

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

2019年7月

鈴木 伸

Shin SUZUKI

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

2019年7月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

応用化学専攻 応用生物化学研究

鈴木 伸

Shin SUZUKI

## 目次

第 1 章 総論	1
1.1 アミド化合物	1
1.2 アミド化合物合成法	1
1.2.1 有機合成法	1
1.2.2 酵素合成法	3
1.3 アデニル化酵素を利用したアミド結合形成反応	4
1.4 結言	5
第 2 章 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 L-アミノ酸アミド合成	6
2.1 非リボソーム型ペプチド合成酵素	6
2.2 アデニル化ドメイン単独での利用	7
2.3 L-アミノ酸アミド合成試験	8
2.4 結言	12

第 3 章 合成可能なアミド化合物の拡張	13
3.1 D-アミノ酸含有ジペプチド合成	14
3.1.1 TycA-A の D-アミノ酸に対する基質特異性評価	15
3.1.2 TycA-A によるジペプチド合成	17
3.1.3 D-アミノ酸を基質とする新規アデニル化ドメインの探索	23
3.1.4 候補アデニル化ドメインの基質特異性評価	24
3.1.5 BacB2-A によるジペプチド合成	26
3.2 $\beta$ -アスパルチルアミド合成	29
3.2.1 アスパラギン合成酵素の利用	30
3.2.2 $\beta$ -アスパルチルアミド合成試験	31
3.3 脂肪酸アミド合成	35
3.3.1 脂肪酸をアデニル化可能な酵素の探索	35
3.3.2 脂肪酸に対する基質特異性評価	37
3.3.3 脂肪酸アミド合成試験	39
3.4 芳香族カルボン酸アミド合成	42
3.4.1 芳香族カルボン酸をアデニル化可能な酵素の探索	42
3.4.2 安息香酸一置換体に対する基質特異性評価	43
3.4.3 芳香族カルボン酸アミド合成試験	45
3.5 結言	50

第 4 章 AMP からの ATP 再生系の構築	51
4.1 Class III PPK2 を利用した ATP 再生系	52
4.1.1 利用酵素の選定	52
4.1.2 ポリリン酸の活性への影響	53
4.1.3 アミノアシルプロリン合成への適用	55
4.1.4 ピロフォスファターゼ添加効果	58
4.2 PPK2 を利用した ATP 再生系	59
4.2.1 利用酵素の選定	59
4.2.2 活性評価	60
4.2.3 アミノアシルプロリン合成への適用	62
4.2.4 酵素濃度の最適化	65
4.3 結言	68
 第 5 章 総括	 69
 参考文献	 72
 謝辞	 77

## 第 1 章 総論

### 1.1 アミド化合物

アミド化合物は構造中にアミド結合(-CO-NH-)を有し、含窒素有機化合物として広く分布している。自然界においては、ペプチドやタンパク質として存在し、生体の構成成分や生体機能を支える機能性分子としてはたらいっている。また、ナイロンやポリアミドといった人工の高分子化合物としても存在している。これらアミド化合物は様々な機能性を示すことから、医薬品や生理活性ペプチド、機能性食品添加剤、香料といった医薬・化粧品分野や、界面活性剤、機能性ポリマーといった化成品分野など様々な用途に用いられる<sup>1)</sup>。したがって、産業上有用な化合物であり、その合成法開発には大きな意義がある。

### 1.2 アミド化合物合成法

アミド化合物の合成法は有機合成化学の技術を中心に利用した有機合成法と、酵素の特性を利用した酵素法の二つに大別される。以下に各合成法における既存の手法について概説する。

#### 1.2.1 有機合成法

アミド結合はカルボキシ基とアミノ基の縮合により形成されるが、単に両者を混合するのみでは酸塩基反応により塩が生じるのみで、熱力学的に不利な縮合反応は進行しない。160~180°C の高温で加熱することにより縮合が可能である<sup>2)</sup>が、エネルギー的に高コストであり、熱安定性の低い化合物の合成には適用できない。

そこで有機合成法によるアミド結合形成反応では、反応性の低いカルボキシ基をより反応性の高い分子種に活性化し、アミノ基と縮合させる手法がよく利用される。例えば、カルボン酸と塩化チオニルや塩化オキサリル等の塩素化剤により生成する酸塩化物は反応性が高く、酸塩化物とアミンを塩基性条件下で反応させる(Schotten-Baumann reaction)<sup>3)</sup>ことでアミド結合が形成可能である。本手法は高

収率であるが、塩素化剤や副生成物の毒性、副反応の進行などの課題がある。また、縮合剤<sup>4)</sup>を用いてカルボン酸を活性エステルへと変換し、アミンと縮合する手法もよく利用されている。近年でもペプチド合成に用いられる固相合成法(solid-phase peptide synthesis; SPPS)<sup>5)</sup>はその代表例である。本手法は高収率である利点の一方で、目的物と当量の縮合剤が必要であり、その結果当量の副生成物が生じる。さらに希望のペプチドを得るためには副反応を抑制するために官能基の保護・脱保護の過程が追加で必要となる。いずれの反応系もカルボン酸の活性化が量論的反応である点が課題の一つであり、触媒的手法が求められる。

有機合成法においても触媒的アミド合成法が報告されている<sup>6)</sup>。ボロン酸触媒<sup>7)</sup>は毒性が低く様々なカルボン酸とアミンに対して縮合反応を触媒的に進行させるが、反応温度が85°C以上と高く、副反応が生じる点が課題となる。チタンや亜鉛、ジルコニウムなどを中心金属とした金属錯体を触媒とするカルボン酸とアミンの縮合法も報告されているが<sup>6)</sup>、反応の効率化のためには高温条件が必要である。また、異なる金属種を利用することで、ルテニウム触媒を用いたアルコールのアミド化、銅触媒によるアルデヒドのアミド化、マンガニウム触媒によるアルキンのアミド化など、カルボン酸以外のアシル供与体を原料とした酸化的アミド合成手法も報告されている<sup>1)</sup>。

以上のように有機合成法によるアミド合成では、幅広いアミド化合物を高収率で合成できるものの、量論的反応であることや、反応条件、副生成物の観点から環境調和性が低い点が課題である。

### 1.2.2 酵素合成法

様々な課題を抱える有機合成法に代わる手法として、近年触媒的  
反応である酵素反応を利用した手法が高い注目を集めている。多様  
な種類の酵素を利用した手法が研究・開発されている。

ペプチダーゼやプロテアーゼといった加水分解酵素の逆反応を利用  
した手法<sup>8,9)</sup>では、カルボキシ基およびアミノ基の一方を保護した  
アミノ酸同士を縮合可能である。ペプチド中のアミノ酸の順序を規  
定するためには保護基の導入が必要である点が課題である。ハイド  
ロラーゼを用いたアミノリシス反応<sup>10,11)</sup>ではアミノ酸エステルと無  
保護のアミノ酸からジペプチドが合成可能である。C末端側となる  
アミノ酸については保護が不要であるがN末端側となるアミノ酸の  
カルボキシ基は活性化されている必要がある点が課題である。基質  
アミノ酸の修飾が不要な方法としてL-アミノ酸リガーゼやD-アラニ  
ン-D-アラニンリガーゼなどのATP依存型リガーゼ<sup>12-14)</sup>があげられ、  
遊離のアミノ酸からジペプチドが合成可能である。

いずれの手法も触媒的反応、温和な反応条件、廃棄物が比較的少  
ない点が利点であるが、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。



### 1.3 アデニル化酵素を利用したアミド結合形成反応

自然界においてはカルボキシ基の変換反応を触媒するアデニル化酵素と呼ばれる酵素群が知られている。これらは 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。活性化されたカルボン酸は、その後各酵素の反応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 (Fig. 1.1)。これら 2 段階の反応のうち、1 段階目の反応において基質のカルボキシ基がアデニル化によって活性化されれば、求核性の高いアミンを共存させることで化学的な求核置換反応が進行し、アミド結合を形成する (Fig. 1.2) と考えた。低分子の求核剤は酵素の基質特異性の影響を受けにくく、多様なアミンを求核剤として用いることで幅広いアミド化合物が合成可能になると推察した。本プロセスは既存のアミド合成法の課題を克服する触媒的かつ広範なアミド化合物の合成に適用可能な環境調和性の高い新規プロセスとなると考えた。

一方、本プロセスの課題が 2 点挙げられる。1 点目は、カルボン酸側の基質は酵素の基質特異性の影響を強く受ける点である。アミン側の基質と比較してその自由度は低くなるものと考えられる。2 点目はアデニル化反応に必要な ATP が高価な化合物であるため多量の外部添加はプロセスの高コスト化につながる点である。

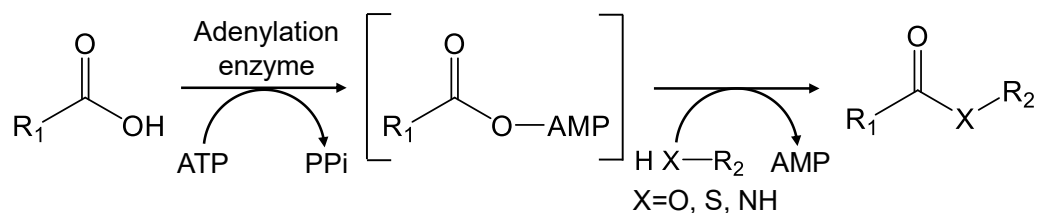


Fig. 1.1. Reaction mechanism of adenylation enzyme.

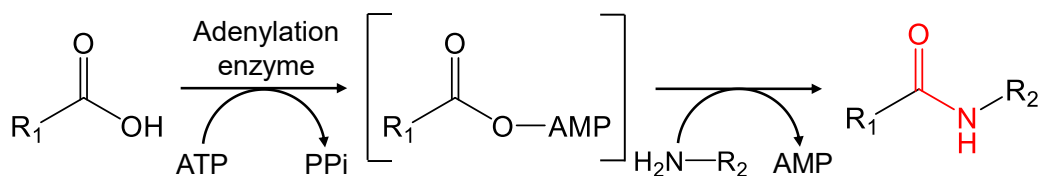


Fig. 1.2. Amide synthesis catalyzed by adenylation enzyme.

## 1.4 結言

アミド化合物は医薬品や化成品など、産業上重要な有用化合物が多く、その効率的な合成法の開発には大きな意義がある。既存の合成法では、縮合剤が不要な触媒反応であること、反応条件や副生成物の観点から環境調和性が高いこと、多様なアミド化合物が合成可能であること、の3点を同時に満たすことのできる手法は報告されていなかった。

そこで、自然界におけるアデニル化酵素によるカルボキシ基の変換反応に着目し、アデニル化酵素によるカルボキシ基のアデニル化による活性化と、つづくアミンによる求核置換反応によりアミド結合を形成する新規プロセスを考えた。本プロセスではアミンは酵素の基質特異性の影響を受けにくく、多様なアミンを求核剤として用いることが可能であると推測しており、酵素反応でありながら多様なアミド化合物が合成可能であるものと考えられる。しかし、本プロセスの課題として、カルボン酸側の基質特異性とアデニル化反応に必要な ATP の供給が挙げられる。

本研究では、アデニル化酵素を利用したアミド化合物生産プロセスの実用性を実証する(第2章)とともに、本プロセスの課題解決に向けて、様々な種類のアデニル化酵素を利用したカルボン酸側基質の拡張(第3章)と効率的な ATP 供給法の開発(第4章)を検討した。

## 第 2 章 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 L-アミノ酸アミド合成

### 2.1 非リボソーム型ペプチド合成酵素

非リボソーム型ペプチド合成酵素(NRPS)は細菌やカビなどの微生物が産生するペプチド系抗生物質等の二次代謝産物の生合成に関与する巨大酵素複合体である<sup>15)</sup>。NRPS は触媒機能の異なるドメインと呼ばれる単位により構成されるモジュールが複数連結した構造をとっている(Fig. 2.1)。これらが順番に作用することでアミノ酸を原料としてペプチドが合成される。

NRPS によるペプチド合成において、アデニル化ドメイン(A ドメイン)は基質アミノ酸の認識と ATP 依存的なアデニル化による活性化を担う。アデニル化されたアミノ酸はチオール化ドメイン(T ドメイン)上の 4'-ホスホパンテテインにチオエステル結合を介して連結される。続いて、縮合ドメイン(C ドメイン)によりアミノ酸同士が縮合することでペプチド結合が形成される。

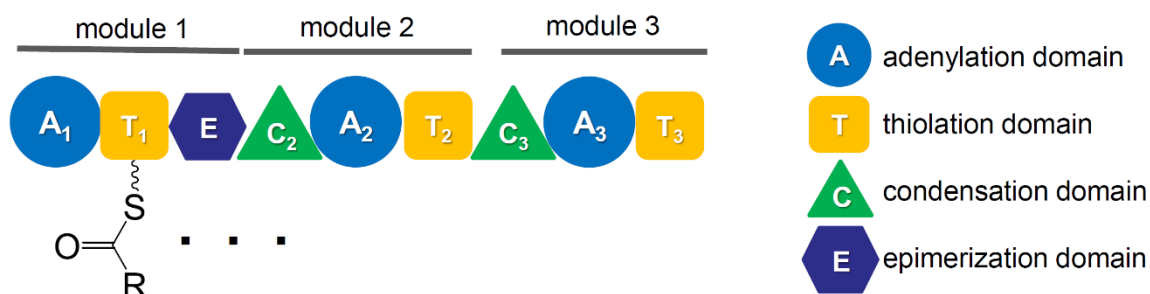


Fig. 2.1. Structure of NRPS.

アデニル化酵素を利用したアミド化合物生産プロセスの開発にあたり、本章ではこの NRPS の A ドメインが触媒する基質アミノ酸のアデニル化による活性化に着目し、アミド化合物合成の可否を検証した。

## 2.2 アデニル化ドメイン単独での利用

NRPS のアデニル化ドメインを単独で利用した例として、大腸菌で発現させた tyrocidine synthetase 1 (TycA) の A ドメインが L-Phe-L-Phe, L-Phe-L-Ala, L-Phe-L-PheNH<sub>2</sub>, L-Phe-L-LeuNH<sub>2</sub> の合成を触媒したとの報告<sup>16)</sup>がある。しかし、本報告はアミノ酸およびアミノ酸アミドの組み合わせのみで、生成物はジペプチドに限られていた。

一方、当研究室では *Brevibacillus parabrevis* IAM 1031 由来の tyrocidine synthetase A の A ドメイン (TycA-A) が L-Trp-L-Pro をはじめとする 6 種類のアミノアシルプロリン (L-Xaa-L-Pro) が合成可能であることを報告している<sup>17)</sup>。

複数のアミノ酸およびアミノ酸アミドが C 末端に導入可能であることから、これらの反応におけるアミド結合形成はアミノ基による非酵素的な求核置換反応により進行しており、アミノ酸のみならず一般的なアミンを利用した場合にも成立するものと推測した (Fig. 2.2)。

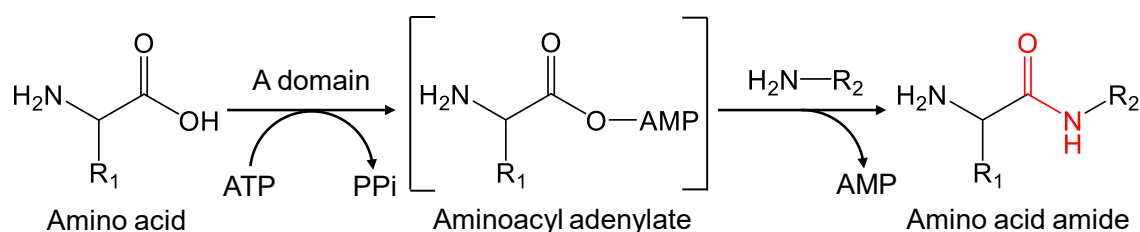


Fig. 2.2. Amino acid amide synthesis catalyzed by A domain of NRPS.

