

平成 30 年 6 月 10 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14495

研究課題名(和文)新規アミド結合反応の開発とペプチド性機能分子の創出

研究課題名(英文)Development of novel reactions for amide bond formation and creation of peptide-like functional materials

研究代表者

木野 邦器(Kino, Kuniki)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：60318764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：アミド化合物には生体分子や化成品など有用物質が多く、バイオプロセスによる効率的な合成法の開発が望まれている。研究代表者はカルボキシ基の酵素的アデニル化とアミンの求核置換反応によるアミド化合物合成法を開発している。本研究では本手法を拡張して合成可能なアミド化合物の多様化を検討した。Fatty acyl-AMP ligaseによる脂肪酸アミド合成法、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による芳香族カルボン酸アミド及びD-アミノ酸含有ジペプチドの合成法を開発した。また、ポリリン酸キナーゼを利用した単一酵素によるAMPからのATP再生系を構築し、アミド合成プロセスの低コスト化を達成した。

研究成果の概要(英文)：Amide compounds are useful materials as bio-functional molecules and chemicals. We have developed a unique method for amino acid amide synthesis using adenylation domain (A-domain) of nonribosomal peptide synthetase. In this method, A-domain adenylates carboxy group of amino acid and followed by nucleophilic acyl substitution reaction with amine. In this research, novel methods of synthesizing various amide compounds using adenylation enzymes were developed. Fatty acid amides were synthesized by a fatty acyl-AMP ligase which can adenylate various length of fatty acids. Aryl carboxylic acid amides were synthesized by DhbE which can adenylate benzoic acid and 14 kinds of monosubstituted benzoic acids. D-Amino acid-containing dipeptides were synthesized by A-domain (TycA-A) which can adenylate some D-amino acids. On the other hand, the ATP regeneration system from AMP was developed using class III polyphosphate kinase 2 and was coupled with L-Trp-L-Pro synthesis using TycA-A.

研究分野：応用生物化学

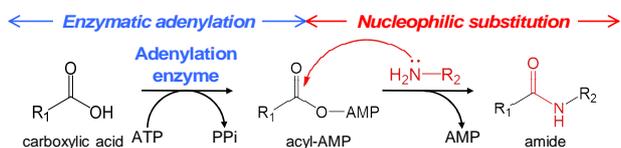
キーワード：アミド化合物 アミド結合形成反応 ペプチド アデニル化酵素 求核置換反応 ポリリン酸キナーゼ  
D-アミノ酸 バイオプロセス

### 1. 研究開始当初の背景

アミド結合を有する化合物には、タンパク質やペプチドといった生体分子、医薬品や機能性ポリマー原料のような化成品など有用物質が多く、工業的にも重要である。これらアミド化合物は主に化学合成法により生産されているが、工程が複雑で多量の縮合剤を必要とするなど課題が多い。研究代表者らは現在までにペプチド性抗生物質の合成に関与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)を利用することで、アミノ酸のカルボキシ基を活性化し、それに対してアミン類を作用させることで対応する多種多様なアミド化合物を合成することに成功している。本反応機構を踏まえ、アミノ酸に限らず基質のカルボキシ基をアデニル化により活性化することができればアミノ酸アミドに限定されない幅広いアミド化合物が合成可能になると推測している。本手法を基盤とした酵素的アミド合成法の開発および多様な機能性アミド化合物の創製に大きな期待が寄せられている。

### 2. 研究の目的

NRPSのAドメインや同様に基質のカルボキシ基



をアデニル化可能な酵素(アデニル化酵素)を利用し、合成可能なアミド化合物の多様化を目指す。L-アミノ酸以外のカルボン酸を基質とする酵素の探索を行うことで、新規アミド合成プロセスを開発する(図1)。また、アデニル化酵素によるアミド化合物生産において課題となるATPの供給に関して、反応により生成するAMPからの再生系を検討する。

