

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26289318

研究課題名(和文) 生体機能分子を利用したアミド化合物生産法の開発

研究課題名(英文) Development of amide compounds production using functional biomolecules

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) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：多様な機能を有するアミド化合物の中でも、抗体に代わる中分子医薬品として注目されているペプチドには、血圧降下作用をはじめ抗酸化や抗疲労さらには呈味性を有するものなど多く、効率的なペプチド合成法の開発が望まれている。研究代表者は、無保護のアミノ酸から任意のジペプチドを合成可能な新規酵素を多数取得しており、それらを利用して塩味増強効果を有するジペプチドの探索や酵素の機能改変による効率的な合成プロセスを開発した。一方、汎用性のあるアミド化合物の新規合成法も開発しており、合成可能なアミド化合物の多様性を拡張した。併せてAMPやADPからのATPの再生系を構築し、プロセスの低コスト化を達成した。

研究成果の概要(英文)：Some dipeptides have specific physiological functions such as antihypertensive and taste-improving effects. We identified that Met-Gly and Pro-Gly are the new dipeptides as salt taste enhancer. The dipeptides were synthesized by L-amino acid ligase (Lal), which is a microbial enzyme that catalyzes dipeptide synthesis from unprotected L-amino acids by hydrolysis of ATP to ADP. We have developed an efficient production process of Met-Gly and Pro-Gly using Lals with structure-based site-directed mutagenesis. Aminoacyl prolines (Xaa-Pro), which are valuable compounds because of their biological activity, have been synthesized using the adenylation domain (A domain) of nonribosomal peptide synthetase (NRPS). Utilization of ATP-dependent enzymes for industrial processes is limited by the high cost of ATP. Therefore, the ATP regeneration system from AMP or ADP has been developed using a class III polyphosphate kinase 2, which was coupled with Xaa-Pro synthesis catalyzed by A domain of NRPS.

研究分野：応用生物化学

キーワード：バイオテクノロジー 遺伝子 酵素 生体分子 生物・生体工学 ペプチド アミド化合物

### 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などの生体成分をはじめ汎用化成品など機能性の高い有用物質が多いが、化学合成法では工程が煩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、これまで遊離のアミノ酸を直接縮合してペプチドを合成するL-アミノ酸リガーゼ (Lal) の探索とこれら酵素を利用した有用短鎖ペプチド合成法を検討し、現在までに基質特異性やペプチド鎖長の異なる多くのペプチド合成酵素の取得に成功している。また、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) のアデニル化ドメイン (A ドメイン) によって活性化されたアミノ酸のカルボキシ基に対し、多様なアミン類を作用させることで対応するアミド化合物が合成可能であることを見出している。ペプチドをはじめとするアミド化合物の酵素的合成法の高度化と本バイオプロセスの社会実装、ならびに具体的な機能性ペプチドの創製と用途開発に大きな期待が寄せられていた。

### 2. 研究の目的

Lal の酵素学的知見の蓄積と産業利用を促進するために、Lal の立体構造解析を推進し、Lal を用いたジペプチドの効率的生産法を可能とする基盤技術の検討と、当該酵素を利用した機能性ジペプチドの探索ならびに効率的な生産プロセスの開発を検討する (図1)。また、NRPS の A ドメインを用いる新規アミド化合物生産において工業化の課題となる AMP からの ATP 再生法を検討した (図2)。

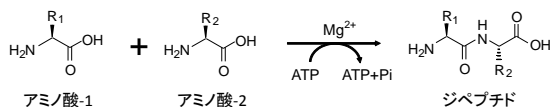


図1 L-アミノ酸リガーゼ(Lal)によるジペプチド合成

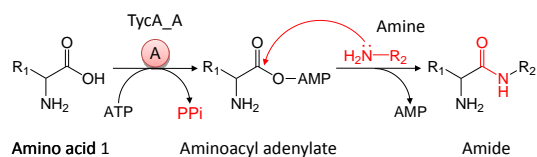


図2 NRPSのAドメインを利用したアミド合成

### 3. 研究の方法

(1)機能性ジペプチドの探索：既知の機能性ペプチドの探索法では、評価対象とならないジペプチドの存在可能性を予想し、任意のジペプチド合成が可能なLalの特長を活かして、効率的な探索法を構築する。本研究では塩味増強効果を有するジペプチドの探索を実施する。多様なジペプチド合成が可能なLalである TabS を用いてジペプチドライブラリーを構築し、迅速かつ簡便な探索法を開発する。