## 2.3 L-アミノ酸アミド合成試験

### 実験方法

#### ・ TycA-A を用いた L-Trp-*N*-アルキルアミド合成試験

Table 2.1 に示す反応液を調製し、37°C で 24 h 反応させた。求核剤としては methylamine, dimethylamine, trimethylamine,  $\beta$ -Ala,  $\gamma$ -aminobutyric acid, azetidine, pyrrolidine, piperidine, azepane, azocane, L-Pro, D-Pro, *cis*-4-hydroxy-L-Pro, *cis*-4-hydroxy-D-Pro, L-ProNH<sub>2</sub>, L-azetidine-2-carboxylic acid の 16 種類のアミンを利用した。

Table 2.1. Reaction mixture for L-Trp-*N*-alkylamide synthesis

Component	Final concn.
L-Trp	10 mM
Nucleophile	10 mM
ATP	20 mM
MgSO <sub>4</sub>	20 mM
TycA-A	0.1 mg/mL
Tris-HCl (pH 8.0)	50 mM
	100 $\mu$ L

#### ・ HPLC 分析

HPLC	Chromaster HPLC system (HITACHI)
Column	XTerra MS C18 2.5 $\mu$ m 4.6 $\times$ 20 mm IS column (Waters)
Oven	40°C
Eluent	A: 0.1% (w/v) formic acid in H <sub>2</sub> O B: Methanol
Wavelength	214 nm

Time (min)	A (%)	B (%)	Flow rate (mL/min)
0	100	0	1.0
2.0	100	0	1.0
12.0	0	100	1.0
12.1	100	0	1.0
15.0	100	0	1.0

#### • MS/MS 分析

MS: Triple TOF4600 mass spectrometer (SCIEX)

Polarity	Positive
Ion spray voltage floating	5.5 kV
Declustering potential	80 V
Source temp.	0°C
Desolvation temp.	500°C
Ion source gas 2	20 psi
Collision energy	30 V
Analysis	Analyst TF software (SCIEX)

#### 実験結果

HPLC 分析の結果、3 級アミンである trimethylamine を除くすべてのアミンとの反応で目的とする L-Trp-N-アルキルアミドと考えられる新規ピークが検出された。得られた生成物が目的のアミドであることを明らかにするために、HPLC にて分取・精製した後、MS 分析および MS/MS 分析による構造決定を行った。MS 分析の結果、15 種類すべてについてプロトン化された L-Trp-N-アルキルアミドの分子量が親イオンとして検出された (Table 2.2)。さらに、MS/MS 分析においては、Fig. 2.3 に示す 2 種類の結合開裂により生成するフラグメントイオンが検出された (Table 2.2)。したがって、L-Trp と使用したアミンの間にアミド結合が形成された L-Trp-N-アルキルアミドが生

成していることが明らかとなった。本結果は基質 L-Trp が TycA-A によりアデニル化された後、各種アミンが反応しアミド結合を形成するという仮説を支持するものであり、予測通りの反応が進行していることが実証できた。

Table 2.2. MS detection of amide products formed by activation of L-Trp by TycA-A followed by nucleophilic substitution

Nucleophile	Protonated parent ion ( $m/z$ )	MS/MS fragment ion ( $m/z$ )			
		<sup>a</sup> Type 1		<sup>b</sup> Type 2	
Methylamine	218.1302	159.0923	58.0300	130.0655	87.0552
Dimethylamine	232.0858	159.0915	72.0446	130.0648	101.0705
$\beta$ -Ala	276.1371	159.0930	116.0508	130.0674	145.0653
$\gamma$ -Aminobutyric acid	290.1532	159.0934	130.0663	ND	ND
Azetidine	244.1457	159.0927	84.0450	130.0657	113.0713
Pyrrolidine	258.1301	159.0916	98.0598	130.0646	127.0863
Piperidine	272.1783	159.0930	112.0767	130.0661	141.1038
Azepane	286.1944	159.0933	126.0927	130.0663	155.1198
Azocane	300.2090	159.0936	140.1087	130.0665	169.1350
L-Pro	302.1259	159.0916	142.0649	130.0649	171.0765
D-Pro	302.1566	159.0917	142.0647	130.0647	171.0760
<i>cis</i> -4-Hydroxy-L-Pro	318.1136	159.0910	ND	130.0642	187.0707
<i>cis</i> -4-Hydroxy-D-Pro	318.1481	159.0934	ND	130.0662	187.0742
L-ProNH <sub>2</sub>	301.1682	159.0940	ND	130.0666	170.0626
L-Azetidine-2-carboxylic acid	288.1772	159.0918	128.0342	130.0649	157.0604

ND, not detected

<sup>a</sup> Fragment ion generated by the cleavage described in Fig. 2.3A.

<sup>b</sup> Fragment ion generated by the cleavage described in Fig. 2.3B.

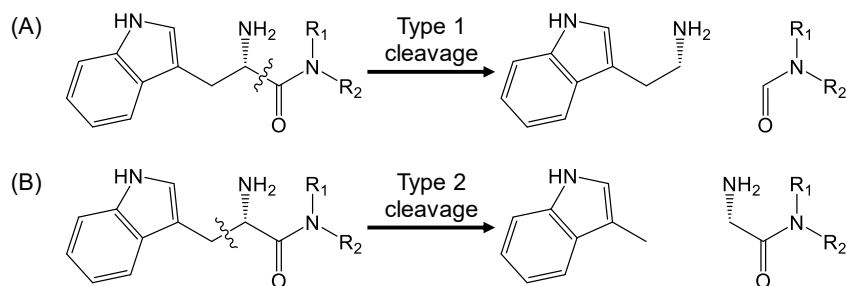


Fig. 2.3. Fragmentation pattern of the L-Trp-*N*-alkylamide.

(A) Type 1 cleavage. (B) Type 2 cleavage.

生成した各 L-Trp-*N*-アルキルアミドについて、その合成量の定量を試みた。得られた生成物の多くは市販されておらず、直接的な定量が不可能であったため、基質である L-Trp の減少量から副生する L-Trp-L-Trp の合成量を差し引くことで算出した。その結果、10 mM の L-Trp から 0.46 mM~1.40 mM の L-Trp-*N*-アルキルアミドが生成しており、対添加 L-Trp 収率として 4.6%~14.0%であった (Table 2.3)。

Table 2.3. Yield of amide products formed by activation of L-Trp by TycA-A followed by nucleophilic substitution

Nucleophile	<sup>a</sup> Product (mM)	<sup>b</sup> Conversion (%)
Methylamine	0.81	8.1
Dimethylamine	0.81	8.1
β-Ala	0.96	9.6
γ-Aminobutyric acid	1.16	11.6
Azetidine	0.82	8.2
Pyrrolidine	0.92	9.2
Piperidine	1.40	14.0
Azepane	0.52	5.2
Azocane	1.35	13.5
L-Pro	0.82	8.2
D-Pro	0.46	4.6
<i>cis</i> -4-Hydroxy-L-Pro	0.94	9.4
<i>cis</i> -4-Hydroxy-D-Pro	0.78	7.8
L-ProNH <sub>2</sub>	0.85	8.5
L-Azetidine-2-carboxylic acid	0.78	7.8

<sup>a</sup> Calculated from the amount of decrease in L-Trp minus the amount of L-Trp-L-Trp generation.

<sup>b</sup> Calculated against the added L-Trp concentration.



## 2.4 結言

本章では、ペプチド系抗生物質の生合成に関与する NRPS を構成するドメインの一つで、基質アミノ酸のアデニル化を触媒する A ドメインに着目し、アミド合成プロセスへの利用可否と検証した。

Tyrocidine synthetase A の A ドメインである TycA-A を利用し、その基質となる L-Trp に対して直鎖状アミン、環状アミン、プロリン誘導体など種々のアミンを求核剤として反応させた。その結果、三級アミンを除くすべてのアミンに対応する L-Trp-*N*-アルキルアミドが生成した。したがって、予測通り NRPS の A ドメインによりアデニル化された基質アミノ酸に対してアミンを作用させることで、酵素の基質特異性の影響を受けない化学的な求核置換反応によりアミド結合が形成される新規な反応が進行することを明らかにした。

### 第 3 章 合成可能なアミド化合物の拡張

本章では第 1 章にて挙げたアデニル化酵素を利用したアミド化合物生産プロセスの課題の一つであるカルボン酸側基質の制限を解決し、合成可能なアミド化合物を拡張することを目的とした。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、アミド合成試験を試みた。

### 3.1 D-アミノ酸含有ジペプチド合成

D-アミノ酸は多くの生体分子を構成する L-アミノ酸の光学異性体であり、物理的・化学的性質は同一であるが生物学的性質は異なる。近年、D-アミノ酸や D-アミノ酸を含有するペプチドの生理的意義や生理活性に関する研究が盛んになり、D-アミノ酸含有ジペプチドには L-アミノ酸のみからなるジペプチドより高い機能や異なる機能を示すものがあると報告されている。例えば、D-Glu-D-Trp, D- $\gamma$ Glu-D-Trp, D-Glu-L-Trp, D- $\gamma$ Glu-L-Trp は骨髄造血幹細胞の増殖抑制効果を示すが、L-Glu-L-Trp および L- $\gamma$ Glu-L-Trp には効果がない<sup>18)</sup>。環状ジペプチドである cyclo(D-Tyr-D-Phe) は cyclo(L-Tyr-L-Phe) よりも高い抗菌活性や抗がん作用を示す<sup>19)</sup>。また、cyclo(L-Trp-D-Pro) は心拍数を上昇させるが cyclo(D-Trp-L-Pro) は低下させる<sup>20)</sup>。このように D-アミノ酸含有ジペプチドは様々な生理活性を示す有用化合物であるが、その酵素的な合成法については報告が少なく、多様な D-アミノ酸含有ジペプチドを合成可能な手法の開発には大きな意義がある。

本節では、第 2 章にて述べた NRPS の A ドメインによるアミノ酸アミド合成機構に着目した。本機構の 2 段階目の反応であるアミンによる求核置換反応は非酵素的であり、C 末端側のアミノ酸として D-体と L-体の両方が導入可能であると考えられる。また、N 末端側のアミノ酸は 1 段階目のアデニル化反応により規定されるため、D-アミノ酸を基質としてアデニル化可能な A ドメインを利用することで、D-アミノ酸を導入可能であると考えられる。これらの予測に基づき D-アミノ酸含有ジペプチドの合成可否を検証した。

### 3.1.1 TycA-A の D-アミノ酸に対する基質特異性評価

#### 実験方法

##### ・基質特異性評価

酵素によりアデニル化された基質とヒドロキシルアミンの反応により生成するヒドロキサム酸が  $\text{Fe}^{3+}$  存在下で波長 490 nm の吸光を示すことを利用した簡便な比色分析法 (Fig. 3.1)<sup>17)</sup> を用いた。本手法により有意な吸光度が検出されれば、ヒドロキサム酸が合成されており、すなわち基質がアデニル化されていると判断可能である。

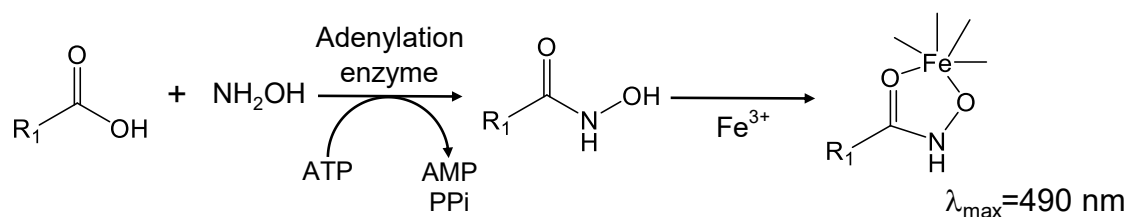


Fig. 3.1. Hydroxamate-based colorimetric assay.

Table 3.1 に示す反応液を調製し、37°C で 24 h 反応させた。8% トリクロロ酢酸 100 μL により反応停止後、3.4% FeCl<sub>3</sub> in 2 M HCl を 100 μL 添加して呈色させた。遠心分離後、上清 100 μL をマイクロプレートリーダーにて 490 nm の吸光度を測定した。

Table 3.1. Reaction mixture for hydroxamate-based colorimetric assay

Component	Final concn.
D-Xaa	5 mM
Hydroxylamine	200 mM
ATP	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
TycA-A	1.0 mg/mL
Tris-HCl (pH 8.0)	50 mM
	200 μL

## 実験結果

TycA-A が一部の D-アミノ酸を基質にできるという知見の基、改めてタンパク質構成性アミノ酸の D-体および D-Orn に対して基質特異性評価を行った。その結果、TycA-A は D-Ala, D-Trp, D-Tyr, D-Phe, D-Leu, D-Met の 6 種類の D-アミノ酸を基質とすることが明らかとなった。本結果より、TycA-A を利用することでこれら 6 種類の D-アミノ酸を N 末端に配するジペプチドが合成可能であるものと考えられる。

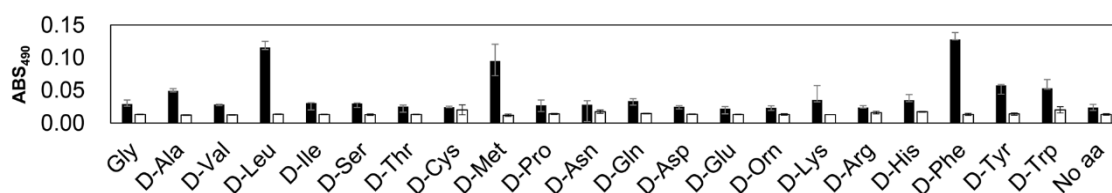


Fig. 3.2. Substrate specificity of TycA-A toward D-amino acids. Filled bars, reaction mixture with TycA-A; open bars, reaction mixture without TycA-A.

### 3.1.2 TycA-A によるジペプチド合成

#### 実験方法

##### ・ Xaa-Pro 合成

C 末端側アミノ酸を 2 級アミンであり求核性が高いと推測される Pro に固定し、N 末端側アミノ酸には 3.1.1 にて TycA-A の基質となると判明した 6 種類のアミノ酸を用いた。いずれのアミノ酸も D-体および L-体を用いて DD-体、DL-体、LD-体の 3 種類のアミノ酸含有ジペプチド合成を行った。Table 3.2 に示す反応液を調製し、37°C で 24 h 反応させた。

Table 3.2. Reaction mixture for DD-, DL-, LD-dipeptide synthesis by TycA-A

Component	Final concn.
D-Xaa or L-Xaa	10 mM
D-Pro or L-Pro	100 mM
ATP	20 mM
MgSO <sub>4</sub>	20 mM
TycA-A	1.0 mg/mL
Tris-HCl (pH 8.0)	50 mM
	200 $\mu$ L

##### ・ D-Trp-D-Xaa 合成

N 末端側アミノ酸を TycA-A が基質とする D-Trp に固定し、C 末端側アミノ酸をタンパク質構成性アミノ酸の D-体および D-Orn とし、C 末端側に任意を D-アミノ酸を配する D-Trp-D-Xaa の合成を試みた。Table 3.3 に示す反応液を調製し、37°C で 24 h 反応させた。

Table 3.3. Reaction mixture for D-Trp-D-Xaa synthesis by TycA-A

Component	Final concn.
D-Trp	10 mM
D-Xaa	10 mM
ATP	20 mM
MgSO <sub>4</sub>	20 mM
TycA-A	1.0 mg/mL
Tris-HCl (pH 8.0)	50 mM
	200 $\mu$ L

• HPLC 分析

HPLC	Chromaster HPLC system (HITACHI)
Column	XTerra MS C18 2.5 $\mu$ m 4.6 $\times$ 20 mm IS column (Waters)
Oven	40°C
Eluent	A: 0.1% (w/v) formic acid in H <sub>2</sub> O B: 0.1% (w/v) formic acid in acetonitrile
Wavelength	214 nm

Time (min)	A (%)	B (%)	Flow rate (mL/min)
0	100	0	1.0
15.0	80	20	1.0
15.1	0	100	1.0
17.0	0	100	1.0
17.1	100	0	1.0
20.0	100	0	1.0

• LC-MS/MS 分析

---

UPLC	Acquity UPLC system (Waters)
Column	Acquity UPLC BEH C18 1.7 $\mu$ m 2.1 $\times$ 100 mm (Waters)
Oven	40°C
Eluent	A: 0.1% (w/v) formic acid in acetonitrile B: 0.1% (w/v) formic acid in H <sub>2</sub> O

---

---

Time (min)	A (%)	B (%)	Flow rate (mL/min)
0	5	95	0.25
1.0	5	95	0.25
16.0	20	80	0.25
16.1	95	5	0.25
19.0	95	5	0.25
19.1	5	95	0.25
22.0	5	95	0.25

---

---

MS	Xevo G2-XS Qtof MS system (Waters)
Porarity	Positive
Capillary	0.5 kV
Sampling cone	20
Source temp.	120°C
Desolvation temp.	450°C
Desolvation gas flow	800 L/hour
Collision energy	6
Analysis	MassLynx

---



## 実験結果

### ・ Xaa-Pro 合成

反応液の HPLC 分析の結果、Ala と Pro を用いた 3 種類の反応液では新規ピークは検出されなかったが、他の 15 種類の反応液では新規ピークが検出された。これらの生成物が目的とする D-Xaa-D-Pro, D-Xaa-L-Pro, L-Xaa-D-Pro であるかを確認するために LC-MS 分析を行った。併せて、HPLC 分析では Ala-Pro の検出が難しかったと考え、LC-MS 分析に供した。MS 分析の結果、Ala-Pro も含めたすべての組み合わせで、プロトン化された Xaa-Pro の分子量と一致するピークを検出した (Table 3.4)。本結果より、TycA-A がアデニル化可能な D-体および L-体のアミノ酸を用い、キラリティの影響を受けない非酵素的な求核置換反応と組み合わせることで、使用するアミノ酸のキラリティを反映したジペプチドが合成可能であることを明らかにした。

Table 3.3. MS detection of Xaa-Pro synthesized by TycA-A

Substrate	Nucleophile	Retention time (min)	Protonated ion ( <i>m/z</i> )
D-Ala	D-Pro	7.70	187.1085
D-Ala	L-Pro	8.52	187.1082
L-Ala	D-Pro	8.47	187.1084
D-Leu	D-Pro	3.45	229.1555
D-Leu	L-Pro	4.60	229.1535
L-Leu	D-Pro	4.57	229.1529
D-Met	D-Pro	1.59	247.1118
D-Met	L-Pro	3.27	247.1116
L-Met	D-Pro	3.19	247.1118
D-Phe	D-Pro	4.89	263.1396
D-Phe	L-Pro	6.28	263.1396
L-Phe	D-Pro	6.29	263.1396
D-Tyr	D-Pro	2.73	279.1348
D-Tyr	L-Pro	3.61	279.1347
L-Tyr	D-Pro	3.65	279.1343
D-Trp	D-Pro	6.35	302.1507
D-Trp	L-Pro	6.97	302.1503
L-Trp	D-Pro	6.96	302.1501

