、アデニル化酵素の一種であるNRPSのAドメインを利用するL-アミノ酸アミド合成を検討した。*Brevibacillus parabrevis* IAM 1031由来 tyrocidine synthetase AのAドメイン(TycA-A)を用いて、その基質であるL-Trpに対し、直鎖状アミンや環状アミン、 β -および γ -アミノ酸、プロリン誘導体など種々のアミノ基を有する化合物を求核剤として反応を行った。その結果、試験を行ったほぼすべてのアミンに対応するL-Trp-N-アルキルアミドの生成を確認した。以上より、NRPS由来のAドメインの触媒作用によって基質アミノ酸がアデニル化された後

にアミンを作用させると、酵素の基質特異性による影響もなく化学的な求核置換攻撃を受けてアミド結合を形成する新規な反応が起こることを明らかにした。

第3章では、前章での結果をさらに展開し、合成可能なアミド化合物を拡張すべく、異なる種類のカルボン酸を基質とするアデニル化酵素を探索し、アミド合成試験を行った。

第3章1節では、L-体のみから構成されるジペプチドとは異なる機能性や高い生理活性が期待されるD-アミノ酸含有ジペプチドを合成ターゲットとした。アデニル化酵素によるアミド合成の反応機構から、C末端側アミノ酸にはキラリティ等による制約を受けることなくD-アミノ酸(D-Xaa)を導入可能であり、また、N末端側アミノ酸についてはアデニル化酵素の基質となればD-アミノ酸も導入可能であると考えた。一般的にNRPSのAドメインはL-アミノ酸を基質とするが、TycA-Aは6種類のD-アミノ酸も基質とすることを見出し、D-アミノ酸含有ジペプチドの合成を可能とした。TycA-Aの基質となることが明らかになったD-Trpに対しては、D-Xaaと反応させることでD-Trp-D-Xaaの合成に成功した。さらに、他のD-アミノ酸を基質とするAドメインの探索により、*Bacillus licheniformis* NBRC 12199由来BacB2-AがD-Lysを基質とすることを見出し、D-Lys-D-Xaaの合成にも成功した。

第3章2節では、アミノ酸側鎖のアミド化の観点から β -アスパルチルアミドをターゲットとした。最も単純な β -アスパルチルアミドであるL-Asnは生体内においてアスパラギン合成酵素によりL-Aspとアンモニアから合成される。本反応においてアンモニアの代わりにアミンを反応させることで β -アスパルチルアミドが合成できると予測し、*Escherichia coli* BL21(DE3)由来のアスパラギン合成酵素AsnAを用いて検証した。本来の基質であるアンモニアに加えて、ヒドロキシルアミンや直鎖状アミン、さらにはL-Trpなどのアミノ酸を求核剤として反応させたところ、予想通り対応する β -アスパルチルアミドの生成を確認した。

第3章3節では、アミノ酸以外の基質カルボン酸として脂肪酸に着目し、界面活性剤などへの利用が期待される脂肪酸アミドを合成ターゲットとした。脂肪酸をアデニル化する酵素として、*Mycobacterium*属細菌の複合脂質の生合成の起点として作用するfatty acyl-AMP ligase (FAAL)に着目し、具体的には*Mycobacterium smegmatis* mc² 155由来のFAALであるFadD26を用いて検証を行った。まず、簡易的な比色分析法を用いてFadD26の基質特異性を調べたところ、炭素数6-12の中鎖脂肪酸やオレイン酸、リノレン酸などの長鎖脂肪酸を基質とすることを見出した。さらに、炭素数6-10の脂肪酸を基質、直鎖状アミン、環状アミン、L-Pro, L-Glu, L-Lysなどのアミノ酸を求核剤として反応させたところ、いずれの組み合わせにおいても対応する脂肪酸アミドの生成を確認した。