(2)目的ジペプチドの効率的合成法の開発：これまで得られている多くのLalの構造と

機能との関係などを踏まえて、目的ジペプチドの選択的合成を可能とするLalを創製する。  
①塩味増強ジペプチドの効率的生産法の開発を検討する。候補となったジペプチドを最も効率的に合成可能なLalの選択と改変により創製する。

②既知の抗酸化活性を有するイミダゾールジペプチドの酵素的合成法を検討する。

(3)ATP 再生系の開発と有用ジペプチド生産法の開発：単一酵素でAMPからADPを經由してATPを再生する新規ポリリン酸キナーゼ反応を共役させた合成法を検討する。

(4)Lalの立体構造情報の解明：Lalの機能解明と高機能化を目指して、酵素の結晶化ならびにX線による結晶構造解析を実施する。研究協力者である本学電気・情報生命工学科の胡桃坂仁志教授の支援を得た。

### 4. 研究成果

(1)機能性ジペプチドの探索：ジペプチド合成の反応液をそのまま評価試料とするスクリーニング方法を構築し、迅速な評価を可能とした。*Pseudomonas syringae* 由来の TabS を用いて構築したジペプチドライブラリーから、本評価試験により、Met-GlyとPro-Glyを塩味増強ジペプチドの候補として選抜した。引き続き、Met-GlyとPro-Glyの標品を用いて、官能評価と塩味センサーによる塩味増強効果の評価を行った。官能評価では、いずれの試料溶液も0.6~0.65% (w/v)の食塩濃度に相当すると判定され、塩味増強効果が確認できた。また、客観的評価として味覚センサー (アルファ・モス製) による評価も実施し、食塩水と試料溶液の塩味相対強度から、Met-Glyは0.7% (w/v)、Pro-Glyは0.64% (w/v)の食塩濃度に相当し、0.6% (w/v)食塩水よりも高い食塩濃度に相当する結果を得た。塩味増強効果が既に報告されていたいずれもLeu-Serに比較しても効果の高い新規ジペプチドであると判断した。以上より、Lalを用いることで新規な機能性ジペプチドの探索が可能であることが示された。

(2)目的ジペプチドの効率的合成法の開発

①塩味増強ジペプチドの効率的生産法：

Met-Glyの選択的合成を目的に、部位特異的変異導入によるLalの機能改変を行った。Met-Glyの工業的生産には、N末端アミノ酸基質としてMetとLeuのみを認識する*Bacillus licheniformis* 由来のLalであるBL00235を用いることとしたが、MetとGlyを基質とする反応ではMet-Glyが主生成物となるがMet-Metも同時に生成する。そこで、BL00235の結晶構造情報 (3VOT) から、85位のPro残基がC末端アミノ酸基質の親和性に関与していると推測し、Met-Metの合成を抑制するための方法を策定した (図3)。

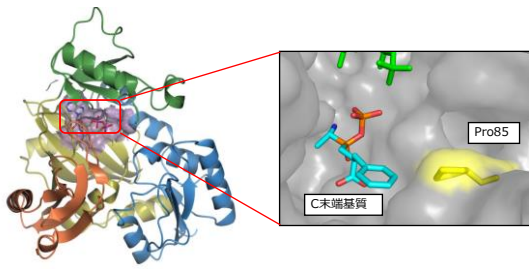


図3 BL00235の構造と変異導入部位Pro85の位置

すなわち、85位のPro残基をProよりも高いアミノ酸に置換することでC末端アミノ酸基質認識周辺のスペースが空間的に狭くなり、その結果、側鎖の大きいMetは認識されず、側鎖の小さいGlyのみが選択的にC末端基質として認識されると考えた。実際に部位特異的変異導入によってProよりも高い側鎖を持つ芳香族アミノ酸であるPhe、Tyr、Trpに置換したところ、その変異酵素P85F、P85Y、P85WはMet-Met合成能力が消失し、P85FとP85YではPro-Gly合成活性を維持していた(図4)。これらの結果は、Lalの構造情報から推測した特定のアミノ酸残基の一置換変異によってC末端アミノ酸の基質認識が予想したように変化したことを示すものである。結晶構造情報に基づいて改変したLalによる目的ジペプチドの選択的合成の成功は初めての報告となる。置換によりC末端アミノ酸基質認識周辺のスペースが狭くなっていることはホモロジーモデリングによる構造予測からも視覚的に確認することができた。また、Met-Glyの合成量は野生型BL00235よりもP85Fの方が少ないが、動力的解析からも基質との親和性が野生型BL00235よりも低いことが示唆され、合成量の違いを支持する結果を得た。