#### ・ D-Trp-D-Xaa 合成

HPLC 分析の結果、C 末端にいずれのアミノ酸を利用した反応液においても、新規ピークを検出することができた。一方で、D-Phe のような TycA-A の基質となる D-アミノ酸を用いた場合には複数のピークが検出され、結合順序の異なる D-Phe-D-Trp やホモジペプチド D-Phe-D-Phe が副生しているものと考えられる。目的とする D-Trp-D-Xaa が合成されているかを確認するため、LC-MS 分析および LC-MS/MS 分析による構造決定を行った。MS 分析の結果、すべての反応液でプロトン化された D-Trp-D-Xaa に対応する分子量が親イオンとして検出された (Table 3.5)。さらに、MS/MS 分析の結果、Fig. 3.3 に示す結合開裂により生じるフラグメントイオンが検出された (Table 3.5)。したがって、C 末端側アミノ酸として利用した D-Xaa に対応する D-Trp-D-Xaa が合成されていると判断でき、任意の D-アミノ酸を C 末端に導入可能であることが明らかとなった。

Table 3.5. MS detection of D-Trp-D-Xaa synthesized by TycA-A

Nucleophile	Putative product	Protonated parent ion ( $m/z$ )	MS/MS fragment ion ( $m/z$ )			
			<sup>a</sup> Type 1		<sup>b</sup> Type 2	
Gly	D-Trp-Gly	262.1198	130.0657	131.0455	159.0923	102.0208
D-Ala	D-Trp-D-Ala	276.1350	130.0654	145.0613	159.0922	116.0366
D-Val	D-Trp-D-Val	304.1670	130.0659	173.0920	159.0925	144.0568
D-Leu	D-Trp-D-Leu	318.1820	130.0662	187.1096	159.0926	158.0842
D-Ile	D-Trp-D-Ile	318.1822	130.0662	187.1113	159.0925	158.0848
D-Ser	D-Trp-D-Ser	292.1301	130.0658	ND	159.0923	132.0275
D-Thr	D-Trp-D-Thr	306.1461	130.0649	175.0734	159.0924	146.0477
D-Cys	D-Trp-D-Cys	308.1074	130.0657	177.0330	159.0923	148.0041
D-Met	D-Trp-D-Met	336.1389	130.0659	205.0646	159.0925	176.0442
D-Pro	D-Trp-D-Pro	302.1511	130.0658	171.0704	159.0924	142.0486
D-Asn	D-Trp-D-Asn	319.1412	130.0659	188.0706	159.0925	159.0454
D-Gln	D-Trp-D-Gln	333.1566	130.0640	202.0828	159.0924	173.0520
D-Asp	D-Trp-D-Asp	320.1253	130.0658	189.0513	159.0924	160.0189
D-Glu	D-Trp-D-Glu	334.1406	130.0656	203.0622	159.0923	174.0465
D-Lys	D-Trp-D-Lys	333.1932	130.0659	202.1197	159.0924	173.0971
D-Arg	D-Trp-D-Arg	361.1990	130.0658	230.1257	159.0924	201.0988
D-His	D-Trp-D-His	342.1568	130.0659	211.0900	159.0921	182.0624
D-Phe	D-Trp-D-Phe	352.1667	130.0659	221.0918	159.0925	192.0658
D-Tyr	D-Trp-D-Tyr	368.1612	130.0657	237.0898	159.0923	208.0615

ND, not detected.

<sup>a</sup> Fragment ion generated by the cleavage described in Fig. 3.3A.

<sup>b</sup> Fragment ion generated by the cleavage described in Fig. 3.3B.

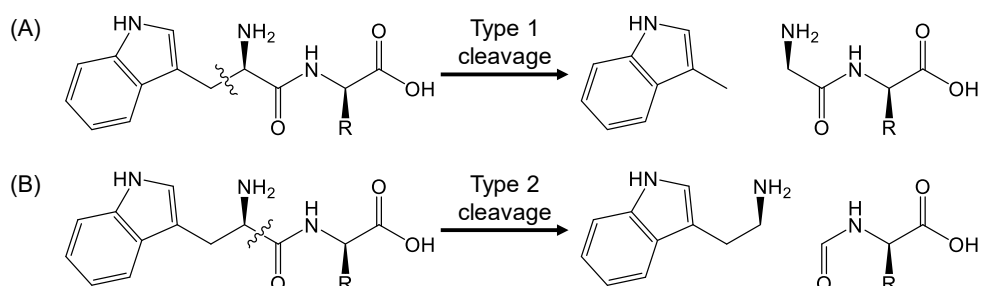


Fig. 3.3. Fragmentation pattern of the D-Trp-D-Xaa.

(A) Type 1 cleavage. (B) Type 2 cleavage.

### 3.1.3 D-アミノ酸を基質とする新規アデニル化ドメインの探索

TycA-A での検討結果より、D-アミノ酸を基質とする A ドメインを用いることで D-アミノ酸含有ジペプチドが合成可能であることが明らかとなった。そこで、さらに合成可能なジペプチドの幅を広げるために、D-アミノ酸を基質とする新規 A ドメインを探索した。

探索に当たり、“E ドメインの上流に位置する A ドメインは L-アミノ酸のみならず D-アミノ酸も基質とする”という仮説を立てた。多くの A ドメインは L-アミノ酸のみを基質とし、二次代謝産物中に D-アミノ酸を導入する際には A ドメインによる L-アミノ酸の活性化、T ドメインへのロード、E ドメインによる D-体への変換を経て C ドメインにより縮合される<sup>21)</sup>。この機構を考慮すると、一般的な A ドメインが D-アミノ酸をアデニル化すると C ドメインによる縮合の際に基質特異性の影響で反応が停止するが、E ドメインの上流の A ドメインが D-アミノ酸をアデニル化する場合 C ドメインによる縮合に影響は出ない。したがって、E ドメインの存在が目的とする A ドメインの探索において重要な指標になるものと推測し、上述の仮説に至った。これまでに D-アミノ酸を基質とすると報告のある A ドメイン<sup>22,23)</sup>や TycA-A についても本仮説には矛盾しない。

本仮説に基づき、tyrocidine synthetase の A ドメインである TycA-A(Fig. 3.4A)に加えて、*Bacillus licheniformis* NBRC 12199 由来の bacitracin synthetase<sup>22)</sup>の A ドメインである BacB2-A, BacC4-A(Fig. 3.4B) および *Paenibacillus thiaminolyticus* OSY-SE 由来 paenibacterin synthetase<sup>23)</sup> のホモログ *Paenibacillus alvei* NBRC 3343 由来 paenibacterin synthetase の A ドメインである PbtA1-A, PbtB2-A, PbtB3-A(Fig. 3.4C)の計 5 つの A ドメインを候補として選択した。

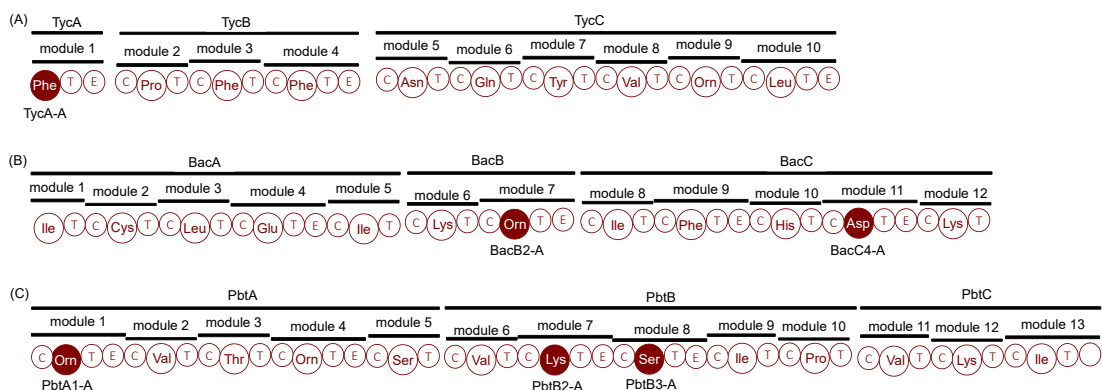


Fig. 3.5. Module organization of tyrocidine synthetase (A), bacitracin synthetase (B), and paenibacterin synthetase (C). Targeted A domains are highlighted.

### 3.1.4 候補アデニル化ドメインの基質特異性評価

候補として選択した5つのAドメインを用いてD-アミノ酸およびL-アミノ酸に対する基質特異性評価を行った。手法は3.1.2においてTycA-Aを対象とした場合と同様である。

基質特異性評価の結果、BacB2-A, PbtA1-A, PbtB2-AはL-LysのみならずD-Lysをも基質とすることが明らかとなった(Fig. 3.6ACD, Fig. 3.7ACD)。一方でBacC4-AおよびPbtB3-AはそれぞれL-Asp、L-Serのみを基質とした(Fig. 3.6BE, Fig. 3.7BE)。

TycA-Aを含めると試験した6つのAドメインのうち、4つが仮説通りL-アミノ酸とD-アミノ酸の両方を基質としており、完全とは言えないが有効な探索方法であったと考えられた。

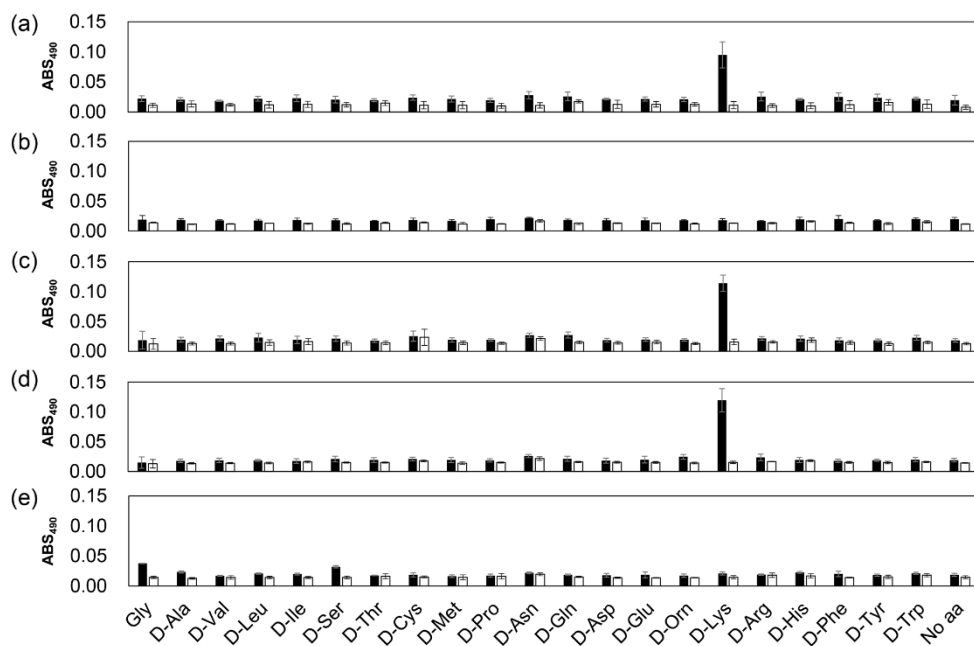


Fig. 3.6. Substrate specificity of A domains toward D-amino acids. (A) BacB2-A, (B) BacC4-A, (C) PbtA1-A, (D) PbtB2-A, (E) PbtB3-A. Filled bars, with enzyme; open bars, without enzyme.

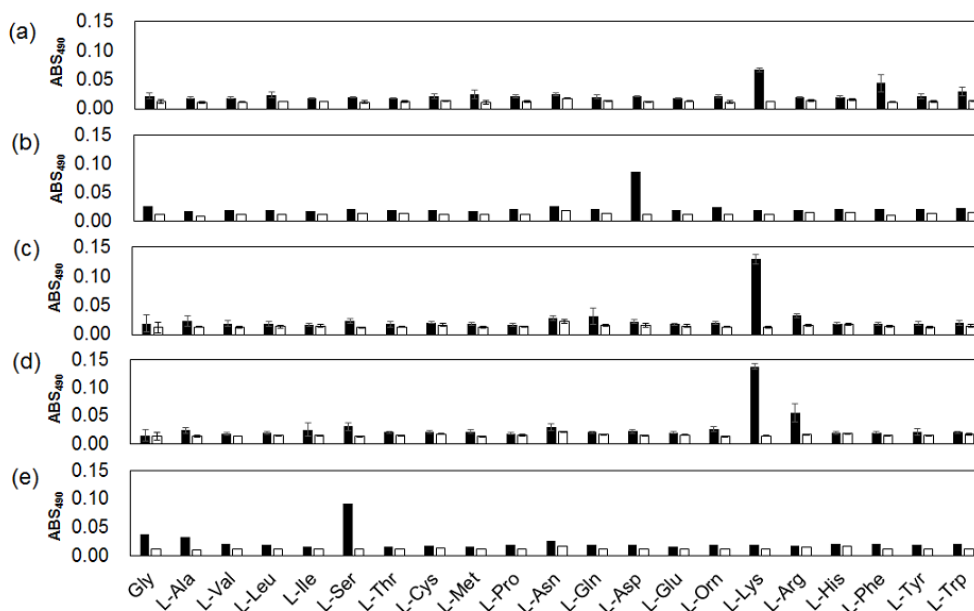


Fig. 3.7. Substrate specificity of A domains toward L-amino acids. (A) BacB2-A, (B) BacC4-A, (C) PbtA1-A, (D) PbtB2-A, (E) PbtB3-A. Filled bars, with enzyme; open bars, without enzyme.

### 3.1.5 BacB2-A によるジペプチド合成

#### 実験方法

##### ・ D-Lys-D-Xaa 合成

D-アミノ酸を基質とする新規 A ドメインの探索にて見出した 3 つの A ドメインはいずれも D-Lys を基質とした。そこで、代表として BacB2-A を用いて D-Lys-D-Xaa の合成を試みた。Table 3.6 に示す反応液を調製し、37°C で 24 h 反応させた。

Table 3.6. Reaction mixture for D-Lys-D-Xaa synthesis by BacB2-A

Component	Final concn.
D-Lys	10 mM
D-Xaa	10 mM
ATP	20 mM
MgSO <sub>4</sub>	20 mM
BacB2-A	1.0 mg/mL
Tris-HCl (pH 8.0)	50 mM
	200 μL

##### ・ LC-MS/MS 分析

UPLC	Acquity UPLC system (Waters)
Column	Acquity BEH Amide 1.7μm 2.1 × 100 mm (Waters)
Oven	30°C
Eluent	A: 10 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (pH 10.0 adjusted with NH <sub>3</sub> ) in acetonitrile: H <sub>2</sub> O = 95:5 B: 10 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (pH 10.0 adjusted with NH <sub>3</sub> ) in acetonitrile: H <sub>2</sub> O = 40:60

Time (min)	A (%)	B (%)	Flow rate (mL/min)
0	80	20	0.20
1.0	80	20	0.20
16.0	28	72	0.20
22.0	28	72	0.20
22.1	80	20	0.20
28.0	80	20	0.20

MS	Xevo G2-XS Qtof MS system (Waters)
Porarity	Positive
Capillary	0.5 kV
Sampling cone	20
Source temp.	120°C
Desolvation temp.	300°C
Desolvation gas flow	1000 L/hour
Collision energy	6
Analysis	MassLynx

## 実験結果

反応液は LC-MS 分析および LC-MS/MS 分析に供し、生成物の確認および構造決定を行った。MS 分析の結果、すべての反応液でプロトン化された D-Lys-D-Xaa に対応する分子量が親イオンとして検出された (Table 3.7)。さらに、MS/MS 分析の結果、Fig. 3.8 に示す結合開裂により生じるフラグメントイオンが検出された (Table 3.7)。したがって、BacB2-A を利用した D-Lys-D-Xaa 合成反応においても C 末端側アミノ酸として用いた D-Xaa に対応するジペプチドが生成していることが明らかとなった。



Table 3.7. MS detection of D-Lys-D-Xaa synthesized by BacB2-A

Nucleophile	Putative product	Protonated parent ion ( $m/z$ )	MS/MS fragment ion ( $m/z$ )			
			<sup>a</sup> Type 1		<sup>b</sup> Type 2	
Gly	D-Lys-Gly	204.1352	84.0814	ND	129.1030	74.0268
D-Ala	D-Lys-D-Ala	218.1507	84.0815	116.0360	129.1027	88.0403
D-Val	D-Lys-D-Val	333.1928	84.0814	231.0796	129.1025	203.0820
D-Leu	D-Lys-D-Leu	278.1542	84.0814	176.0419	129.1028	148.0455
D-Ile	D-Lys-D-Ile	260.1974	84.0812	ND	129.1031	130.0863
D-Ser	D-Lys-D-Ser	248.1612	84.0815	146.0462	129.1028	118.0549
D-Thr	D-Lys-D-Thr	246.1817	84.0811	144.0621	129.1025	116.0713
D-Cys	D-Lys-D-Cys	250.1228	84.0824	147.9908	129.1015	120.0120
D-Met	D-Lys-D-Met	261.1563	84.0816	159.0387	129.1031	131.0510
D-Pro	D-Lys-D-Pro	275.1719	84.0810	173.0522	129.1024	ND
D-Asn	D-Lys-D-Asn	244.1660	84.0812	142.0518	129.1027	114.0555
D-Gln	D-Lys-D-Gln	151.0849	84.0815	230.1219	129.1030	173.1073
D-Asp	D-Lys-D-Asp	262.1405	84.0811	ND	129.1029	132.0318
D-Glu	D-Lys-D-Glu	276.1559	84.0814	ND	129.1028	146.0456
D-Arg	D-Lys-D-Arg	234.1444	84.0814	132.0218	129.1023	104.0391
D-His	D-Lys-D-His	284.1728	84.0805	182.0543	129.1041	154.0724
D-Phe	D-Lys-D-Phe	294.1820	84.0813	192.0709	129.1027	164.0713
D-Tyr	D-Lys-D-Tyr	310.1769	84.0818	208.0622	129.1024	180.0598
D-Trp	D-Lys-D-Trp	333.1928	84.0814	231.0796	129.1025	203.0820

ND, not detected.

