



Production of aminoacyl prolines using the adenylation domain of nonribosomal peptide synthetase with class III polyphosphate kinase 2-mediated ATP regeneration

Class III ポリリン酸キナーゼ2による ATP 再生系を共役させた
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アミノアシルプロリン生産

(JBB, Vol. 125, No. 6, 644–648, 2018)

鈴木 伸¹・原 良太郎²・木野 邦器^{3*}

ATP 依存性酵素は高エネルギー化合物である ATP の加水分解と共役して新規結合を形成する。ATP 依存性酵素の触媒する反応には工業的に有用なものも多く、その実用化が期待される。しかし、工業生産において高価な ATP を多量に使用することはコスト面から難しい。そのため、反応により消費される ATP を他の高エネルギー化合物を用いて再生する ATP 再生系が重要となり、多くの検討がなされている¹⁾。

筆者らは、ATP 依存性酵素のうち ATP から AMP とピロリン酸 (PPi) を生じるアデニル化酵素の一種であ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) を用いた chemoenzymatic な新規アミド合成法を開発しており²⁾、有用ジペプチドであるアミノアシルプロリン (Xaa-Pro) の合成にも成功している。本手法の工業応用においては AMP からの ATP 再生が必要であるが、従来技術では複数酵素が必須で煩雑である点が課題であった。そこで、より簡単な ATP 再生系の構築を検討した。

AMP と ADP の両方を基質とするポリリン酸キナーゼ (class III polyphosphate kinase 2; class III PPK2)³⁾ に着目し、当該酵素を利用すれば単一酵素で AMP から ATP を再生できると考えた。ゲノム情報を基に見いだした *Deinococcus proteolyticus* NBRC 101906^T 由来 Deipr_1912 は、期待通り、AMP とポリリン酸から ATP を生成する class III PPK2 活性を保持していた。そこで、tyrocidine synthetase A の A ドメイン (TycA-A) による L-Trp-L-Pro の合成反応をモデル反応とし、Deipr_1912 による ATP 再生系を適用した。すると、本来反応が進行しない AMP を初発基質とした場合にも L-Trp-L-Pro が生成し、AMP からの ATP 再生系が有効に機能していることが確認できた。さらに、反応により副生する PPi が

TycA-A のアデニル化反応を阻害していると推測し、PPi を加水分解するピロフォスファターゼ (PPase) を反応系に導入してアデニル化反応の促進を試みたところ、反応速度は約 14 倍に向上し、L-Trp-L-Pro の収量も 0.87 mM から最大で 6.2 mM にまで増大した (1 mM の AMP 添加条件)。

本研究では NRPS の A ドメインを利用した Xaa-Pro の合成において、(1) class III PPK2 を用いた単一酵素での AMP からの ATP 再生系と、(2) PPase による PPi 分解という二つの技術の併用により、ATP 添加量の削減と反応速度および目的物収量の大幅な向上に成功した。本成果はアデニル化酵素を用いるあらゆる物質生産プロセスに適用可能であり、効率的な生産に貢献する汎用技術になるものと期待できる (図 1)。

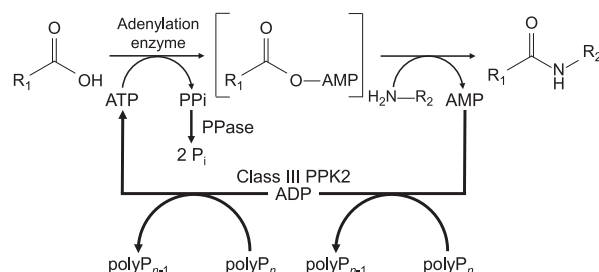


図 1. アデニル化酵素による効率的アミド生産法

- 1) Andexer, J. N. and Richter, M.: *Chem. Bio. Chem.*, **16**, 380 (2015).
- 2) Hara, R. *et al.*: *Sci. Rep.*, **8**: 2950 (2018).
- 3) Motomura, K. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 2602 (2014).

著者紹介 ¹早稲田大学理工学術院先進理工学部応用化学科 (助手)

²早稲田大学理工学術院総合研究所 (次席研究員), 現 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 (特定准教授)

³早稲田大学理工学術院先進理工学部応用化学科 (教授) E-mail: kkino@waseda.jp