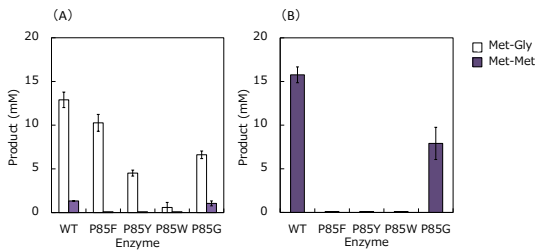


図4 野生型BL00235(WT)と各変異酵素によるMet-GlyとMet-Metの合成 (A)20 mMのMetと20 mMのGlyを基質, (B) 40 mMのMetを基質  
反応液は50 mM炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.0)中に20 mM Met, 20 mM Gly, 20 mM ATP, 20 mM硫酸マグネシウム7水和物を含む。反応条件は30°C, 20 h.

Lalにおける改変戦略の妥当性を検証するために、Pro-GlyをターゲットとしてTabSの機能改変を行った。TabSは基質特異性からProとGlyを基質としたときに選択的にほぼPro-Glyのみを合成するが、その合成量は、基質である20 mMのProとGly対し10 mM以下と少ない。C末端アミノ酸基質の親和性に関与するアミノ酸残基としてBL00235で親和性に関わるPro85に相当するSer85と、N末端基質アミノ酸基質の親和性に関与するアミノ酸残基としてHis294に着目し、それぞれに対しサチュレーション変異導入を行った。その結果、Thrに置換したS85TとAspに置換したH294DでPro-Glyの合成量が野生型

TabSよりも増加し、BL00235と同様に85位のアミノ酸残基が基質アミノ酸に関与することを確認した。さらにこの2つの変異を掛け合わせた二重変異型酵素S85T/H294DではPro-Glyの合成量が一変異型よりもさらに増加し、Pro-Glyの合成に適した改変型TabSの取得に成功した。動力的解析では二重変異型酵素S85T/H294DはProとGlyに対する親和性が野生型TabSよりも高く、Pro-Glyの合成量の増加を支持する結果を得た。

### ②イミダゾールジペプチドの合成法の開発:

抗酸化、抗疲労作用を有するイミダゾールジペプチドの酵素的合成法の検討を継続して行った。 $\beta$ -AlaをN末端基質として認識するLalであるYwfEの改変酵素を用いたカルノシン( $\beta$ -Ala-L-His)の合成収量の大幅向上に成功したが、アンセリンとバレニン合成の活性も確認することができた。そこで、あらためてYwfEの結晶構造情報(3VMM)とカルノシン合成での知見を踏まえて、合成収量(変換効率)の向上を可能とする変異型酵素を創製し、その活性評価を行った。カルノシンでは11.4 mM(収率91.4%)とさらに合成収量が向上し、アンセリンでは段階的に変異を導入して創製した三重変異体で11.8 mM(収率94.7%)と好成績を達成した。バレニンに関しては、反応物のLC-MS解析によりその生成を確認することができた(図5)。

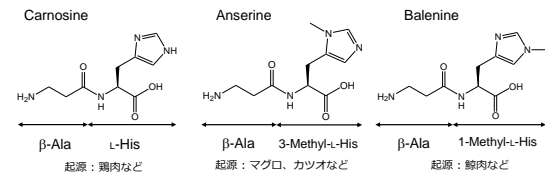


図5 Lalを用いて合成可能なイミダゾールジペプチド

(3)ATP再生系の開発と有用ジペプチド生産法の開発: Lalを用いるペプチド合成もNRPS由来のAドメインを用いた多様なアミド化合物の合成(図2)も、反応には当モルのATPが必要である。工業的プロセスを想定し、安価なポリリン酸を利用するポリリン酸キナーゼによるATP再生系の共役を検討した。ポリリン酸キナーゼのうち単一酵素でAMPからADP、さらにはADPからATPへの再生活性を有するClass III PPK2に着目した(図6)。