<sup>a</sup> Fragment ion generated by the cleavage described in Fig. 3.8A.

<sup>b</sup> Fragment ion generated by the cleavage described in Fig. 3.8B.

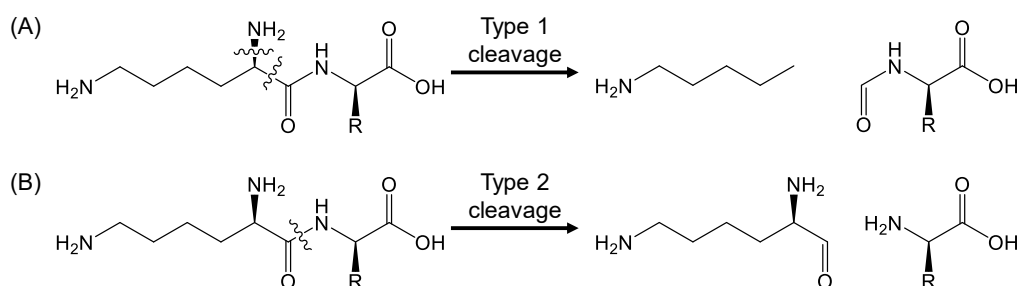


Fig. 3.8. Fragmentation pattern of the D-Lys-D-Xaa.

(A) Type 1 cleavage. (B) Type 2 cleavage.

### 3.2 β-アスパルチルアミド合成

β-アスパルチルアミドはアスパラギン酸のβ-位のカルボキシ基がアミド化された化合物である (Fig. 3.9)。セリンラセマーゼの阻害活性を示す β-aspartylhydroxamate<sup>26)</sup> や免疫調節作用を示す β-aspartyltryptophan<sup>27)</sup> など、生理活性を示すものも知られており、医薬品や機能性食品添加物として期待される有用化合物である。

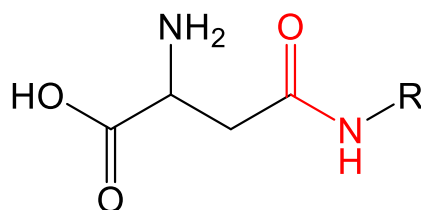


Fig. 3.9. Structure of β-aspartylamide.

第 2 章および 3.1 節ではアミノ酸のα-カルボキシ基をアデニル化する NRPS の A ドメインを用いたアミド化合物合成を検討した。本節では、化合物の有用性とアミノ酸の側鎖カルボキシ基のアミド化という観点から、β-アスパルチルアミドをターゲットとし、その合成法開発を検討した。

### 3.2.1 アスパラギン合成酵素の利用

最も単純な構造のβ-アスパルチルアミドであるアスパラギンは生体内においてアスパラギン合成酵素により合成されることが良く知られている。本反応ではアスパラギン酸のβ-カルボキシ基がアデニル化された後にアンモニアと反応することでアスパラギンが生成する(Fig. 3.10A)。基質をアデニル化により活性化する点で NRPS の Aドメインと類似しており、アスパラギン合成におけるアンモニアを一般的なアミンへと置き換えることで、β-アスパルチルアミドが合成可能となると推測した(Fig. 3.10B)。

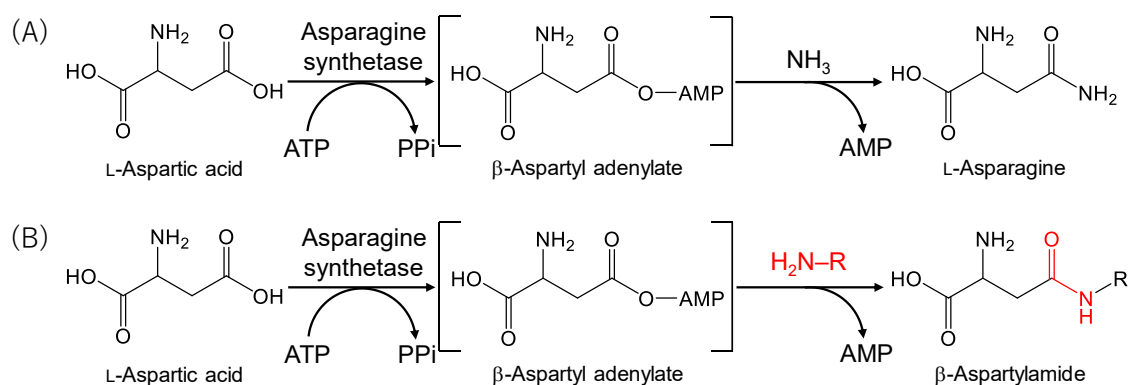


Fig. 3.10. Asparagine synthesis (A) and β-aspartylamide synthesis (B) catalyzed by asparagine synthetase.

### 3.2.2 $\beta$ -アスパルチルアミド合成試験

#### 実験方法

##### ・ $\beta$ -アスパルチルアミド合成

アスパラギン合成酵素として *Escherichia coli* BL21(DE3)由来の AsnA<sup>28)</sup>を利用した。Table 3.8 に示す反応液を調製し、37°C で 24 h 反応させた。求核剤として本来の基質であるアンモニア(塩化アンモニウム)に加えて、hydroxylamine, methylamine, ethylamine, dimethylamine, trimethylamine, Gly, L-Pro, L-Trp の 9 つを検討した。

Table 3.8. Reaction mixture for  $\beta$ -aspartylamide synthesis by AsnA

Component	Final concn.
L-Asp	10 mM
Nucleophile	100 or 20 mM
ATP	20 mM
MgCl <sub>2</sub>	20 mM
AsnA	1.0 mg/mL
Tris-HCl (pH 8.4)	50 mM
	200 $\mu$ L

##### ・HPLC 分析

HPLC	LaChrom L-7000 series HPLC system (HITACHI)
Column	Inertsil ODS-2 4.6 $\times$ 250 mm (GL sciences)
Oven	40°C
Eluent	A: 1 g/L Sodium 1-octanesulfonate, 20 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O (pH 6.0) B: 1 g/L Sodium 1-octanesulfonate, 20 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in 40%(v/v) methanol (pH 6.0)
Wavelength	Excitation: 340 nm, Emission: 450 nm

Time (min)	A (%)	B (%)	Flow rate (mL/min)
0	100	0	0.7
8.0	100	0	0.7
10.0	0	100	0.7
20.0	0	100	0.7
20.1	100	0	0.7
30.0	100	0	0.7

(Nucleophile: Gly, L-Pro)

HPLC	LaChrom L-7000 series HPLC system (HITACHI)
Column	COSMOSIL Packed Column HILIC 4.6 × 250 mm (nacalai tesque)
Oven	40°C
Eluent	A: 10 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> B: Acetonitrile
Wavelength	Excitation: 340 nm, Emission: 450 nm

Time (min)	A (%)	B (%)	Flow rate (mL/min)
0	50	50	1.0
100.0	50	50	1.0

ポストカラム誘導体化

誘導体化反応液(22 g/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 12 g/L NaOH, 4 g/L *N*-acetyl-L-cysteine, 0.8 g/L *o*-phthalaldehyde)を 0.3 mL/min で送液

• LC-MS 分析

---

UPLC	Acquity UPLC system (Waters)
Column	Acquity UPLC BEH C18 1.7 $\mu$ m 2.1 $\times$ 100 mm (Waters)
Oven	40°C
Eluent	A: 0.1% (w/v) formic acid in acetonitrile B: 0.1% (w/v) formic acid in H <sub>2</sub> O

---

---

Time (min)	A (%)	B (%)	Flow rate (mL/min)
0	10	90	0.20
11.0	90	10	0.20
13.0	90	10	0.20
13.1	10	90	0.20
15.0	10	90	0.20

---

---

MS	Xevo G2-XS Qtof MS system (Waters)
Porarity	Positive
Capillary	0.5 kV
Sampling cone	20
Source temp.	120°C
Desolvation temp.	450°C
Desolvation gas flow	800 L/hour
Analysis	MassLynx

---

## 実験結果

反応液の HPLC 分析の結果、求核剤として trimethylamine を用いた場合を除いて、 $\beta$ -アスパルチルアミドと推定される新規ピークが検出された。これらの生成物が目的とするアミド化合物であることを確認するため、シリカゲルカラムクロマトグラフィーまたは HPLC による精製後、LC-MS 分析を行った。MS 分析の結果、すべての組み合わせで求核剤に対応するプロトン化された  $\beta$ -アスパルチルアミドの分子量と一致するピークを検出した (Table 3.9)。本結果より、AsnA は本来の反応であるアスパラギン合成反応に加えて、直鎖状アミンや環状アミン、アミノ酸などを用いることで多様な  $\beta$ -アスパルチルアミドが合成可能であることを明らかにした。

Table 3.9. MS detection of  $\beta$ -aspartylamide synthesized by AsnA

Nucleophile	Protonated ion ( $m/z$ )
NH <sub>4</sub> Cl	133.0613
Hydroxylamine	149.0562
Methylamine	147.0771
Ethylamine	161.0925
Dimethylamine	161.0928
Pyrrolidine	187.1084
Gly	191.0670
L-Pro	231.0983
L-Trp	320.1248

### 3.3 脂肪酸アミド合成

ここまでで、アミノ酸をアデニル化酵素の基質としたアミド合成反応を検討してきたが、適切なアデニル化酵素を選択することでアミノ酸のみならずより幅広いカルボン酸をアミド合成反応に使用できると考えられる。例えば、疎水性の中～長鎖アルキル基をもつ脂肪酸と親水性基を有するアミンから成る脂肪酸アミドは両親媒性化合物となり、界面活性剤としての用途が期待できる。そこで本節では、直鎖脂肪酸を基質とした脂肪酸アミドをターゲットとした。

#### 3.3.1 脂肪酸をアデニル化可能な酵素の探索

脂肪酸アミドの合成法開発にあたり、脂肪酸をアデニル化可能なアデニル化酵素が必要となる。該当する酵素の探索を行い、**fatty acyl-AMP ligase (FAAL)**に着目した。*Mycobacterium tuberculosis* 由来の FAAL は細胞表面の複合脂質の生合成に関与しており、その脂質合成の起点として脂肪酸をアデニル化する役割を担っている<sup>29)</sup>。アデニル化された脂肪酸はポリケタイド合成酵素(PKS)のアシルキャリアープロテインドメイン(ACP ドメイン)上のホスホパンテテインに連結され、その後の反応に利用される。本反応機構は基質のアデニル化と続くチオエステル結合を介した酵素へのロードという観点で NRPS の反応機構に類似している(Fig. 3.11)。したがって、FAAL を利用することで NRPS の A ドメインと同様の機構でアミド化合物合成が可能ではないかと推測した(Fig. 3.12)。

病原菌である *M. tuberculosis* の酵素を利用することは難しいので、*M. tuberculosis* 由来 FAAL のアミノ酸配列をクエリーとした BLAST 検索により類似酵素を探索した。その結果、近縁種であるが非病原性である *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 由来の FAAL である FadD26 を見出した。以後、FadD26 を利用した脂肪酸アミド合成を検討した。



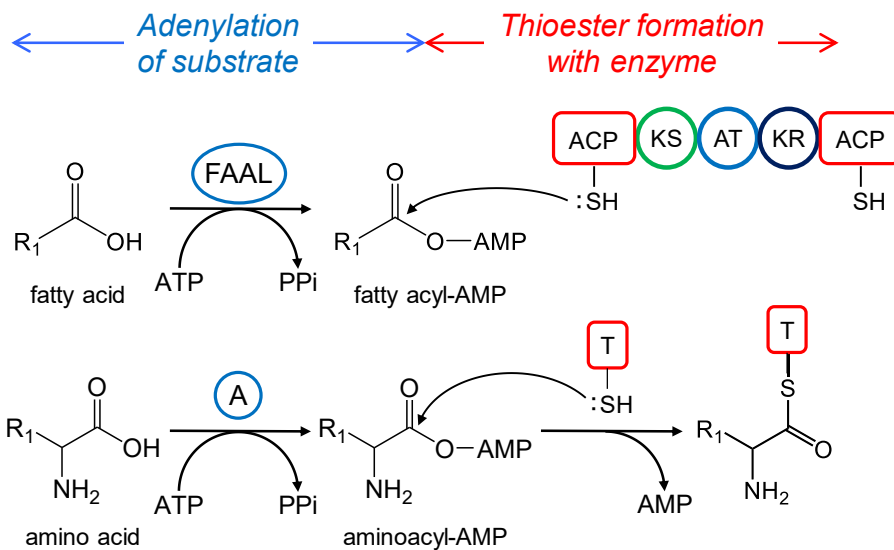


Fig. 3.11. The similarity in reaction mechanism between FAAL and A domain of NRPS.

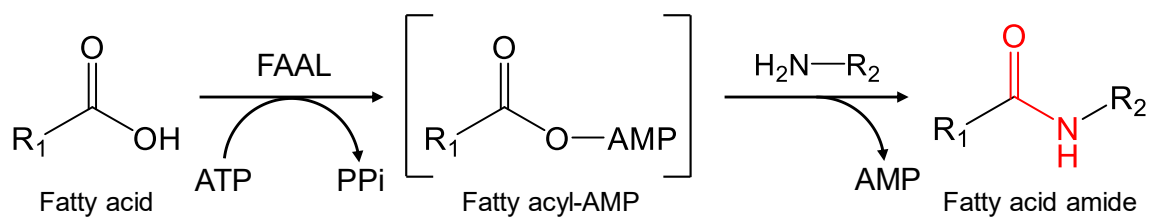


Fig. 3.12. Fatty acid amide synthesis catalyzed by FAAL.

### 3.3.2 脂肪酸に対する基質特異性評価

#### 実験方法

##### ・基質特異性評価

Table 3.10 に示す反応液を調製し、30°C で 24 h 反応させた。対象脂肪酸として、短鎖のプロピオン酸(C<sub>3</sub>)、中鎖のヘキサン酸(C<sub>6</sub>)、ヘプタン酸(C<sub>7</sub>)、オクタン酸(C<sub>8</sub>)、ノナン酸(C<sub>9</sub>)、デカン酸(C<sub>10</sub>)、ラウリン酸(C<sub>12</sub>)、長鎖のオレイン酸(C<sub>18:1</sub>)、リノレン酸(C<sub>18:2</sub>)を選択した。

Table 3.10. Reaction mixture for hydroxamate-based colorimetric assay

Component	Final concn.
Fatty acid	10 mM
Hydroxylamine	200 mM
ATP	20 mM
MgSO <sub>4</sub>	20 mM
FadD26	1.0 mg/mL
HEPES-NaOH (pH 8.0)	50 mM
	200 μL

## 実験結果

基質特異性評価の結果、FadD26は短鎖のプロピオン酸に対する活性は無かったが、中鎖脂肪酸(C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>)や長鎖脂肪酸(C<sub>18:1</sub>, C<sub>18:2</sub>)など幅広い脂肪酸に対して活性があることが明らかとなった(Fig. 3.13)。多様な脂肪酸を基質とすることができるFadD26のこのような特長は、合成可能なアミド化合物の拡張において重要であると言える。

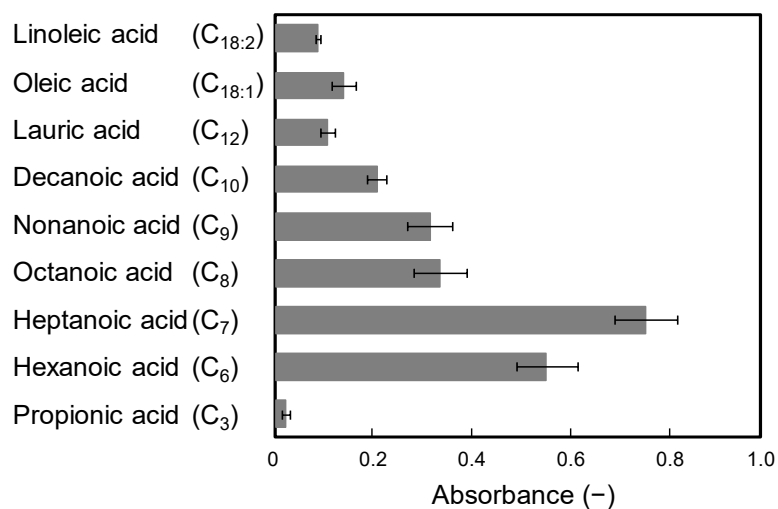


Fig. 3.13. Substrate specificity of FadD26.

