

NEDO カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発
「データベース空間からの新規酵素リソースの創出」（2020-2026年度）

データベース空間からの新規酵素リソースの創出

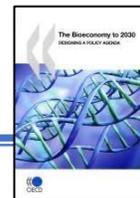
神戸大学 先端バイオ工学研究センター
発表者：秀瀬 涼太



神戸大学

合成生物学は、経済・社会・暮らしを変革している。

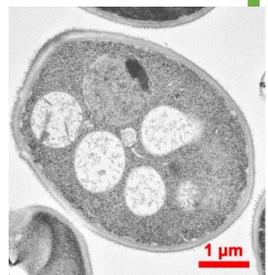
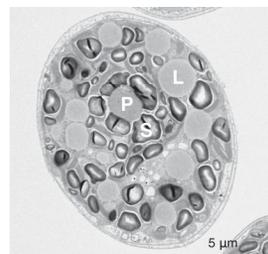
産業規模は約200~400兆円（OECD加盟国、2030年予測）に成長する見通し



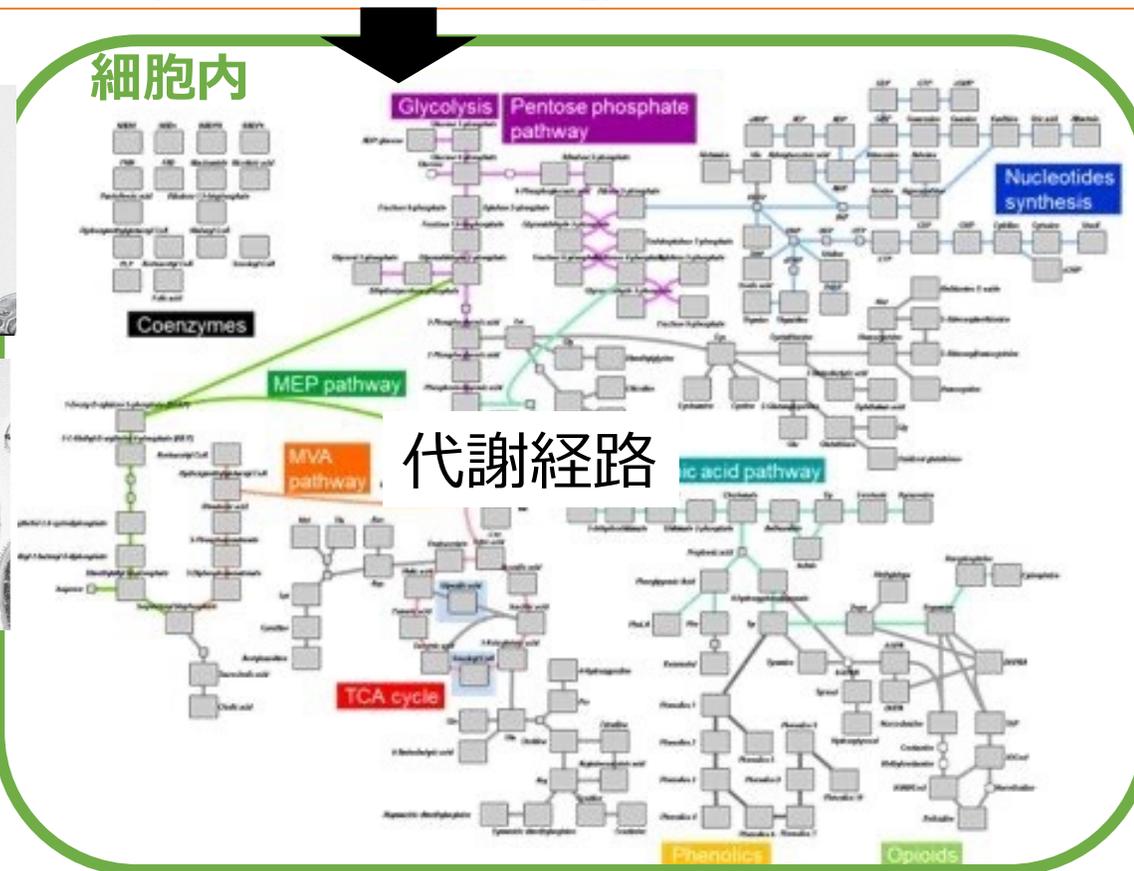
「生物を**探して利用**する時代から、**設計して作動**する時代へ」

バイオものづくり（合成生物学）の特徴

1. 様々な栄養源(廃材/糖/油脂/CO₂)を活用したものがづくりが可能



微生物細胞



2. 多様なものにづくりに展開可能

- ➔ アルコール
 - ➔ アミノ酸
 - ➔ 芳香族化合物
 - ➔ ジアミン
 - ➔ ジオール
 - ➔ 有機酸
 - ➔ 機能性タンパク質
 - ➔ 油脂
- ➔ バイオ燃料
 - ➔ バイオプラスチック
 - ➔ バイオ繊維
 - ➔ バイオゴム
 - ➔ バイオフィンケミカル
 - ➔ バイオ医薬品