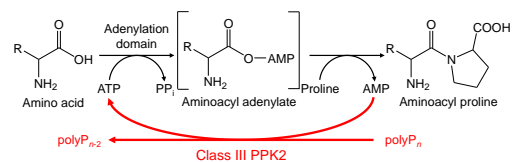


図6 class III PPK2型ポリリン酸キナーゼによるATP再生とアミノアシル合成

まず、ADPからのATP再生が重要となるLalを用いたジペプチド合成における有効性を確認した。*Deinococcus proteolyticus*由来のDeipr\_1912を利用したところ、ATPの使用量を従来の1/10にした場合、再生系を導入していない系では顕著にPro-Glyの合成量が減少するのに対し、再生系を導入した系では

Pro-Gly の合成能力を維持した (図 7)。

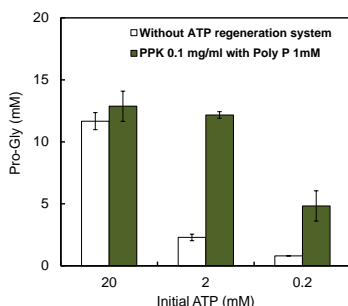


図7 ATP再生系をLalによるジペプチド合成反応に共役させたPro-Gly合成 PPK: Deipr\_1912 as class III PPK2

NRPS の一つである tyrocidine synthetase A の A ドメイン (TycA-A) による、L-Trp と L-Pro を基質とした Trp-Pro 合成反応に Deipr\_1912 を用いた ATP 再生系を共役させたところ、AMP を初発基質とした場合本来反応が進行しない Trp-Pro の合成反応が確認できた。しかしながら、反応速度が遅く低収量であった。その原因として反応進行に伴い蓄積するピロリン酸がアデニル化を阻害すると推察した。ピロリン酸分解活性を有するピロフォスファターゼを反応系に添加したところ、予想通り反応速度は 14 倍と大幅に向上し、ポリリン酸濃度の適正化も行うことで、最大 6.2 mM の Trp-Pro 合成を達成した。

(4) RizA は分解能 2.8 Å で立体構造を決定することができた (4WD3)。ポリ- $\alpha$ -グルタミン酸合成酵素である RimK では種々結晶化条件を検討し、得られた単結晶を大型放射光施設 Photon Factory にて X 線回折試験を行ったところ、分解能 2.05 Å で AMP-PNP, Mg<sup>2+</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> と複合体を形成した RimK の結晶構造を取得することに成功した。構造中に非対称単位中に 8 分子が確認され、各構造にて基質の噛み込みの可否で場合分けしたところ、2 種類のパターンに分けることができ、しかも、この 2 種類の構造を重ね合わせたところ、一部で構造の差異が認められた。この立体構造情報と Lal に関する一般的な構造と機能との関係を踏まえて部位特異的変異を導入した酵素では、基質特異性の変化が認められた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 9 件)

- ①木野邦器、木野はるか、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、化学と生物、査読有、Vol. 55, No. 3, 2017, 182-188. DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.55.182
- ②木野邦器、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.
- ③Haruka Kino, Shota Nakajima, Toshinobu Arai, and Kuniki Kino, Effective production of Pro-Gly by mutagenesis of L-amino ligase, J. Biosci. Bioeng., 査読有、Vol. 122, No. 2, 2016, 155-159.

DOI:10.1006/j.jbiosc.2016.01.014

④木野邦器、微生物の多様性に学ぶ酵素探索と利用、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)

⑤木野邦器、木野はるか、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/>

⑥Wataru Kagawa, Toshinobu Arai, Shun Ishikura, Kuniki Kino, and Hitoshi Kurumizaka, Structure of RizA, an L-amino acid logase from *Bacillus subtilis*, Acta Crystallographica, Section F, 査読有、Vol. 71, 2015, 1125-1130.

DOI: 10.1107/S2053230X15012698.

⑦Haruka Kino, and Kuniki Kino, Alteration of the substrate specificity of L-amino acid logase and selective synthesis of Met-Gly as a salt taste enhancer, Biosci. Biotech. Biochem., 査読有、Vol. 79, No. 11, 2015, 1827-1832.

DOI: 10.1080/09168451.2015.1056511.

⑧木野はるか、角谷政尚、服部宏一、東條博昭、駒井強、南木昂、木野邦器、L-アミノ酸リガーゼを利用した塩味増強効果を有するジペプチドの探索、査読有、Vol. 62, No. 6, 2015, 274-281. DOI: 10.3136/nskkk.62.274.