図1 アデニル化酵素を利用したアミド合成

### 3. 研究の方法

#### (1) アデニル化酵素の探索とアミド合成

文献情報やデータベース検索を利用し、L-アミノ酸以外のカルボン酸を基質とするアデニル化酵素を探索する。具体的には以下の3種類のカルボン酸をターゲットとした。

**脂肪酸:** *Mycobacterium* 属細菌の複合脂質合成においては、脂肪酸をアデニル化する fatty acyl-AMP ligase (FAAL)とポリケチド合成酵素(PKS)が関与していることが知られている。FAALとPKSによる反応はNRPSの反応と機構が類似しており、FAALはNRPSのAドメインと役割が類似している。そこで、FAALを利用した脂肪酸アミド合成を検討する。

**芳香族カルボン酸:** NRPSのAドメインは一般的にL-アミノ酸を基質とするが、芳香族カルボン酸を基質とするAドメインの報告もある。このような種類のAドメインを利用した芳香族カルボン酸アミドの合成を検討する。

**D-アミノ酸:** L-アミノ酸だけではなくD-アミノ酸も基質とするAドメインを探索・利用し、D-アミノ

酸を含有したジペプチドの合成を検討する。

#### (2) AMPからのATP再生系の構築

単一酵素でAMPからADPを経由してATPを合成可能なポリリン酸キナーゼ(class III PPK2)を利用した再生系の構築を検討する。さらに、これをNRPSのAドメインを利用した機能性ジペプチド合成に適用した生産プロセスを開発する。

### 4. 研究成果

#### (1) 脂肪酸アミド合成

*Mycobacterium tuberculosis* において複合脂質の合成に関与するFAALがデカン酸などの脂肪酸を基質としてアデニル化反応を触媒するという報告をもとに、データベース検索によるホモログ酵素の探索を行った。その結果、*M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155由来のFAALであるFadD26を見出した。

FadD26がどのような脂肪酸をアデニル化可能か、ヒドロキシルアミンとの反応によるヒドロキサム酸の生成を指標とした比色分析により基質特異性評価を行った。その結果、FadD26は炭素数が6~12の中長鎖の脂肪酸、オレイン酸やリノレン酸といった不飽和脂肪酸など、幅広い脂肪酸を基質とすることを明らかにした(図2)。

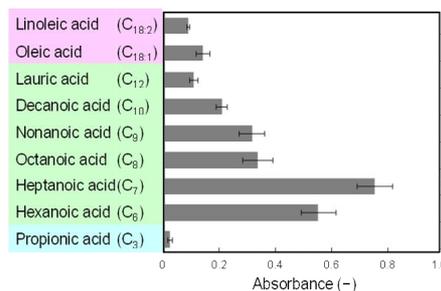


図2 FadD26の基質特異性評価

続いて、FadD26を利用したアミド化合物合成を検討した。比色分析において特に活性が高かった炭素数6~10の5種類の脂肪酸を基質として、求核剤はL-体およびD-体のプロリン、線状アミン、環状アミンなど計10種類を用いて反応を行った。

その結果、図3に示す脂肪酸と求核性の組み合わせにおいて対応する脂肪酸アミドが生成した。予測通り、FadD26による脂肪酸のアデニル化とアミンによる求核置換反応によって多様な脂肪酸アミドの合成が可能であることを示した。

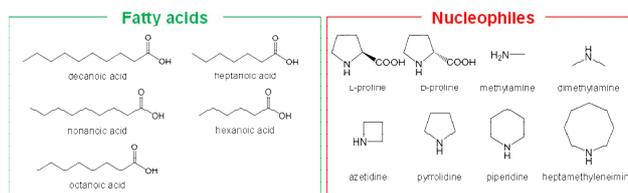


図3 FadD26による脂肪酸アミド合成

#### (2) 芳香族カルボン酸アミド合成

*Bacillus subtilis* 168が産生する鉄キレートシクロフォア bacilibactinはNRPSにより合成されるこ

とが知られており、その構造中には芳香族カルボン酸である2,3-ジヒドロキシ安息香酸(2,3-DHB)が含まれている。2,3-DHBの導入はAドメインであるDhbEにより行われることから、本酵素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、検討を行った。