第3章4節では、芳香族カルボン酸アミドを合成ターゲットとした。NRPSのA

ドメインの一部には芳香族カルボン酸を基質とするものが知られている。その一つである *Bacillus subtilis* str. 168 由来 bacillibactin synthetase の A ドメイン (DhbE) に着目して検証を行った。まず、安息香酸およびヒドロキシ基やアミノ基など 7 種類の置換基において異なる位置 (*o*-, *m*-, *p*-位) が置換された 21 種類の安息香酸一置換体の計 22 種類の化合物に対して DhbE の基質特異性検討を行った。その結果、16 種類の芳香族カルボン酸が基質となることを見出した。さらに、これら 16 種類の基質とヒドロキシルアミンおよび L-Pro を反応させたところ、それぞれ 16 種類および 12 種類の基質に対して芳香族カルボン酸アミドの生成を確認した。

第 4 章では、アデニル化酵素の反応に必要な ATP が高価であることから、その効率的な供給を目的として、アミド結合形成反応により生成する AMP からの ATP 再生系の構築を検討した。

第 4 章 1 節では、ポリリン酸をリン酸基供与体として AMP からアデノシン二リン酸を経由して ATP までを単一酵素だけで合成可能なポリリン酸キナーゼ (class III PPK2) に着目して ATP 再生系の構築を試みた。TycA-A を用いた L-Trp-L-Pro 合成に対して、*Deinococcus proteolyticus* NBRC 101906^T 由来の class III PPK2 である Deipr_1912 を最適酵素として選択して ATP 再生系に適用したところ、ATP は勿論、AMP を初発基質とした場合にも L-Trp-L-Pro の合成を確認することができた。しかし、反応は遅く、合成量も少なかった。その原因はアデニル化反応の可逆性に起因するもので、具体的には反応の進行に伴って生成・蓄積するピロリン酸 (PPi) によりアデニル化反応が阻害されていると考えた。そこで、PPi をリン酸に分解するピロフォスファターゼを反応系へ添加したところ、反応開始後 12 時間までの L-Trp-L-Pro 合成速度が無添加反応対比で 14 倍に上昇することを見出し、さらに反応条件の最適化により 72 時間で 6.2 mM (対 L-Trp 収率 62%) の合成に成功した。

第 4 章 2 節では、ポリリン酸キナーゼを用いた手法とは異なる ATP 再生系を検討した。ピルビン酸リン酸ジキナーゼ (PPDK) を用いると、AMP および PPi にホスホエノールピルビン酸を加えることで ATP 合成が可能となる。このシステムの有効性を TycA-A による L-Trp-L-Pro 合成で検証した。*Acetobacter aceti* NBRC 14818^T 由来の PPDK である AaPPDK を選択し、ATP 再生系として適用したところ、AMP を初発基質とした場合にも L-Trp-L-Pro の合成が確認できた。また、PPi を基質とする PPDK の反応系では、PPi の蓄積が抑制され反応速度の向上が認められた。

第 5 章では、本研究を総括した。本研究ではアデニル化酵素を利用した触媒的アミド化合物合成メカニズムを明らかにし、多様な分子種を創出できることを実証した。実用的プロセスの開発に向け、アデニル化酵素の特性を踏まえた AMP からの ATP 再生系の構築にも成功した。また、本バイオプロセスの有用性と今後の展望について述べた。