### 3.3.3 脂肪酸アミド合成試験

#### 実験方法

##### ・脂肪酸アミド合成

5種類の中鎖脂肪酸(C<sub>6</sub>~C<sub>10</sub>)を基質として、脂肪酸アミド合成試験を行った。Table 3.11 に示す反応液を調製し、30°C で 24 h 反応させた。求核剤には、直鎖状アミン methylamine, dimethylamine, trimethylamine, 環状アミンとして azetidine, pyrrolidine, piperidine, azepane, azocan, アミノ酸として L-Pro, D-Pro, L-Lys, L-Glu の計 12 種類を検討した。

Table 3.11. Reaction mixture for fatty acid amide synthesis by FadD26

Component	Final concn.
Fatty acid (C <sub>6</sub> -C <sub>10</sub> )	10 mM
Nucleophile	200 mM
ATP	20 mM
MgSO <sub>4</sub>	20 mM
FadD26	1.0 mg/mL
HEPES-NaOH (pH 8.0)	50 mM
	200 μL

##### ・HPLC 分析

HPLC	Chromaster HPLC system (HITACHI)
Column	Inertsil ODS-3 5μm 4.6 × 150 mm (GL sciences)
Oven	40°C
Eluent	A: 0.1% (w/v) formic acid in H <sub>2</sub> O B: 0.1% (w/v) formic acid in acetonitrile
Wavelength	210 nm

Time (min)	A (%)	B (%)	Flow rate (mL/min)
0	90	10	1.0
15.0	10	90	1.0
25.0	10	90	1.0
25.1	90	10	1.0
28.0	90	10	1.0

• LC-MS 分析

UPLC	Acquity UPLC system (Waters)
Column	Acquity UPLC BEH C18 1.7 $\mu$ m 2.1 $\times$ 100 mm (Waters)
Oven	40°C
Eluent	A: 0.1% (w/v) formic acid in acetonitrile B: 0.1% (w/v) formic acid in H <sub>2</sub> O

Time (min)	A (%)	B (%)	Flow rate (mL/min)
0	20	80	0.20
2.0	20	80	0.20
13.5	90	10	0.20
15.5	90	10	0.20
15.6	20	80	0.20
18.5	20	80	0.20

MS	Xevo G2-XS Qtof MS system (Waters)
Porarity	Positive
Capillary	0.5 kV
Sampling cone	20
Source temp.	120°C
Desolvation temp.	450°C
Desolvation gas flow	800 L/hour
Analysis	MassLynx

## 実験結果

反応液の HPLC 分析の結果、求核剤として trimethylamine および azepane を用いた場合にはいずれの脂肪酸との反応においても新規ピークを確認できず、デカン酸と azocane の組み合わせでも新規ピークは確認できなかった。一方で、他の組み合わせについては脂肪酸アミドと推定される新規ピークが検出された。これらが目的とする化合物であることを確認するため、HPLC により分取・精製後、LC-MS 分析を行った。MS 分析の結果、分析を行ったすべての組み合わせでプロトン化された脂肪酸アミドの分子量と一致するピークを検出した (Table 3.12)。本結果より、FadD26 を利用することで多様な脂肪酸とアミノの組み合わせで脂肪酸アミドが合成可能であることを明らかにした。特にアミノ酸を求核剤とした場合に合成される *N*-fatty acyl amino acid は *N*-アシルアミノ酸系界面活性剤として注目されている物質であり、工業的な意義も大きいと考えられる。

Table 3.12. MS detection of fatty acid amide synthesized by FadD26

Nucleophile	Fatty acid				
	Hexanoic acid	Heptanoic acid	Octanoic acid	Nonanoic acid	Decanoic acid
Methylamine	130.1236	144.1392	158.1548	172.1706	186.1859
Dimethylamine	144.1391	158.1547	172.1705	186.1864	200.2018
Azetidine	156.1391	170.1546	184.1705	198.1859	212.2012
Pyrrolidine	170.1550	184.1705	198.1864	212.2016	226.2174
Piperidine	184.1703	198.1861	212.2016	221.1179	240.2331
Azocane	212.2016	226.2172	240.2328	254.2473	ND
L-Pro	214.1443	228.1601	242.1762	256.1915	270.2078
D-Pro	214.1445	228.1602	242.1752	256.1913	270.2073
L-Lys	245.1866	259.2019	273.2177	287.2338	301.2498
L-Glu	246.1343	260.1504	274.1662	288.1820	302.1975

ND, not detected

### 3.4 芳香族カルボン酸アミド合成

脂肪酸に続くアミノ酸以外のカルボン酸として、本節では芳香族カルボン酸を取り上げ、芳香族カルボン酸アミドを合成ターゲットとした。

#### 3.4.1 芳香族カルボン酸をアデニル化可能な酵素の探索

芳香族カルボン酸アミドの合成法開発にあたり、芳香族カルボン酸をアデニル化可能なアデニル化酵素が必要となる。そこで、NRPSのAドメインの一部にはアミノ酸ではなく芳香族カルボン酸を基質とするものが知られていることに着目した。*Bacillus subtilis* str. 168由来 *bacillibactin synthetase* により合成される *bacillibactin*<sup>30)</sup>や *Escherichia coli* 由来 *enterobactin synthetase*<sup>31)</sup>により合成される *enterobactin* は鉄キレートシデロフォアであり、構造中に芳香族カルボン酸であり、鉄イオンをトラップする 2,3-dihydroxybenzoic acid (2,3-DHB)を含んでいる。2,3-DHBの組み込みにはそれぞれ DhbE や EntE という Aドメインが関与しており、これらが 2,3-DHBのアデニル化を触媒する。これら Aドメインを利用することで芳香族カルボン酸アミドが合成可能であると推測し(Fig. 3.14)、本研究では DhbEを用いて検討を行った。

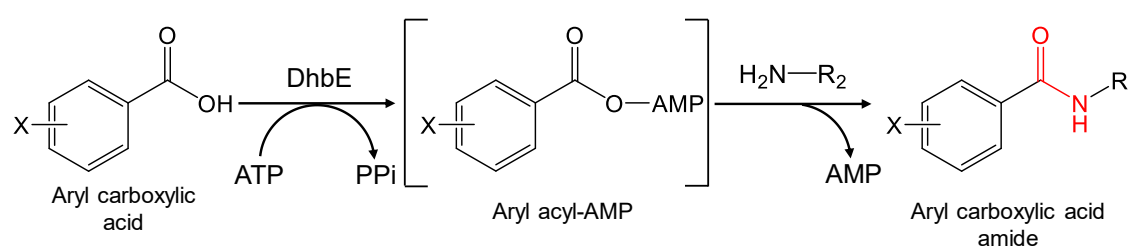


Fig. 3.14. Aryl carboxylic acid amide synthesis catalyzed by DhbE.

### 3.4.2 安息香酸一置換体に対する基質特異性評価

#### 実験方法

##### ・基質特異性評価

芳香族カルボン酸を対象として比色分析による DhbE の基質特異性評価を行った。Table 3.12 に示す反応液を調製し、37°C で 24 h 反応させた。対象として安息香酸およびヒドロキシ基(-OH)、アミノ基(-NH<sub>2</sub>)、ニトロ基(-NO<sub>2</sub>)、クロロ基(-Cl)、フルオロ基(-F)、メチル基(-CH<sub>3</sub>)、カルボキシ基(-COOH)を置換基とした安息香酸一置換体(*o*-, *m*-, *p*-)を試験した。ただし、サリチル酸(*o*-ヒドロキシ安息香酸)は基質自体が Fe<sup>3+</sup>と錯体を形成し呈色するため除外した。

Table 3.12. Reaction mixture for hydroxamate-based colorimetric assay

Component	Final concn.
Aryl carboxylic acid	5 mM
Hydroxylamine	200 mM
ATP	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
FadD26	1.0 mg/mL
HEPES-NaOH (pH 7.5)	50 mM
	200 μL



## 実験結果

基質特異性評価の結果、DhbEは安息香酸、*m*-および *p*-ヒドロキシ安息香酸、*o*-, *m*-, *p*-アミノ安息香酸、*m*-クロロ安息香酸、*o*-, *m*-, *p*-フルオロ安息香酸、*m*-メチル安息香酸、イソフタル酸(*m*-カルボキシ安息香酸)の12種類を基質とすることが示唆された(Fig. 3.15)。置換基の無い安息香酸や比較的小さい置換基では置換位置によらず基質として受け入れやすく、*m*-置換体は置換基によらず受け入れやすい傾向が見られた。様々な安息香酸一置換体を基質とできる DhbEは、合成可能なアミド化合物の拡張において有用であると考えられる。

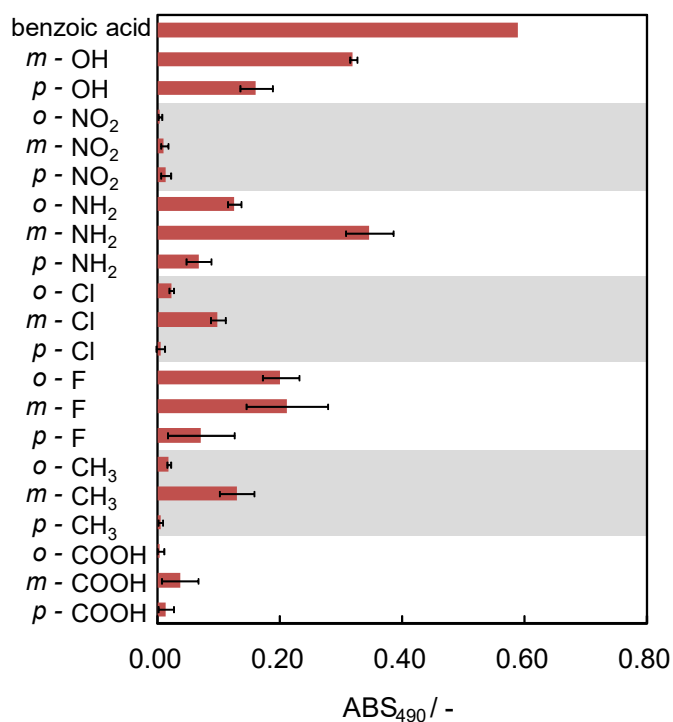


Fig. 3.15. Substrate specificity of DhbE.

### 3.4.3 芳香族カルボン酸アミド合成試験

#### 実験方法

##### ・芳香族カルボン酸アミド合成

DhbE を用いて実際にアミド化合物が合成可能か検証を行った。Table 3.13 に示す反応液を調製し、37°C で 24 h 反応させた。基質芳香族カルボン酸には比色分析での基質にサリチル酸を加えた 22 種類、求核剤には hydroxylamine および L-Pro を用いた。

Table 3.13. Reaction mixture for aryl carboxylic acid amide synthesis by DhbE

Component	Final concn.
Aryl carboxylic acid	10 mM
Hydroxylamine or L-Pro	200 mM
ATP	20 mM
MgSO <sub>4</sub>	20 mM
FadD26	1.0 mg/mL
HEPES-NaOH (pH 7.5)	50 mM
	200 $\mu$ L

##### ・HPLC 分析

HPLC	LaChrom L-7000 series HPLC system (HITACHI)
Column	COSMOSIL 5C <sub>18</sub> -AR-II 4.6 $\times$ 150 mm (nacalai tesque)
Oven	40°C
Eluent	A: 0.1% (w/v) formic acid in H <sub>2</sub> O B: 0.1% (w/v) formic acid in acetonitrile
Wavelength	254 nm

Time (min)	A (%)	B (%)	Flow rate (mL/min)
0	100	0	1.0
12.0	50	50	1.0
15.0	50	50	1.0
15.1	100	0	1.0
20.0	100	0	1.0

• LC-MS 分析

UPLC	Acquity UPLC system (Waters)
Column	Acquity UPLC BEH C18 1.7 $\mu$ m 2.1 $\times$ 100 mm (Waters)
Oven	40°C
Eluent	A: 0.1% (w/v) formic acid in acetonitrile B: 0.1% (w/v) formic acid in H <sub>2</sub> O

(Nucleophile: Hydroxylamine)

Time (min)	A (%)	B (%)	Flow rate (mL/min)
0	20	80	0.20
2.0	20	80	0.20
13.5	90	10	0.20
15.5	90	10	0.20
15.6	20	80	0.20
18.5	20	80	0.20

(Nucleophile: L-Pro)

Time (min)	A (%)	B (%)	Flow rate (mL/min)
0	1	99	0.21
8.0	50	50	0.21
10.0	50	50	0.21
10.1	1	99	0.21
13.0	1	99	0.21

MS	Xevo G2-XS Qtof MS system (Waters)
Porarity	Positive
Capillary	0.5 kV
Sampling cone	20
Source temp.	120°C
Desolvation temp.	450°C
Desolvation gas flow	800 L/hour
Analysis	MassLynx

### 実験結果

反応液の HPLC 分析の結果、hydroxylamine との反応では、比色分析の際に基質として認識すると考えられた 12 種類に加えて、サリチル酸、*m*-ニトロ安息香酸、*o*-および *p*-メチル安息香酸を基質とした計 16 種類でアミド化合物と推定される新規ピークが検出された。サリチル酸以外 3 つの基質については生成物が少なかったか比色分析で用いる波長のモル吸光係数が小さかったために比色分析では検出できなかったものと考えられる。一方、L-Pro との反応では 12 種類の基質でアミド化合物と推定される新規ピークが検出された。これらが目的とする化合物であることを確認するため、HPLC による分取・精製後、LC-MS 分析を行った。MS 分析の結果、分析を行ったすべての組み合わせでプロトン化された芳香族カルボン酸アミドの分子量と一致するピークを検出した (Table 3.14)。本結果より、DhbE によるアデニル化された様々な芳香族カルボン酸に対して、hydroxylamine や L-Pro が反応し、アミド結合が形成されることを明らかにした。

Table 3.14. MS detection of aryl carboxylic acid amide synthesized by DhbE

Substituent of benzoic acid	Nucleophile	
	Hydroxylamine	L-Pro
H	138.0554	220.0906
<i>o</i> -OH	154.0505	ND
<i>m</i> -OH	154.0505	236.0922
<i>p</i> -OH	154.0504	236.0923
<i>o</i> -NH <sub>2</sub>	153.0665	235.1183
<i>m</i> -NH <sub>2</sub>	153.0664	235.1080
<i>p</i> -NH <sub>2</sub>	153.0665	235.1080
<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	ND	ND
<i>m</i> -NO <sub>2</sub>	183.0405	ND
<i>p</i> -NO <sub>2</sub>	ND	ND
<i>o</i> -Cl	ND	ND
<i>m</i> -Cl	172.0143	254.0582
	174.0135	256.0555
<i>p</i> -Cl	ND	ND
<i>o</i> -F	156.0460	ND
<i>m</i> -F	156.0458	ND
<i>p</i> -F	156.0459	238.0879
<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	152.0708	234.1131
<i>m</i> -CH <sub>3</sub>	152.0713	234.1131
<i>p</i> -CH <sub>3</sub>	152.0714	234.1129
<i>o</i> -COOH	ND	ND
<i>m</i> -COOH	182.0459	264.0879
<i>p</i> -COOH	ND	ND

ND, not detected

生成した各芳香族カルボン酸アミドについて、その合成量の定量を試みた。得られた生成物の多くは市販されておらず、直接的な定量が不可能であったため、基質である芳香族カルボン酸の減少量から算出した。10 mM の芳香族カルボン酸から hydroxylamine との反応では 0.57 mM~6.64 mM、L-Pro との反応では 0.97 mM~2.47 mM の芳香族カルボン酸アミドが生成しており (Table 3.15)、L-Pro よりも hydroxylamine の方が生成量が多く、反応が進行しやすい傾向が見られた。

Table 3.15. Yield of aryl carboxylic acid amide synthesized by DhbE

Substituent of benzoic acid	Nucleophile			
	Hydroxylamine		L-Pro	
	<sup>a</sup> Product (mM)	<sup>b</sup> Conversion (%)	<sup>a</sup> Product (mM)	<sup>b</sup> Conversion (%)
H	5.65	56.5	2.15	21.5
<i>o</i> -OH	1.02	10.2	ND	ND
<i>m</i> -OH	2.81	28.1	2.45	24.5
<i>p</i> -OH	2.99	29.9	1.28	12.8
<i>o</i> -NH <sub>2</sub>	2.76	27.6	1.04	10.4
<i>m</i> -NH <sub>2</sub>	6.64	66.4	1.58	15.8
<i>p</i> -NH <sub>2</sub>	2.44	24.4	2.47	24.7
<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	ND	ND	ND	ND
<i>m</i> -NO <sub>2</sub>	1.26	12.6	ND	ND
<i>p</i> -NO <sub>2</sub>	ND	ND	ND	ND
<i>o</i> -Cl	ND	ND	ND	ND
<i>m</i> -Cl	2.39	23.9	1.31	13.1
<i>p</i> -Cl	ND	ND	ND	ND
<i>o</i> -F	4.71	47.1	1.09	10.9
<i>m</i> -F	5.40	54.0	ND	ND
<i>p</i> -F	3.15	31.5	ND	ND
<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	0.57	5.7	1.86	18.6
<i>m</i> -CH <sub>3</sub>	4.00	40.0	0.97	9.7
<i>p</i> -CH <sub>3</sub>	0.73	7.3	1.56	15.6
<i>o</i> -COOH	ND	ND	ND	ND
<i>m</i> -COOH	2.10	21.0	ND	ND
<i>p</i> -COOH	ND	ND	ND	ND

ND, not detected

<sup>a</sup> Calculated from the amount of decrease in aryl carboxylic acid.<sup>b</sup> Calculated against the added aryl carboxylic acid concentration.