DhbE がどのような芳香族カルボン酸をアデニル化可能か、ヒドロキシルアミンとの反応によるヒドロキサム酸の生成を指標とした比色分析により基質特異性評価を行った。最も単純な芳香族カルボン酸である安息香酸および7種類の置換基(R=OH, NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, Cl, F, CH<sub>3</sub>, COOH)で異なる位置(*o*-, *m*-, *p*-位)が置換された安息香酸一置換体(*o*-OH: サリチル酸を除く)の計21種類の基質に対して試験を行った。

その結果、安息香酸および、アミノ基、フルオロ基、メチル基での *o*-, *m*-, *p*-位置置換体、ヒドロキシ基での *m*-, *p*-位置置換体、ニトロ基、クロロ基、カルボキシ基での *m*-位置置換体の15種類の芳香族カルボン酸が基質となることを明らかにした(図4)。

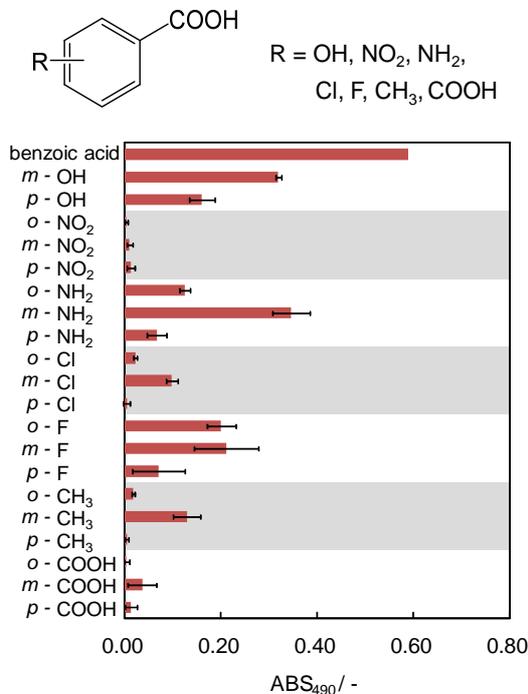


図4 DhbEの基質特異性評価

続いて、DhbEを利用したアミド化合物合成を検討した。比色分析にて基質となると判明した15種類の芳香族カルボン酸とサリチル酸を基質、ヒドロキシルアミンおよびL-プロリンを求核剤として反応を行った。その結果、ヒドロキシルアミンとの反応では16種類全て、L-プロリンとの反応では12種類で目的とする芳香族カルボン酸アミドが生成した。DhbEにより多種類の芳香族カルボン酸がアデニル化可能であり、アミンと反応させることで対応する多様なアミド化合物が合成可能であることを示すことができた。

### (3) D-アミノ酸含有ジペプチド合成

研究代表者らはこれまでに、*Brevibacillus parabrevis* IAM 1031 が有する tyrocidine 合成 NRPS の A ドメインの一つである TycA-A が本来の基質である L-Phe に加えて5種類のアミノ酸(L-Trp, L-Tyr, L-Met, L-Leu, L-Val)も基質とすることを見出していた。更なる基質特異性検討の結果、これら6種類のアミノ酸のD-体も基質とすることを見出した。そこで、この特性に着目し、D-アミノ酸(D-Xaa)を構造中に含むジペプチドの合成を検討した。

まず、TycA-Aの基質となる6種類のD-Xaaと求核剤としてD-Proを反応させたところ、すべての組み合わせでD-Xaa-D-Proが生成した。これら6種類のD-XaaがジペプチドのN末端に導入可能であることを示した。続いて、ジペプチドのC末端に導入可能なD-Xaaの検討のため、TycA-Aの基質をD-Trpに固定し、求核剤としてタンパク質構成性アミノ酸の19種類のD-アミノ酸を反応させた。その結果、TycA-Aの基質となるD-Xaaを使用した場合にはN末端にD-Xaaを配するジペプチドも副生したが、すべての組み合わせで求核剤に対応したD-Trp-D-Xaaが生成した。アデニル化酵素によるアミド合成反応の特徴を反映し、C末端には任意のD-Xaaが導入可能であることを明らかにした。