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

氏名 鈴木 伸 印

(2019年 7月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
○論文	<u>Shin Suzuki</u> , Ryotaro Hara, and Kuniki Kino “Production of aminoacyl prolines using the adenylation domain of nonribosomal peptide synthetase with class polyphosphate kinase 2-mediated ATP regeneration” <i>Journal of Bioscience and Bioengineering</i> , 125 , 644-648 (2018).
論文	Ryotaro Hara, Kengo Hirai, <u>Shin Suzuki</u> , and Kuniki Kino “A chemoenzymatic process for amide bond formation by an adenylating enzyme-mediated mechanism” <i>Scientific Reports</i> , 8 :2950 (2018).
論文	<u>Shin Suzuki</u> and Kuniki Kino “Aminoacyl proline synthesis coupled with ATP regeneration using pyruvate phosphate dikinase” <i>Journal of Biochemistry and Biotechnology</i> , 2 , 70-74 (2019)
○論文	Soichiro Kano, <u>Shin Suzuki</u> , Ryotaro Hara, and Kuniki Kino “Synthesis of D-amino acid-containing dipeptides by adenylation domains of nonribosomal peptide synthetase” <i>Applied and Environmental Microbiology</i> , 85 :e00120-19 (2019)
講演	賀野壮一郎, <u>鈴木伸</u> , 原良太郎, 木野邦器 “D-アミノ酸含有ジペプチドの汎用的な酵素合成法の開発” 第70回日本生物工学会大会, 3Ma03, 関西大学(大阪), 2018年9月
講演	佐々木楓, <u>鈴木伸</u> , 木野邦器 “アデニル化酵素を利用した芳香族カルボン酸アミドの合成” 日本農芸化学会 2018年度大会, 2A10a01, 名城大学(愛知), 2018年3月
講演	<u>鈴木伸</u> , 宇留野樹生, 木野邦器 “アスパラギン合成酵素を利用したβ-アスパルチルアミド合成” 日本農芸化学会2018年度大会, 2A10a02, 名城大学(愛知), 2018年3月
講演	賀野壮一郎, <u>鈴木伸</u> , 鈴木亮平, 原良太郎, 木野邦器 “非リボソーム型ペプチド合成酵素のアデニル化ドメインを利用した D-アミノ酸含有ジペプチド合成”, 第69回日本生物工学会大会, 2P-G038, 早稲田大学(東京), 2017年9月
講演	<u>鈴木伸</u> , 木野邦器 “非リボソーム型ペプチド合成酵素のアデニル化ドメインの利用に向けたpyruvate phosphate dikinaseによるAMPからのATP再生系の構築” 第69回日本生物工学会大会, 2P-G039, 早稲田大学(東京), 2017年9月

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演	<u>Shin Suzuki</u> , Ryotaro Hara, and Kuniki Kino “Aminoacyl Proline Production Coupled with ATP Regeneration System from AMP” BioTrans2017 (13 th International Symposium in Biocatalysis and Biotransformations), P-124, Budapest, Hungary (July 2017)
講演	鈴木伸, 平井健吾, 原良太郎, 木野邦器 “脂肪酸アシル-AMP 合成酵素を利用した脂肪酸アミド合成” 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2C26p10, 京都女子大学(京都), 2017 年 3 月
講演	鈴木伸, 原良太郎, 木野邦器 “新規ポリリン酸キナーゼによる AMP からの ATP 再生を利用したアミノアシルプロリン 生産” 第 6 回 CSJ 化学フェスタ, P5-097, タワーホール船堀(東京), 2016 年 11 月
講演	平井健吾, 鈴木伸, 原良太郎, 木野邦器 “酵素反応と化学反応の融合による新規アミノ酸アミド合成法の開発” 第 76 回酵素工学研究会, B-14, 東大山上会館(東京), 2016 年 10 月
講演	鈴木伸, 原良太郎, 木野邦器 “アミノアシルプロリン合成におけるピロフォスファターゼの効果と菌体反応系での生 産” 第 68 回日本生物工学会大会, 2P-1p005, 富山国際会議場(富山), 2016 年 9 月
講演	鈴木伸 “ATP 再生系を共役させた有用物質の効率的生産” 第 4 回日本生物工学会東日本支部コロキウム, 東京工業大学(東京), 2016 年 3 月
講演	鈴木伸, 原良太郎, 木野邦器 “単一酵素による AMP からの ATP 再生系の構築とアミノアシルプロリン合成への利用” 第 67 回日本生物工学会大会, 1P-059, 城山観光ホテル(鹿児島), 2015 年 10 月
講演	鈴木伸, 原良太郎, 木野邦器 ”PepQ および PutA 欠損大腸菌の休止菌体を利用したアミノアシルプロリン生産” 第 74 回酵素工学研究会, B-7, 東大山上会館(東京), 2015 年 10 月