### 3.5 結言

本章ではアデニル化酵素によるアミド化合物生産プロセスの課題の一つであるカルボン酸側基質の制限を解決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の探索とアミド合成を行った。

3.1 節では第 2 章にて開発した NRPS の A ドメインによるアミノ酸アミド合成反応を応用し、D-アミノ酸含有ジペプチドの合成を試みた。1 段階目のアデニル化反応において D-アミノ酸をアデニル化可能な A ドメイン (TycA-A: D-Ala, D-Trp, D-Tyr, D-Phe, D-Leu, D-Met; BacB2-A: D-Lys) を利用することで N 末端に、2 段階目の求核置換反応において任意の D-アミノ酸を求核剤として利用することで C 末端に D-アミノ酸を配するジペプチドが合成可能となった。

3.2 節ではアミノ酸の側鎖カルボキシ基のアミド化という観点から検討を行った。L-Asp の  $\beta$ -カルボキシ基をアデニル化するアスパラギン合成酵素 (AsnA) を利用することで直鎖状アミン、環状アミン、アミノ酸などを求核剤として 9 種類の  $\beta$ -アスパルチルアミドの合成に成功した。

3.3 節ではアミノ酸以外のカルボン酸として脂肪酸を取り上げた。複合脂質の生合成に関与する FAAL である FadD26 を利用することで中～長鎖の脂肪酸がアデニル化可能となり、直鎖状アミン、環状アミン、アミノ酸など 10 種類の求核剤との組み合わせで約 50 種類の脂肪酸アミドの合成に成功した。

3.4 節ではアミノ酸以外のカルボン酸として芳香族カルボン酸を取り上げた。鉄キレートシデロフォアの合成に関わる NRPS の A ドメインである DhbE を用いることで、安息香酸および 15 種類の安息香酸一置換体がアデニル化可能となり、hydroxylamine および L-Pro との組み合わせで多様な芳香族カルボン酸アミドの合成に成功した。

以上の検討より、アミノ酸アミドに加えて、D-アミノ酸含有ジペプチド、 $\beta$ -アスパルチルアミド、脂肪酸アミド、芳香族カルボン酸アミドの合成法を開発し、アミド化合物の拡張を達成した。

## 第 4 章 AMP からの ATP 再生系の構築

本章では第 1 章にて挙げたアデニル化酵素を利用したアミド化合物生産プロセスの課題の一つである ATP の効率的な供給法の開発を目的とした。アミド結合形成に伴って ATP は AMP へと分解される。そこで、AMP からの ATP 再生系の構築を検討した。

AMP からの ATP 再生系は ADP からの再生系に比べて報告例が少なく、既報の再生系では AMP から ADP を経て ATP を合成する 2 段階の反応にそれぞれ別の酵素が必要であり<sup>32,33)</sup>、反応系が複雑化することが課題であった。そこで、本研究ではよりシンプルな反応系の構築を目指し、単一酵素で AMP から ATP を合成可能な酵素の探索と ATP 再生系への適用を試みた。



#### 4.1 Class III PPK2 を利用した ATP 再生系

ポリリン酸キナーゼ 2(PPK2)はポリリン酸をリン酸基供与体として AMP あるいは ADP をリン酸化し、それぞれ ADP あるいは ATP を合成する酵素である。近年、PPK2 の系統的解析により既報の PPK2 とは異なり AMP および ADP の両方をリン酸化可能な新規 PPK2 (class III PPK2)が報告された<sup>34)</sup>。この反応特性を利用することで、単一酵素で AMP から ATP を合成可能である。

本節では、class III PPK2 を利用した AMP からの ATP 再生系を構築し、モデル反応として NRPS のアデニル化ドメインを利用したアミノアシルプロリン合成へと適用した(Fig. 4.1)。

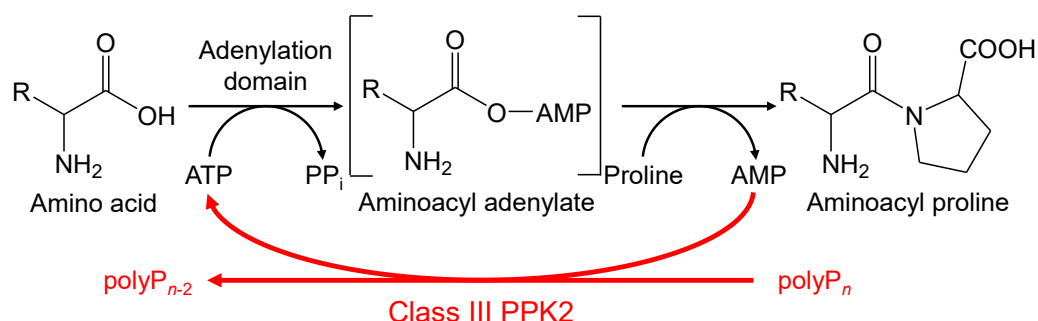


Fig. 4.1. Aminoacyl proline synthesis with the ATP regeneration using class III PPK2.

##### 4.1.1 利用酵素の選定

AMP からの ATP 再生系に利用する class III PPK2 の探索を行った。Class III PPK2 活性が報告されていた *Deinococcus radiodurans* R1 由来の DR\_0132<sup>32)</sup> のアミノ酸配列をクエリーとした BLAST 検索を行った結果、中温菌である *D. proteolyticus* MRP (NBRC 101906<sup>T</sup>) 由来 Deipr\_1912 をアミノ酸の一致率 57% のタンパク質として見出した。Deipr\_1912 をコードする遺伝子をクローニングし、大腸菌にて異種発現させた後、精製を行い以降の活性評価に利用した。

#### 4.1.2 ポリリン酸の活性への影響

##### 実験方法

###### ・ポリリン酸の影響

Deipr\_1912 の AMP を基質とした ATP 合成活性を測定した。Table4.1 に示す反応液を調製し、37°C で 10 min 反応させた。鎖長  $n$  のポリリン酸 polyP $_n$  ( $n = 2, 3, 4, 10-15, 25, 45, 65$ ) を、リン酸基に換算した濃度が 12.5, 25, 50 mM となるように揃えて添加した。

Table 4.1. Reaction mixture for ATP synthetic activity assay of Deipr\_1912

Component	Final concn.
AMP	1 mM
polyP $_n$ ( $n=2, 3, 4, 10-15, 25, 45, 65$ )	12.5, 25, or 50 mM equivalent to Pi
MgSO $_4$	10 or 20 mM
Deipr_1912	0.1 mg/mL
Tris-HCl (pH 8.0)	50 mM
	200 $\mu$ L

###### ・HPLC 分析

HPLC	Chromaster HPLC system (HITACHI)
Column	Inertsil ODS-3 5 $\mu$ m 4.6 $\times$ 150 mm (GL sciences)
Oven	40°C
Eluent	A: 100 mM Na $_2$ HPO $_4$ (pH 6.0)
Wavelength	260 nm

Time (min)	A (%)	Flow rate (mL/min)
0	100	1.0
12.0	100	1.0

## 実験結果

ポリリン酸鎖長については、polyP<sub>4</sub>以上の長さでは ATP 合成活性を示し、polyP<sub>4</sub>が最も活性が高く、続いて polyP<sub>10-15</sub>, polyP<sub>25</sub>, polyP<sub>45</sub>が同程度、polyP<sub>65</sub>では活性が低くなった。また、polyP<sub>3</sub>では ADP の生成のみが確認でき、PPi は反応しなかった (Fig. 4.2A)。ポリリン酸濃度については、ほとんどの種類のポリリン酸でリン酸基換算濃度が 12.5 mM の条件と比較して、25 mM となると 90% 程度、50 mM となると 60% 程度まで活性が低下した (Fig. 4.2A)。しかし、反応液中の Mg<sup>2+</sup>濃度を上昇させることで、活性の低下は改善した (Fig. 4.2)。したがって、高濃度のポリリン酸存在下では補因子である Mg<sup>2+</sup>がキレートされてしまうことで活性が低下したものと考えられる。

以上の結果と、リン酸基換算濃度が同じ条件であればより鎖長の長いポリリン酸の方が転移可能なリン酸基の数が多いことを考慮すると、polyP<sub>25</sub>あるいは polyP<sub>45</sub>がリン酸基供与体として最も適していると考えられる。本研究では、以降 polyP<sub>25</sub>を用いて検討を行うこととした。

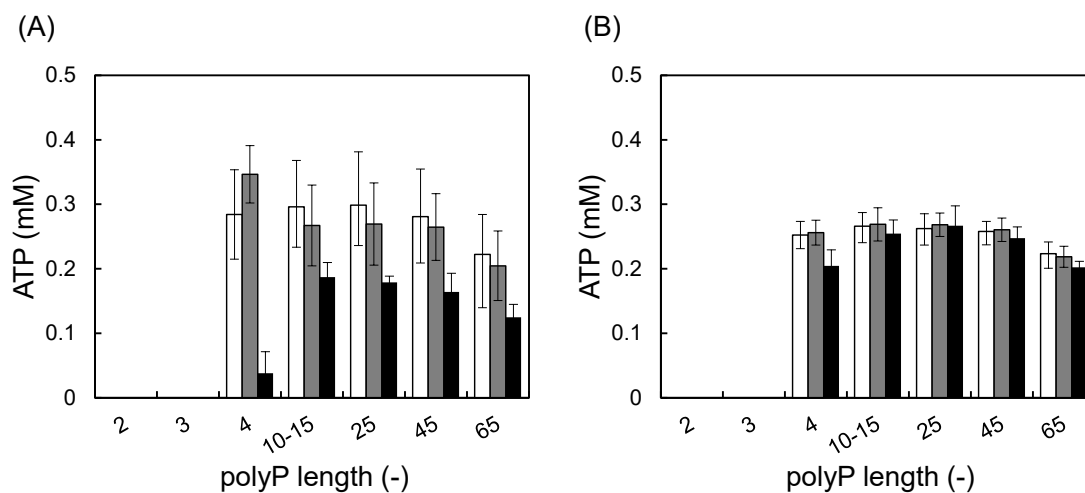


Fig. 4.2. Effects of polyphosphate length and concentration on Deipr\_1912 ATP synthetic activity. Reaction mixtures containing polyP<sub>n</sub> ( $n = 2, 3, 4, 10-15, 25, 45, 65$ ) equivalent in concentration to 12.5 mM (open bars), 25 mM (shaded bars), or 50 mM (closed bars) phosphate were incubated with 10 mM (A) or 20 mM (B) MgSO<sub>4</sub>.

### 4.1.3 アミノアシルプロリン合成への適用

#### 実験方法

##### ・ Deipr\_1912 を共役させた L-Trp-L-Pro 合成

Deipr\_1912 の AMP を基質とした ATP 合成活性が確認できたため、本 ATP 再生系を TycA-A を利用した L-Trp-L-Pro 合成反応へと適用した。Table 4.2 に示す反応液を調製し、37°C で 72 h 反応させた。

Table 4.2. Reaction mixture for L-Trp-L-Pro synthesis coupled with the ATP regeneration using Deipr\_1912

Component	Final concn.
L-Trp	10 mM
L-Pro	100 mM
ATP or AMP	1 mM
MgSO <sub>4</sub>	20 mM
TycA-A	0.2 mg/mL
polyP <sub>25</sub>	0.5 mM
Deipr_1912	0.1 mg/mL
Tris-HCl (pH 8.0)	50 mM
	500 $\mu$ L

##### ・ HPLC 分析

HPLC	Chromaster HPLC system (HITACHI)
Column	XTerra MS C18 2.5 $\mu$ m 4.6 $\times$ 20 mm IS column (Waters)
Oven	40°C
Eluent	A: 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2.4) B: Methanol
Wavelength	214 nm

Time (min)	A (%)	B (%)	Flow rate (mL/min)
0	100	0	2.0
15.0	80	20	2.0
15.1	0	100	2.0
17.0	0	100	2.0
17.1	100	0	2.0
20.0	100	0	2.0

### 実験結果

ATP 再生系を導入していない場合、1 mM の ATP 添加条件では反応開始から 24 h 以降の反応速度が低下し、72 h で 0.58 mM の L-Trp-L-Pro が生成した (Fig. 4.3)。また、1 mM の AMP を添加した条件では ATP が供給されず、L-Trp-L-Pro は全く生成しなかった。しかし、ATP 再生系を導入することで、1 mM の AMP 添加条件でも L-Trp-L-Pro が合成され、72 h における生成量は 1.5 倍 (0.87 mM) に上昇した。これらの結果から、Deipr\_1912 を用いた ATP 再生系が有効に機能していることが明らかとなった。

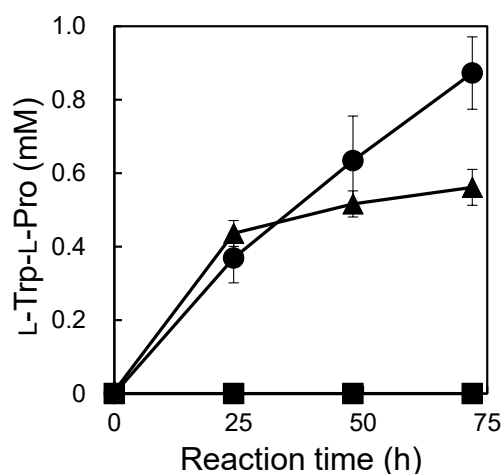


Fig. 4.3. Synthesis of L-Trp-L-Pro by TycA-A coupled with ATP regeneration from AMP using Deipr\_1912. Reaction mixtures containing TycA-A and ATP (triangles), TycA-A and AMP (squares), or TycA-A, AMP, and Deipr\_1912 with polyP25 (circles) were incubated.

しかしながら、反応は依然遅く、合成量も少なかった。原因の一つとして、TycA-Aの反応により遊離するピロリン酸(PPi)がアデニル化反応を阻害している可能性が考えられる。NRPSのAドメインが触媒するアデニル化反応が可逆的であることは良く知られており、過剰量のPPi存在下で逆反応が進行する<sup>33)</sup>。そこで、反応により生成するPPiをピロフォスファターゼ(PPase)により2分子のリン酸へと加水分解することで、逆反応の影響を軽減できるのではないかと考えた(Fig. 4.4)。

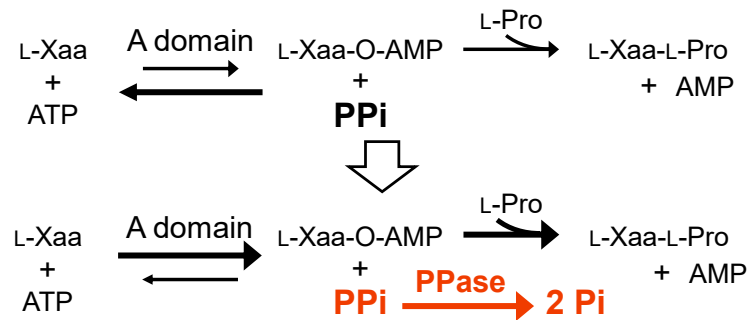


Fig. 4.4. Equilibrium shift toward L-Xaa-L-Pro synthesis by PPase.

#### 4.1.4 ピロフォスファターゼ添加効果

##### 実験方法

- ・ピロフォスファターゼを添加した L-Trp-L-Pro 合成

Table 4.2 の反応液に大腸菌由来の PPase を終濃度  $1\mu\text{g/mL}$  となるよう添加して反応を行った。

- ・ HPLC 分析

4.1.3 と同様

##### 実験結果

PPase 非添加条件と比較して、PPase 添加条件では 12 h までの反応速度が約 14 倍に上昇した (Fig. 4.5)。0.5 mM の polyP<sub>25</sub> をリン酸基供与体として添加した場合には 12 h 以降 L-Trp-L-Pro の合成が停止していることが観察された。これはポリリン酸が枯渇することで ATP が再生できなくなることに起因していると推測し、反応開始時に添加する polyP<sub>25</sub> を 1 mM へ上昇させた。その結果、12 h 以降も L-Trp-L-Pro の合成が継続し、72 h で 6.2 mM (対 L-Trp 収率 62%) の合成に成功した (Fig. 4.5)。

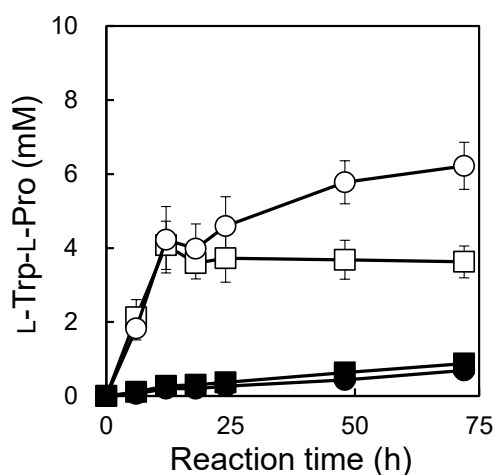


Fig. 4.5. Effects of PPase on L-Trp-L-Pro synthesis with ATP regeneration. Reaction mixtures for L-Trp-L-Pro synthesis containing 0.5 mM (squares) or 1 mM (circles) polyP<sub>25</sub>, with (open symbols) or without (closed symbols) *E. coli* PPase, were incubated.