TycA-Aでの検討結果から、TycA-Aとは異なるD-Xaaをアデニル化可能なAドメインを利用することで、任意のキラリティを持った多様なジペプチドが合成可能であると推測し、D-アミノ酸を基質とする新規Aドメインの探索を行った。

その結果、*Bacillus licheniformis* NBRC 12199 が有する bacitracin 合成 NRPS の A ドメインの一つである BacB2-A が L-Lys と D-Lys の両方を基質とすることを見出した。そこで BacB2-A を利用して D-Lys と D-Pro の組み合わせで反応を行ったところ、D-Lys-D-Pro が生成した。予想通り合成可能な D-アミノ酸含有ジペプチドの拡張に成功した。

### (4) ATP 再生系の構築とジペプチド合成への適用

アデニル化酵素を利用したアミド化合物合成には等モルのATPが必要であり、工業的プロセスにはその供給が重要である。アミド合成反応により生成するAMPから安価なポリリン酸を用いてATPを合成可能なポリリン酸キナーゼ(class III PPK2)に着目し、ATP再生系の構築を検討した(図5)。

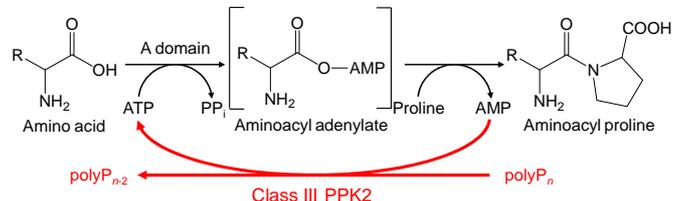


図5 Class III PPK2によるATP再生系

Class III PPK2に関する文献情報をもとにデータベース検索を行い、*Deinococcus proteolyticus* NBRC 101906<sup>T</sup> 由来の Deipr\_1912 を見出した。Deipr\_1912 は AMP とポリリン酸を原料とした

ATP 合成試験において、ADP を経由して ATP を生成し、class III PPK2 の活性を示した。

NRPS の A ドメインの一つである TycA-A を用いた L-Trp と L-Pro を基質とする L-Trp-L-Pro の合成反応において、ATP 合成活性を確認済の Deipr\_1912 を ATP 再生系として利用した。

AMP を初発基質とした場合には本来 L-Trp-L-Pro 合成反応は進行しないが、ATP 再生系の共役により L-Trp-L-Pro の生成を確認することができた。しかし、反応速度が遅く低収量であった。この原因として、アデニル化反応により副生・蓄積するピロリン酸がアデニル化反応を阻害していると考えた。そこで、ピロリン酸分解酵素である大腸菌由来のピロフォスファターゼ(PPase)を反応系に添加したところ、予想通り、反応初期において反応速度が 14 倍に大幅に向上した。さらに添加するポリリン酸濃度を最適化することで、72 h で最大 6.2 mM の L-Trp-L-Pro を合成することに成功した(図 6)。

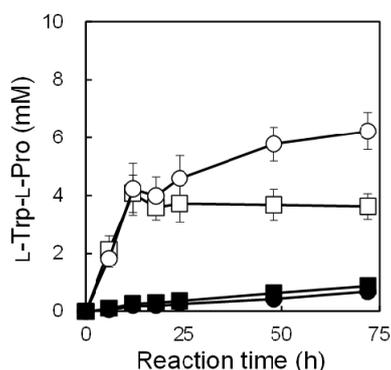


図 6 ピロフォスファターゼの添加効果  
白：PPase あり、黒：PPase なし  
丸：ポリリン酸最適化後、四角：最適化前

酵素反応系において PPase の添加効果を確認したため、大腸菌を利用した菌体反応では宿主由来の PPase が作用することで、外部からの添加と同様に反応速度が向上すると予測した。L-Trp-L-Pro をはじめとする L-Xaa-L-Pro の分解酵素遺伝子 *pepQ* および L-Pro の分解酵素遺伝子 *putA* を欠損させた大腸菌にて TycA-A および Deipr\_1912 をそれぞれ発現させ、L-Trp-L-Pro の生産を行った。その結果、菌体反応においても AMP を初発基質とした場合に L-Trp-L-Pro の生成を確認することができた。生産量は初期添加した AMP 濃度に依存していたが、再生系を共役させずに同濃度の ATP を用いた場合よりも増加していた。10 mM の AMP が必要であるが 24 h で 6.7 mM の L-Trp-L-Pro 生産を達成することに成功した(図 7)。

