

博士論文審査報告書

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

2019年7月

アミド化合物は化成品や医薬品などに利用される産業上重要な化合物群であるが、これらを構成するアミド結合(-CO-NH-)の形成反応には多くの課題がある。アミド化合物合成のメイン反応として利用されている有機合成法は、当量の縮合剤や副反応を抑制するために官能基の保護・脱保護が必要であり、煩雑である。また、近年触媒的な合成法の一つとして注目されている酵素法は、温和な反応条件や廃棄物が少ないという利点はあるが、厳密な基質特異性により合成可能な化合物が限定されている。本博士論文は、これら既存の合成法が抱える課題の解決を目的として、アデニル化酵素による基質のカルボキシ基のアデニル化反応とアミンによる化学的な求核置換反応を組み合わせた新規アミド結合形成反応の開発に関する成果をまとめている。

第1章では、研究背景としてアミド化合物の有用性および合成法について述べている。既存の合成技術をまとめることでアデニル化酵素を利用したアミド結合形成反応の位置づけを明確にし、本研究の目的と意義を示している。

第2章では、L-アミノ酸のアデニル化反応を触媒する非リボソーム型ペプチド合成酵素(NRPS)のアデニル化ドメイン(Aドメイン)を用いて反応の可否を検証している。Aドメインの基質となるL-アミノ酸と種々のアミンを反応させると、ほぼすべての組み合わせで対応するL-アミノ酸アミドが生成することを見出した。Aドメインの作用で基質アミノ酸がアデニル化により活性化されれば、アミン側は酵素の基質特異性の影響を受けずに化学的な求核置換反応により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。本反応では、アデニル化の対象となるL-アミノ酸はAドメインの基質特異性に依存するが、求核剤となるアミンはその制限を受けないため、多様なL-アミノ酸アミドを合成可能である。これは酵素法の課題を克服する重要な知見であり、高く評価できる。

第3章では、合成可能なアミド化合物の拡張を目的として、様々な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、有用な生理活性や物性が期待されるアミド化合物の合成を試みている。NRPSにおけるD-アミノ酸導入の機構に着目することでL-アミノ酸のみならずD-アミノ酸も基質とするAドメインを見出し、D-アミノ酸を含有する多様なジペプチドの合成に成功している。さらに、アミノ酸側鎖のカルボキシ基のアミド化という観点からはL-AspをL-Asnに変換するアスパラギン合成酵素による β -アスパルチルアミド合成、アミノ酸以外のカルボン酸のアミド化の観点からは複合脂質の生合成に関与しNRPSのAドメインと類似の機構で脂肪酸をアデニル化するfatty acyl-AMP ligaseによる脂肪酸アミド合成、および鉄キレートシデロフォアの合成に関与し芳香族カルボン酸を基質とするAドメインによる芳香族カルボン酸アミドの合成にも成功している。これらの成果は、第2章にて得られた結果を大きく展開し、本アミド結合形成反応がアデニル化酵素全般に適用可能であることを示した学術的にも工業的にも意義深いものである。

第4章では、アデニル化反応のエネルギー源であるアデノシン三リン酸

(ATP)の効率的供給を目的として、反応により生成するアデノシン一リン酸 (AMP)からの ATP 再生系の構築について検討されている。従来技術では AMP からの ATP 再生には複数酵素が必要であったが、本研究では class III polyphosphate kinase 2 や pyruvate phosphate dikinase を利用することで単一酵素による ATP 再生系を構築しており、それぞれを NRPS の A ドメインによる L-Trp-L-Pro 合成に適用した結果、AMP を初発基質とした合成に成功している。また、アデニル化反応の進行に伴って生成・蓄積するピロリン酸がアデニル化反応を阻害していることを見出し、これを酵素的に除去することで反応速度や収率が顕著に上昇することを明らかにしている。これらの成果は、アデニル化酵素を利用したアミド化合物生産の実用化に向けて、コスト削減および収量向上に貢献する重要な知見であり、高く評価できる。

第5章では、本研究で得られた成果を総括している。多様なアミド化合物を触媒的に合成可能なアデニル化酵素の有用性や AMP からの ATP 再生系の導入による効率的なアミド化合物生産、これら技術を利用したバイオプロセスの今後の展望についてまとめている。

以上のように、本論文はアデニル化酵素を利用したアミド結合形成反応の開発とその反応メカニズムの解明、さらに ATP 再生系の構築によるアミド化合物の効率的生産に成功した成果をまとめている。アミド結合形成に関する学術上の知見のみならず、産業上有用なアミド化合物の生産に向けた工学的な知見としても重要であり、高く評価できる。

よって、本論文を博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。

2019年7月

審査員

(主査)早稲田大学教授	工学博士(早稲田大学)	木野 邦器
早稲田大学教授	工学博士(早稲田大学)	桐村 光太郎
早稲田大学教授	博士(工学)早稲田大学	小柳津 研一

審査員署名

(主査)早稲田大学教授	木野 邦器	_____
早稲田大学教授	桐村 光太郎	_____
早稲田大学教授	小柳津 研一	_____