## 4.2 PPKD を利用した ATP 再生系

Pyruvate phosphate dikinase (PPDK)は、AMP、PPi、ホスホエノールピルビン酸(PEP)から ATP、リン酸、ピルビン酸を生成する反応を触媒する酵素である。この特徴的な反応を利用することで、アデニル化酵素の反応により生成する AMP と PPi に PEP をリン酸基供与体として外部から供給することで、1段階の反応で ATP が再生可能となる。さらに PPi を反応に利用することから前節で問題となったアデニル化の逆反応の影響を軽減できるものと推測した。

本節では、PPDK を利用した AMP からの ATP 再生系を構築し、モデル反応として前節と同様に NRPS のアデニル化ドメインを利用したアミノアシルプロリン合成へと適用した(Fig. 4.6)。

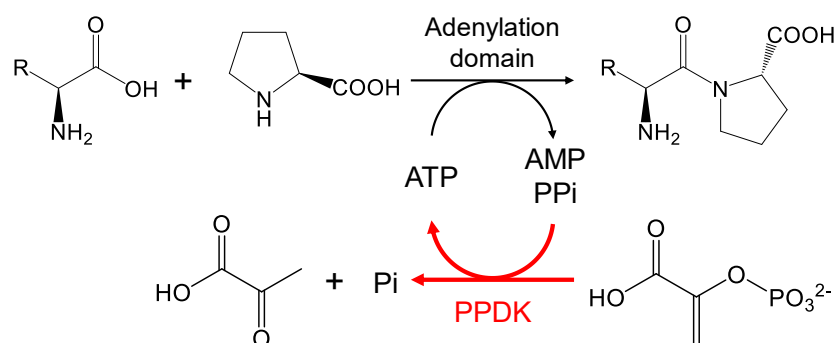


Fig. 4.6. Aminoacyl proline synthesis with ATP regeneration using PPKD.

### 4.2.1 利用酵素の選定

PPDK の反応は可逆的であり、AMP からの ATP 再生系に利用するためには、AMP から ATP を生成する反応を優先的に触媒する PPKD が必要となる。PPDK の特性解析に関する文献情報にあたったところ、*Acetobacter aceti* NCIB 8554 由来の PPKD の  $K_m$  や  $V_{max}$  などの動力学的パラメータの解析結果に着目した<sup>36)</sup>。本報告によれば、AMP に対する  $K_m$  値が ATP に対する  $K_m$  値が極めて小さく、ATP 生成反応に対する  $V_{max}$  値は ATP 消費反応に対する  $V_{max}$  値よりも大きい。すなわち、ATP 生成反応をより好んで触媒する PPKD であると考えられる。そこで、同属種の株である *A. aceti* NBRC 14818<sup>T</sup> 由来の PPKD (AaPPDK) を ATP 再生系の構築に利用する酵素として選定した。



## 4.2.2 活性評価

### 実験方法

#### ・ AaPPDK 活性評価

Table 4.3 に示す反応液組成での ATP 生成反応と、Table 4.4 に示す反応液組成での ATP 消費反応の活性を比較検討することとした。各反応液を調製し、37°C で 120 min 反応させた。

Table 4.3. Reaction mixture for ATP-forming reaction

Component	Final concn.
AMP	1 mM
PPi	1 mM
PEP	1 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
AaPPDK	0.1 mg/mL
Tris-HCl (pH 8.0)	50 mM
	200 μL

Table 4.4. Reaction mixture for ATP-consuming reaction

Component	Final concn.
ATP	1 mM
Pi	1 mM
Pyruvate	1 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
AaPPDK	0.1 mg/mL
Tris-HCl (pH 8.0)	50 mM
	200 μL

#### ・ HPLC 分析

HPLC	LaChrom L-7000 series HPLC system (HITACHI)
Column	Inertsil ODS-3 5μm 4.6 × 150 mm (GL sciences)
Oven	40°C
Eluent	A: 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 6.0)
Wavelength	260 nm

Time (min)	A (%)	Flow rate (mL/min)
0	100	1.0
12.0	100	1.0

## 実験結果

ATP 生成反応 (Fig. 4.7A) では、AMP の消費に伴って ATP が生成し、60 min で 0.56 mM、その後も緩やかに増加して 120 min で 0.62 mM の ATP が合成された。一方で ATP 消費反応 (Fig. 4.7B) では ATP の消費と AMP の生成が観察されたが、AMP の生成速度は遅く、30 min で 0.20 mM に達した後一定となった。これらの結果から、AaPPDK は予測通り ATP 生成反応を優先的に触媒する酵素であることが明らかとなり、AMP からの ATP 再生系へと利用することに決定した。

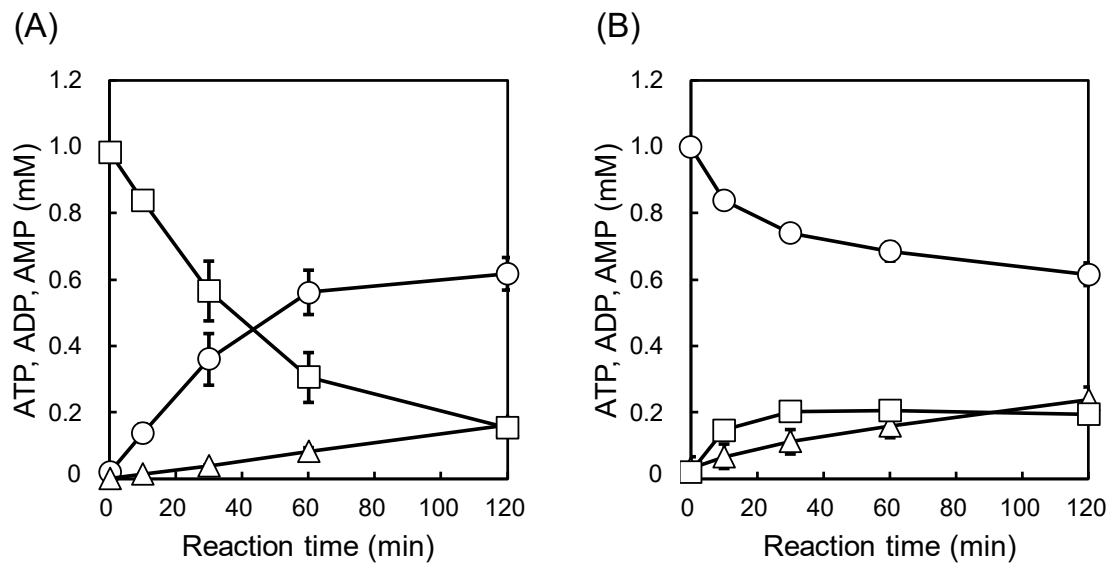


Fig. 4.7. Assay of PPDK activity. (A) ATP-producing reaction using 1 mM AMP, P<sub>i</sub>, and PEP each, as substrates. (B) ATP-consuming reaction using ATP, P<sub>i</sub>, and Pyr as substrates. Symbols: circles, ATP; triangles, ADP; squares, AMP.

### 4.2.3 アミノアシルプロリン合成への適用

#### 実験方法

##### ・ AaPPDK を共役させた L-Trp-L-Pro 合成

AaPPDK を利用した ATP 再生系を TycA-A を利用した L-Trp-L-Pro 合成反応へと適用した。Table 4.5 に示す反応液を調製し、37°C で 72 h 反応させた。ATP 骨格の供給源としては 1 mM の ATP あるいは 1 mM の AMP を反応開始時に添加し、再生系の有無による L-Trp-L-Pro 合成量を比較した。

Table 4.5. Reaction mixture for L-Trp-L-Pro synthesis coupled with the ATP regeneration using AaPPDK

Component	Final concn.
L-Trp	10 mM
L-Pro	100 mM
ATP or AMP + PPi	1 mM
MgSO <sub>4</sub>	20 mM
TycA-A	0.1 mg/mL
PEP	10 mM
AaPPDK	0.1 mg/mL
Tris-HCl (pH 8.0)	50 mM
	500 $\mu$ L

• HPLC 分析

---

HPLC	LaChrom L-7000 series HPLC system (HITACHI)
Column	XTerra MS C18 2.5 $\mu$ m 4.6 $\times$ 20 mm IS column (Waters)
Oven	40°C
Eluent	A: 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2.4) B: Methanol
Wavelength	214 nm

---

---

Time (min)	A (%)	B (%)	Flow rate (mL/min)
0	100	0	2.0
15.0	80	20	2.0
15.1	0	100	2.0
17.0	0	100	2.0
17.1	100	0	2.0
20.0	100	0	2.0

---

## 実験結果

ATP を初期添加した条件(Fig. 4.8A)では、ATP 再生系なしの場合には L-Trp-L-Pro 合成量は 72 h で 0.68 mM であったが、ATP 再生系の導入により 72 h で 2.7 倍となる 1.83 mM へと上昇した。この合成量は初期添加した ATP 濃度を超えており、ATP 再生が有効に機能していることがわかる。また L-Trp-L-Pro の合成速度が上昇していることから、PPi を除去することによりアデニル化反応が阻害されることを抑制する効果も得られているものと考えられる。

AMP を初期添加した条件(Fig. 4.8B)では、ATP 再生系なしの場合には L-Trp-L-Pro は全く合成されないが、ATP 再生系の導入により 72 h で 0.94 mM の L-Trp-L-Pro が合成された。本結果からも AaPPDK を利用した ATP 再生系が有効であることが示された。

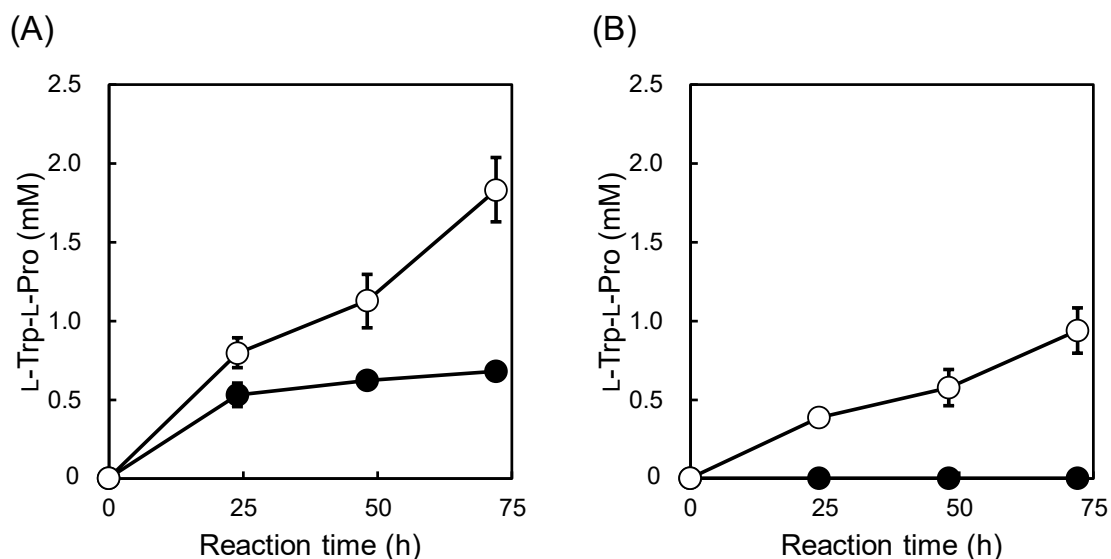


Fig. 4.8. L-Trp-L-Pro synthesis by TycA-A coupled with ATP regeneration from AMP using AaPPDK. Reaction mixtures contained 1 mM ATP (A) or 1 mM AMP and PPi (B) as ATP sources. Symbols: open, with ATP regeneration; closed, without ATP regeneration.

#### 4.2.4 酵素濃度の最適化

##### 実験方法

##### ・ 酵素濃度の最適化

TycA-A と AaPPDK の共役反応による L-Trp-L-Pro 合成における収量増加を目的として酵素濃度の最適化を行った。初めに TycA-A 濃度を 0.1 mg/mL で固定し、AaPPDK 濃度を 0-0.2 mg/mL の範囲で変化させ、L-Trp-L-Pro 合成量の比較により最適 AaPPDK 濃度を決定した。続いて AaPPDK 濃度を最適濃度で固定し、TycA-A 濃度を 0.1-1.0 mg/mL の範囲で変化させ、L-Trp-L-Pro 合成量の比較により最適 TycA-A 濃度を決定した。反応はいずれも 1 mM の ATP を ATP 骨格の供給源とし、37°C で 72 h 行った。

##### ・ 最適酵素濃度での L-Trp-L-Pro 合成

酵素濃度の最適化により決定した TycA-A および AaPPDK 濃度で、L-Trp-L-Pro 合成を行った。ATP 骨格の供給源として 1 mM の ATP あるいは 1 mM の AMP を添加し、37°C で 72 h 反応を行った。

##### ・ HPLC 分析

4.2.3 と同様の方法にて分析を行った。

## 実験結果

### ・酵素濃度の最適化

初めに AaPPDK 濃度の最適化を行った結果、AaPPDK 濃度が 0.01 および 0.05 mg/mL の時に L-Trp-L-Pro 合成量が最大となり、以降 AaPPDK 濃度の上昇に伴い合成量は低下した (Fig. 4.9A)。そこで、AaPPDK 濃度を 0.01 および 0.05 mg/mL に固定して TycA-A 濃度の最適化を行った。その結果、AaPPDK 濃度が 0.01 mg/mL の場合、TycA-A 濃度の上昇により L-Trp-L-Pro 合成量は減少した。一方 AaPPDK 濃度が 0.05 mg/mL の場合、TycA-A 濃度 0.5 mg/mL で L-Trp-L-Pro 合成量が最大となった (Fig. 4.9B)。これらの結果から、最適酵素濃度は TycA-A 濃度 0.5 mg/mL、AaPPDK 濃度 0.05 mg/mL と決定した。

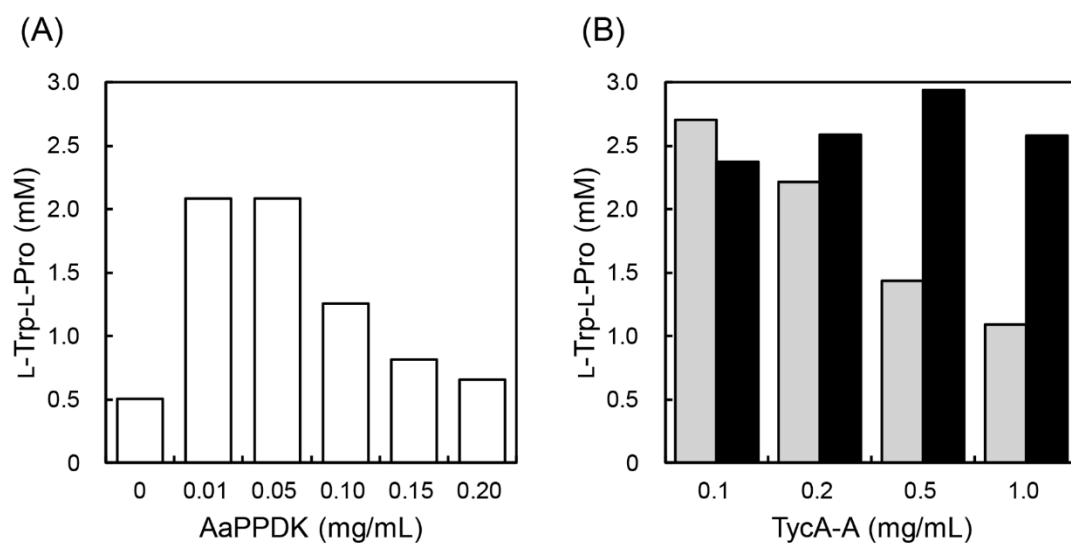


Fig. 4.9. Optimization of enzyme concentrations for L-Trp-L-Pro synthesis. (A) TycA-A concentration was fixed at 0.1 mg/mL and the AaPPDK concentration was in the range of 0–0.2 mg/mL. (B) AaPPDK was fixed at 0.01 mg/mL (gray) or 0.05 mg/mL (black) and TycA-A varied between 0.1–1.0 mg/mL.