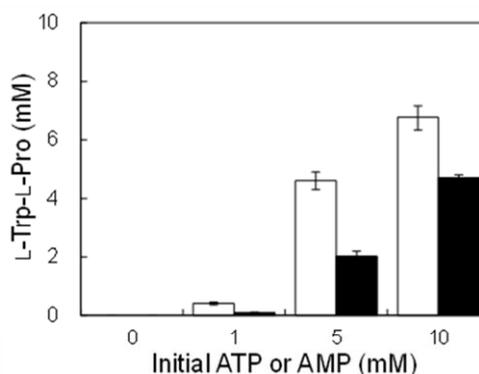


図 7 菌体反応による L-Trp-L-Pro 生産  
白：ATP 再生系あり・AMP 添加、  
黒：ATP 再生系なし・ATP 添加

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Ryotaro Hara, Kengo Hirai, Shin Suzuki, and Kuniki Kino, A chemoenzymatic process for amide bond formation by an adenylating enzyme-mediated mechanism, *Scientific Reports*, 査読有, Vol. 8, 2950, 2018, 1-8. DOI: 10.1038/s41598-018-21408-8

Shin Suzuki, Ryotaro Hara, and Kuniki Kino, Production of aminoacyl prolines using the adenylation domain of nonribosomal peptide synthetase with class III polyphosphate kinase 2-mediated ATP regeneration, *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有, Vol.125, No.6, 2018, 644-648. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2017.12.023

木野邦器, 木野はるか, 解説: L-アミノ酸リガーゼを利用した塩味増強効果を発揮するジペプチドの探索とその効率的な合成法, 査読有, *化学と生物*, Vol.55, No.3, 2017, 182-188. DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.55.182

Haruka Kino, Shota Nakajima, Toshinobu Arai and Kuniki Kino, Effective production of Pro-Gly by mutagenesis of L-amino acid ligase, *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有, Vol.122, No.2, 2016, 155-159. DOI: 10.1006/j.jbiosc.2016.01.014

木野邦器, 特集ペプチド化学の最前線: ペプチド合成酵素の探索とオリゴペプチド合成法の開発, *化学工業*, 査読有, Vol. 67, No.10, 2016, 40-47.

木野邦器, 大村智 ノーベル生理学・医学賞受賞記念特集: 微生物由来天然物の実用化と未来, 微生物の多様性に学ぶ酵素探索と利用, *日本生物工学会誌*, 査読有, Vol.94, No.7, 2016, 395-398. [https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9407/9407\\_tokushu-1\\_5\(1\).pdf](https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9407/9407_tokushu-1_5(1).pdf)

木野邦器, 木野はるか, 解説(査読有) 解説: L-アミノ酸リガーゼを利用したジペプチドライブラリーの構築と塩味増強効果を有するジペプチドの探索, *日本醸造協会誌*, 査読有, Vol.111, No.2, 2016, 79-85. <http://www.jozo.or.jp/newsttopics/>

〔学会発表〕(計 15 件)

鈴木伸, 宇留野樹生, 木野邦器, アスパラギン酸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(名古屋) 2018.3.16.

佐々木楓, 鈴木伸, 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(名古屋) 2018.3.16.

木野邦器, 招待講演: 有用物質生産に向けた酵素の探索と利用研究、そして展望, 日本生物工学会第 24 回九州支部沖縄大会, 琉球大学, 2017.12.9.

鈴木伸, 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, 日本生物工学会 2017 年度大会, 2P-G039, 要旨集: p.124, 早稲田大学(東京) 2017.9.12.

賀野壮一朗, 鈴木伸, 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, 日本生物工学会 2017 年度大会, 2P-G038, 要旨集: p.123, 早稲田大学(東京) 2017.9.12.