⑨Ryotaro Hara, Ryohei Suzuki, and Kuniki Kino, Hydroxamate-based colorimetric assay to assess amido bond formation by adenylation domain of nonribosomal peptide synthetases, Analytical Biochemistry, 査読有、Vol. 477, 2015, 89-91. DOI: org/10.1016/j.ab.2015.01.006

〔学会発表〕 (計 16 件)

- ①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、2017. 3. 18.
- ②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、2C26p08、京都、2017. 3. 18.
- ③木野邦器、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、2SY05-4、京都、2017. 3. 18.
- ④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、P5-097、東京、2016. 11. 14.
- ⑤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、B0-14、東京、2016. 11. 7.

⑥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、2P-1p006、富山、2016. 9. 29.

⑦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、2P-1p005、富山、2016. 9. 29.

⑧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 回酵素工学会研究会、B-7、東京、2015. 10. 16.

⑨梅澤覚、角谷政尚、服部宏一、東條博昭、駒井強、齊藤司、木野はるか、木野邦器、L-アミノ酸リガーゼを利用した塩味増強効果を有するジペプチドの探索、日本生物工学会 2015 年度大会、3P-040、鹿児島、2015. 10. 28.

⑩木野はるか、木野邦器、L-アミノ酸リガーゼへの変異導入による塩味増強ジペプチド Pro-Gly の効率的合成法の開発、日本生物工学会 2015 年度大会、3P-039、鹿児島、2015. 10. 28.

⑪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、日本生物工学会 2015 年度大会、1P-059、鹿児島、2015. 10. 26.

⑫Haruka Kino, and Kuniki Kino, Alteration of the substrate specificity of L-amino acid ligase and selective synthesis of functional dipeptide, P0-264, BioTrans2015, Wien (Austria), 2015. 7. 27.

⑬木野はるか、木野邦器、立体構造解析に基づく L-アミノ酸リガーゼの改変と塩味増強効果を有する Met-Gly の選択的合成法の開発、日本農芸化学会 2015 年度大会、3A34a10、岡山、2015. 3. 28.

⑭橋田紋佳、中島翔太、新井利信、木野邦器、結晶構造情報に基づく L-アミノ酸リガーゼ TabS の基質特異性の改変、日本生物工学会 2014 年度大会、1P-088、札幌、2014. 9. 9.

⑮木野はるか、角谷政尚、服部宏一、東條博昭、駒井強、南木昂、木野邦器、L-アミノ酸リガーゼを利用した塩味増強効果を有するジペプチドの探索と効率的生産法の開発、日本生物工学会 2014 年度大会、1P-067、札幌、2014. 9. 9.

⑯木野はるか、角谷政尚、服部宏一、東條博昭、駒井強、南木昂、木野邦器、L-アミノ酸リガーゼを利用した塩味増強効果を有するジペプチドの探索、第 68 回日本栄養・食糧学会大会、30-13P、江別、2014. 6. 1.

[図書] (計 1 件)

木野邦器 (Kuniki KINO): 分担執筆、Springer, Editor: Hidehara Anazawa, Sakayu Shimizu, Microbial Production from Genome Design to Cell Engineering, PartV, Chapter17, Enzymatic Production of Designed Peptide, 2014, 191-206. 総頁数: 306

ISBN 978-4-431-54606-1 (print Book),  
ISBN 978-4-431-54607-8 (eBook)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

①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: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2016-252275

出願年月日: 平成 28 年 1 月 2 日

国内外の別: 国内

②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: 同上

種類: 特許

番号: 特開 2017-006095

出願年月日: 平成 27 年 6 月 2 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 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: 同上

種類: 特許

番号: 特許第 6113098

取得年月日: 平成 29 年 3 月 2 日

国内外の別: 国内

[その他]

○受賞 (計 2 件)

①木野邦器、平成 27 年度科学技術分野の文部科学大臣表彰 科学技術賞・研究部門、微生物機能の高度活用による有用物質の革新的製法の開発研究、2015. 4. 7

②木野はるか、木野邦器、立体構造解析に基づく L-アミノ酸リガーゼの改変と塩味増強効果を有する Met-Gly の選択的合成法の開発、日本農芸化学会 2015 年度大会トピックス賞

○新聞発表等 (計 2 件)

①2015 年度日本生物工学会大会トピックス集、1P-059: 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、生物工学会大会別冊、2015. 10. 26.

②塩味増強効果のペプチド“酵素合成法で迅速探索”、化学工業日報、2015. 8. 4

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) 研究協力者

胡桃坂 仁志 (Kurumizaka, Hitoshi)