・最適酵素濃度での L-Trp-L-Pro 合成

決定した最適酵素濃度にて ATP あるいは AMP を初期添加した反応を行った。1 mM の ATP を添加した条件では、L-Trp-L-Pro 合成量は最適化により 72 h で 1.45 mM から 3.18 mM へ上昇した (Fig. 4.10A)。また、1 mM の AMP を添加した条件では、L-Trp-L-Pro 合成量は最適化により 72 h で 0.72 mM から 2.19 mM へ上昇した (Fig. 4.10B)。いずれの反応系においても最適化の効果により合成量が増加し、初期添加 ATP あるいは AMP 濃度を超える L-Trp-L-Pro が合成された。

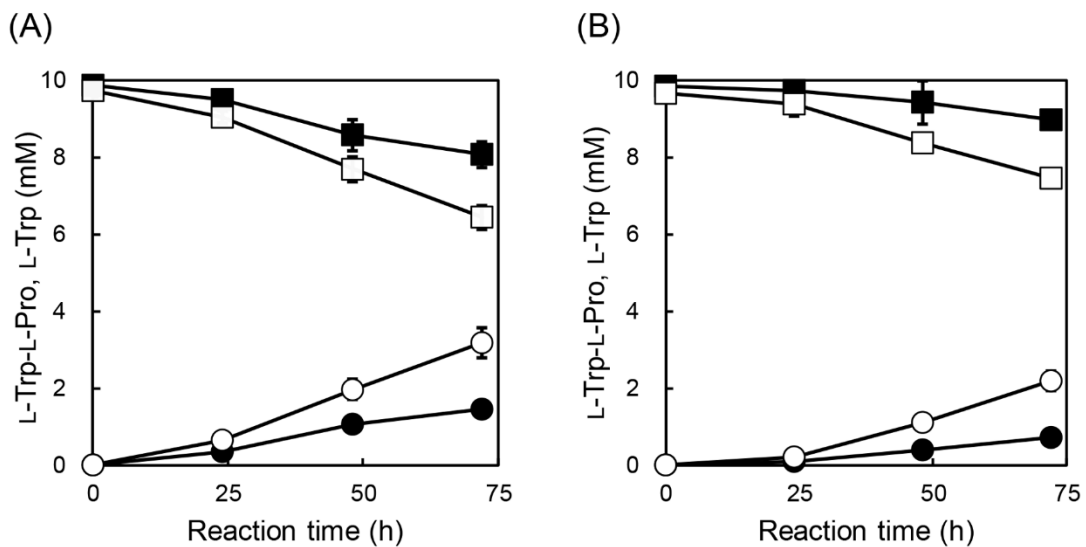


Fig. 4.10. L-Trp-L-Pro synthesis under the optimized conditions. Reaction mixtures contained 1 mM ATP (A) or 1 mM AMP and PPi (B) as ATP sources. Symbols: open, 0.5 mg/mL TycA-A and 0.05 mg/mL AaPPDK (optimized); closed, 0.1 mg/mL TycA-A and 0.1 mg/mL AaPPDK (original); circles, L-Trp-L-Pro; squares, L-Trp.



### 4.3 結言

本章ではアデニル化酵素によるアミド化合物生産プロセスの課題の一つである ATP の供給について、生成する AMP から ATP を合成する ATP 再生系の構築による解決を検討した。一つの酵素で AMP から ATP を合成可能な class III PPK2 と PPDK の二種類の酵素をそれぞれ利用した再生系を構築した。いずれの再生系も TycA-A による L-Trp-L-Pro 合成に対して共役させた際に、本来反応が進行しない AMP を用いた場合にも L-Trp-L-Pro が生成し、その有効性を実証することができた。

また、TycA-A の反応により生成、蓄積するピロリン酸が TycA-A の反応を阻害していることを見出し、これを PPase や PPDK といった酵素の反応特性を利用して除去することで、L-Trp-L-Pro 合成の反応速度および合成量の向上を達成した。

## 第 5 章 総括

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など様々な分野で利用される産業上有用な物質である。本研究ではアミド化合物の新規合成法の開発を目的として検討を行ってきた。

第 1 章では、既存のアミド合成法について有機合成法と酵素合成法とに大別して概説した。有機合成法は適用範囲が広く高収率な手法が多いが、当量の縮合剤や目的物によっては官能基の保護と脱保護の操作が必要である。一方酵素合成法は触媒的な合成法として近年注目されており、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点が課題である。このような背景から、触媒反応であること、環境調和性が高いこと、多様なアミド化合物が合成可能であることの 3 点を満たす手法が期待される。

そこで、本研究ではアデニル化酵素によるカルボキシ基の変換反応に着目し、アデニル化酵素によるカルボキシ基のアデニル化による活性化と、続くアミンの求核置換反応によりアミド結合を形成する新規プロセスを提案した。本プロセスではアミンは酵素の基質特異性の影響を受けにくく、酵素反応でありながら多様なアミド化合物が合成可能となると推測した。しかし、カルボン酸側基質は酵素の特異性の影響を受けること、アデニル化反応に高価な ATP が必要となることが課題として挙げられた。

第 2 章では、ペプチド系抗生物質の生合成に関与する NRPS を構成するドメインであり、基質アミノ酸のアデニル化を触媒する A ドメインに着目し、アミド化合物生産プロセスの実用性を検証した。Tyrocidine synthetase A の A ドメイン(TycA-A)を利用し、その基質となる L-Trp に対して直鎖状アミン、環状アミン、プロリン誘導体など種々のアミンを求核剤として反応させたところ、三級アミンを除くすべてのアミンに対応する L-Trp-N-アルキルアミドが生成した。本結果より、NRPS の A ドメインによりアデニル化されたアミノ酸に

対してアミンを作用させることで、酵素の基質特異性の影響なく化学的な求核置換反応によりアミド結合が形成される新規反応が生じることを実証した。

第 3 章では、第 2 章での結果をさらに展開し、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・利用することで、カルボン酸に対する特異性という課題の解決し、合成可能なアミド化合物の多様化を目指した。第 3 章 1 節では TycA-A が D-Ala, D-Trp, D-Tyr, D-Phe, D-Leu, D-Met の 6 種類の D-アミノ酸を基質とすることを見出すとともに、D-Lys をアデニル化可能な 3 つの新規 A ドメイン (BacB1-A, PbtA1-A, PbtB2-A) を発見した。これら A ドメインを利用することで、多様な組み合わせの D-アミノ酸含有ジペプチドが合成に成功した。第 3 章 2 節ではアスパラギン合成酵素が L-Asp の側鎖カルボキシ基をアデニル化することに着目し、*E. coli* BL21(DE3) 由来のアスパラギン合成酵素 (AsnA) を利用することで直鎖状アミン、環状アミン、アミノ酸などを求核剤とした 9 種類の  $\beta$ -アスパルチルアミドの合成可能であることを示した。第 3 章 3 節では複合脂質の生合成に関与する FAAL である FadD26 が中～長鎖の脂肪酸をアデニル化可能であることを見出し、直鎖状アミン、環状アミン、アミノ酸など 10 種類の求核剤との組み合わせで脂肪酸アミドの合成に成功した。第 3 章 4 節では鉄キレートシデロフォアの生合成に関与する A ドメインである DhbE が安息香酸および 15 種類の安息香酸一置換体を基質とすることを見出し、hydroxylamine および L-Pro との組み合わせで多様な芳香族カルボン酸アミドの合成に成功した。本章での検討により、D-アミノ酸含有ジペプチド、 $\beta$ -アスパルチルアミド、脂肪酸アミド、芳香族カルボン酸アミドの大きく 4 種類のアミド化合物の新規合成法を開発し、アミド化合物の拡張を達成した。

第 4 章ではアデニル化反応に必要な ATP の供給という課題を解決するため、アミド合成反応により生成する AMP から ATP を合成する ATP 再生系の構築を検討した。第 4 章 1 節では安価なポリリン酸をリン酸基供与体として AMP から ADP を経て ATP を合成可能な class III PPK2 に着目した ATP 再生系を検討した。第 4 章 2 節では

PEP をリン酸基供与体として AMP および PPi から ATP を合成可能な PPDK に着目した ATP 再生系を検討した。両再生系ともに TycA-A による L-Trp-L-Pro 合成に対して共役させた際に、本来反応が進行しない AMP を用いた場合にも L-Trp-L-Pro が生成し、その有効性を実証できた。本章での検討により、添加する ATP 量を低減させたプロセスの開発に貢献できたといえる。

本研究では、アデニル化酵素を利用したアミド化合物生産プロセスを開発し(第 2 章)、反応機構の特長を活かしながら合成可能なアミド化合物を拡張した(第 3 章)。さらに、実用的な生産に向けて AMP からの ATP の再生系を構築した(第 4 章)。本プロセスは適切なカルボン酸とアデニル化酵素を利用することで、様々なアミンとの組み合わせでアミド化合物が合成可能となる革新的なプロセスであり、ATP の再生系と組み合わせることでバイオプロセスによるアミド化合物生産に大きく貢献するものと考えている。

## 参考文献

1. **Pattabiraman, V. R. and Bode, J. W.:** Rethinking amide bond synthesis, *Nature*, **480**, 471-479 (2011).
2. **Jursic, B. S. and Zdravkovski, Z.:** A Simple Preparation of Amides from Acids and Amines by Heating of Their Mixture, *Synth. Commu.*, **23**, 2761-2770 (1993).
3. **Montalbetti, C. A. G. N. and Falque, V.:** Amide bond formation and peptide coupling, *Tetrahedron*, **61**, 10827-10852 (2005).
4. **Valeur, E. and Bradley, M.:** Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents, *Chem. Soc. Rev.*, **38**, 606-631 (2009).
5. **Merrifield, R. B.:** Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149-2154 (1963).
6. **Lundberg, H., Tinnis, F., Selander, N., and Adolfsson, H.:** Catalytic amide formation from non-activated carboxylic acids and amines, *Chem. Soc. Rev.*, **43**, 2714-2742 (2014).
7. **Ishihara, K., Ohara, S., and Yamamoto, H.:** 3,4,5-Trifluorobenzeneboronic Acid as an Extremely Active Amidation Catalyst, *J. Org. Chem.*, **61**, 4196-4197 (1996).
8. **Kumar, D. and Bhalla, T. C.:** Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **68**, 726-736 (2005).
9. **Yazawa, K. and Numata, K.:** Recent advances in chemoenzymatic peptide syntheses, *Molecules*, **19**, 13755-13774 (2014).
10. **Alfonso, I. and Gotor, V.:** Biocatalytic and biomimetic aminolysis reactions: useful tools for selective transformations on polyfunctional substrates, *Chem. Soc. Rev.*, **33**, 201-209 (2004).
11. **Arima, J., Usuki, H., Hatanaka, T., and Mori, N.:** One-pot synthesis of diverse DL-configuration dipeptides by a *Streptomyces* D-stereospecific amidohydrolase, *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 8209-8218 (2011).

12. **Tabata, K., Ikeda, H., and Hashimoto, S.:** *ywfE* in *Bacillus subtilis* codes for a novel enzyme, L-amino acid ligase, *J. Bacteriol.*, **187**, 5195-5202 (2005).
13. **Arai, T., Arimura, Y., Ishikura, S., and Kino, K.:** L-Amino acid ligase from *Pseudomonas syringae* producing tabtoxin can be used for enzymatic synthesis of various functional peptides, *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 5023-5029 (2013).
14. **Sato, M., Kirimura, K., and Kino, K.:** D-Amino acid dipeptide production utilizing D-alanine-D-alanine ligases with novel substrate specificity, *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 623-628 (2005).
15. **Sieber, S. A. and Marahiel, M. A.:** Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics, *Chem. Rev.*, **105**, 715-738 (2005).
16. **Dieckmann, R., Neuhof, T., Pavela-Vrancic, M., and von Döhren, H.:** Dipeptide synthesis by an isolated adenylate-forming domain of non-ribosomal peptide synthetases (NRPS), *FEBS Lett.*, **498**, 42-45 (2001).
17. **Hara, R., Suzuki, R., and Kino, K.:** Hydroxamate-based colorimetric assay to assess amide bond formation by adenylation domain of nonribosomal peptide synthetases, *Anal. Biochem.*, **477**, 89-91 (2015).
18. **Deigin, V. I., Semenets, T. N., Zamulaeva, I. A., Maliutina, Y. V., Selivanova, E. I., Saenko, A. S., and Semina, O. V.:** The effects of the EW dipeptide optical and chemical isomers on the CFU-S population in intact and irradiated mice, *Int. Immunopharmacol.*, **7**, 375-382 (2007).
19. **Nishanth Kumar, S., Dileep, C., Mohandas, C., Nambisan, B., and Ca, J.:** Cyclo(D-Tyr-D-Phe): a new antibacterial, anticancer, and antioxidant cyclic dipeptide from *Bacillus* sp. N strain associated with a rhabditid entomopathogenic nematode, *J. Pept. Sci.*, **20**, 173-185 (2014).

20. **Jamie, H., Kilian, G., Dyason, K., and Milne, P. J.:** The effect of the isomers of cyclo(Trp-Pro) on heart and ion-channel activity, *J. Pharm. Pharmacol.*, **54**, 1659-1665 (2002).
21. **Luo, L., Kohli, R. M., Onishi, M., Linne, U., Marahiel, M. A., and Walsh, C. T.:** Timing of epimerization and condensation reactions in nonribosomal peptide assembly lines: kinetic analysis of phenylalanine activating elongation modules of tyrocidine synthetase B, *Biochemistry*, **41**, 9184-9196 (2002).
22. **Mootz, H. D. and Marahiel, M. A.:** The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains, *J. Bacteriol.*, **179**, 6843-6850 (1997).
23. **Fewer, D. P., Osterholm, J., Rouhiainen, L., Jokela, J., Wahlsten, M., and Sivonen, K.:** Nostophycin biosynthesis is directed by a hybrid polyketide synthase-nonribosomal peptide synthetase in the toxic cyanobacterium *Nostoc* sp. strain 152, *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 8034-8040 (2011).
24. **Konz, D., Klens, A., Schorgendorfer, K., and Marahiel, M. A.:** The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases, *Chem. Biol.*, **4**, 927-937 (1997).
25. **Huang, E., Guo, Y., and Yousef, A. E.:** Biosynthesis of the new broad-spectrum lipopeptide antibiotic paenibacterin in *Paenibacillus thiaminolyticus* OSY-SE, *Res. Microbiol.*, **165**, 243-251 (2014).
26. **Hoffman, H. E., Jiraskova, J., Cigler, P., Sanda, M., Schraml, J., and Konvalinka, J.:** Hydroxamic acids as a novel family of serine racemase inhibitors: mechanistic analysis reveals different modes of interaction with the pyridoxal-5'-phosphate cofactor, *J. Med. Chem.*, **52**, 6032-6041 (2009).
27. **Kolobov, A. A., and Simbirtsev, A. S.:**  $\gamma$ -Glutamyl and  $\beta$ -aspartyl

- containing immunomodulator compounds and methods therewith, U.S. Patent 5,916,878, 1999-06-29.
28. **Cedar, H. and Schwartz, J. H.:** The asparagine synthetase of *Escherichia coli*. I. Biosynthetic role of the enzyme, purification, and characterization of the reaction products, *J. Biol. Chem.*, **244**, 4112-4121 (1969).
  29. **Trivedi, O. A., Arora, P., Sridharan, V., Tickoo, R., Mohanty, D., and Gokhale, R. S.:** Enzymic activation and transfer of fatty acids as acyl-adenylates in mycobacteria, *Nature*, **428**, 441-445 (2004).
  30. **May, J. J., Wendrich, T. M., and Marahiel, M. A.:** The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin, *J. Biol. Chem.*, **276**, 7209-7217 (2001).
  31. **Luke, R. K. J. and Gibson, F.:** Location of three genes concerned with the conversion of 2, 3-dihydroxybenzoate into enterochelin in *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.*, **107**, 557-562 (1971).
  32. **Resnick, S. M. and Zehnder, A. J. B.:** In vitro ATP regeneration from polyphosphate and AMP by polyphosphate:AMP phosphotransferase and adenylate kinase from *Acinetobacter johnsonii* 210A, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 2045-2051 (2000).
  33. **Kameda, A., Shiba, T., Kawazoe, Y., Satoh, Y., Ihara, Y., Munekata, M., Ishige, K., and Noguchi, T.:** A novel ATP regeneration system using polyphosphate-AMP phosphotransferase and polyphosphate kinase, *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 557-563 (2001).
  34. **Motomura, K., Hirota, R., Okada, M., Ikeda, T., Ishida, T., and Kuroda, A.:** A new subfamily of polyphosphate kinase 2 (class III PPK2) catalyzes both nucleoside monophosphate phosphorylation and nucleoside diphosphate phosphorylation, *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 2602-2608 (2014).
  35. **Stulberg, M. P. and Novelli, G. D.:** Amino acid-activating enzymes: Methods of assay, pp. 703-707, in: Colowick, S. and



Nathan, K. (Ed.), *Methods Enzymol.*, vol. 5. Academic Press, New York (1962).

36. **Schwitzguebel, J. P. and Ettliger, L.:** Pyruvate, orthophosphate dikinase from *Acetobacter aceti*, *Arch. Microbiol.*, **122**, 103-108 (1979).

## 謝辞

本博士論文は、早稲田大学先進理工学部の木野邦器教授のご指導の下、研究成果をまとめたものです。終始暖かいご指導と激励を賜りました木野教授に、心より感謝申し上げます。また、論文審査にあたり、ご助言・ご助力いただきました早稲田大学先進理工学部の桐村光太郎教授と同小柳津研一教授に感謝申し上げます。

研究遂行にあたりご助力いただきました早稲田大学理工学総合研究所次席研究員の原良太郎博士(現・京都大学大学院農学研究科特定准教授)に感謝申し上げます。また、本研究にご協力いただいた早稲田大学木野邦器研究室の卒業生および在学生の、鈴木亮平さん、平井健吾さん、賀野壮一朗さん、宇留野樹生さん、佐々木楓さんに感謝申し上げます。

鈴木 伸

## 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> , <b>125</b> , 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 adenyating enzyme-mediated mechanism” <i>Scientific Reports</i> , <b>8</b> :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> , <b>2</b> , 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> , <b>85</b> :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 <sup>th</sup> 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