木野邦器, 招待講演: グリーンバイオを推進する酵素探索と機能開発, 2016 年度グリーンバイオイノベーションフォーラム設立記念シンポジウム基調講演, JBA 主催 東京大学農学部中島記念ホール(東京), 2016.7.20.

Shin Suzuki, 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), Budapest, Hungary, 9-13 July 2017.

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 年度大会講演要旨集 2C26p10, 京都女子大学(京都) 2017.3.18.

駒林卓磨, 橋田紋佳, 紫牟田ひな子, 木野邦器, 酵素法によるイミダゾールジペプチドの生産, 日本農芸化学会 2017 年度大会講演要旨集 2C26p08, 京都女子大学(京都) 2017.3.18.

木野邦器, 招待講演: 有用微生物酵素の探索と物質生産プロセスへの展開, 日本農芸化学会 2017 年度大会シンポジウム, 講演要旨集 2SY05-4\_C22, 京都女子大学(京都) 2017.3.18.

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, 日本化学会第 6 回 CSJ フェスタ, 講演要旨集 P5-097, タワーホール船堀(東京), 2016.11.16.

木野邦器, 招待講演: 微生物・遺伝子探索・培養技術の最新動向とその展開: Fundamental Source of Ideas on Japanese Microbial Production: Screening technology innovation for novel microbes and genes, BioJapan2016, パシフィコ横浜(横浜), 2016.10.14.

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 回酵素工学会研究会, 講演要旨集 p64, B-14, 東大山上会館(東京), 2016.10.7.

平井健吾, 原良太郎, 木野邦器, Fatty acyl-AMP リガーゼを利用した脂肪酸アミド合成法の開発, 日本生物工学会 2016 年度大会, 講演要旨集 p.170, 2P-1p006, 富山国際会議場(富山), 2016.9.29.

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, 日本生物工学会 2016 年度大会, 講演要旨集 p.170, 2P-1p005, 富山国際会議場(富山), 2016.9.29.

〔図書〕(計 1 件)

木野邦器(分担執筆): 中分子医薬開発に資するペプチド・核酸・糖鎖の合成・高機能化技術, 監修: 千葉一裕, 第 編ペプチド, 第 6 章ペプチド合成酵素を利用した触媒的アミド合成, pp.67-pp.78, シーエムシー出版, 東京, 2018 年 2 月. ISBN978-4-7813-1320-7, 総頁数: 317 頁

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: イミダゾールジペプチド合成活性を有するタンパク質及びイミダゾールジペプチドの製造方法

発明者: 木野邦器

権利者: 早稲田大学

種類: 特許

番号: 特願 2017-165715. 米国特許第 15/854,921 号

出願年月日: 2017.8.30, 2017.12.27 Filing

国内外の別: 国内、米国特許

名称: イミダゾールジペプチド合成活性を有するタンパク質及びイミダゾールジペプチドの製造方法

発明者: 木野邦器

権利者: 早稲田大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-252275

出願年月日: 2016.12.27

国内外の別: 国内、

取得状況(計 2 件)

名称: 塩味増強剤

発明者: 木野はるか, 角谷政尚, 服部宏一, 木野邦器

権利者: 長谷川香料株式会社

種類: 特許

番号: 特許第 6324349 号(特開 2017-006095)

取得年月日: 2018.4.20(登録日)

国内外の別: 国内

名称: 塩味増強剤

発明者: 木野はるか, 角谷政尚, 服部宏一, 木野邦器

権利者: 長谷川香料株式会社

種類: 特許

番号: 特許第 6113098 号(特開 2015-181419)

取得年月日: 2017.3.24(登録日)

国内外の別: 国内

〔その他〕

広報

早稲田大学 HP：トピックス「多様なアミド化合物を  
合成可能とする新規アミド結合形成反応を開発」

<https://www.waseda.jp/top/news/57395>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

木野 邦器 (KINO, Kuniki)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：60318764

### (2)研究分担者

該当者なし

### (3)連携研究者

該当者なし

### (4)研究協力者

原 良太郎 (HARA, Ryotaro)

鈴木 伸 (Suzuki, Shin)