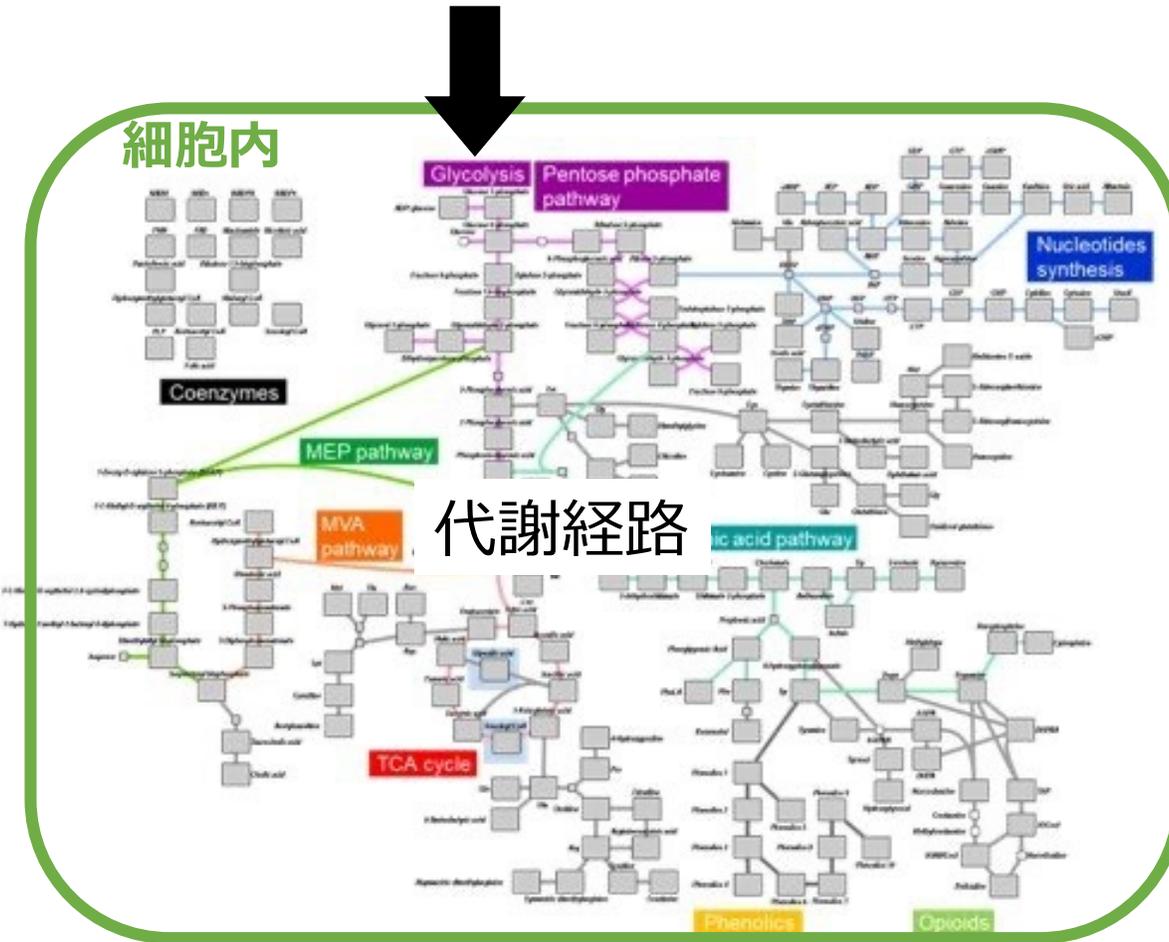
3. 常温・常圧プロセスでの生産が可能

- 化学合成では難しい**複雑で高機能な物質の生産も可能**
- 素材、繊維、燃料、食品など**適応可能な分野は広い**

バイオものづくりの課題

1. 「効率良く栄養源」を取り込み・使えるように設計・改変する必要

2. 「必要とするもの」だけを効率よく生産できる様に設計・改変する必要

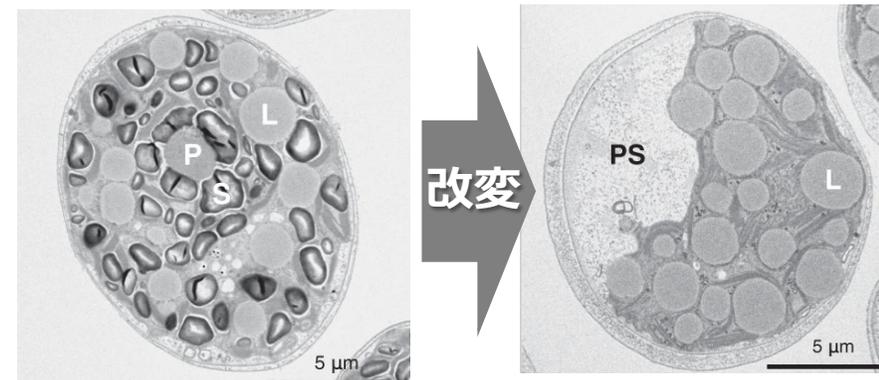


- アルコール
- アミノ酸
- 芳香族化合物
- ジアミン
- ジオール
- 有機酸
- 機能性タンパク質

→ 油脂

目的物が「油脂」の場合：

微生物自身が生成している副産物をなるべく生産しない様にする事で効率化



神戸大学グループの『基盤技術』によって解決可能

[Kato Yuichi et al. Communications Biology](#)
4, 450 (2021)

ロボティクス技術とデジタル技術の融合による微生物開発のプラットフォーム

①ゲノム解析・合成・編集技術

複雑な生命機能を自在に操ることが可能



核酸合成機

②マルチオミクス技術

生育環境や遺伝的背景の異なる細胞の状態を網羅的に知ることが可能



メタボロームサンプル前処理装置

③ロボット・自動化

繰り返し作業の効率化/作業速度・精度の飛躍的向上



島津AutonomousLab

④IT/AI技術

IT/AI技術（機械学習など）が実用レベルに



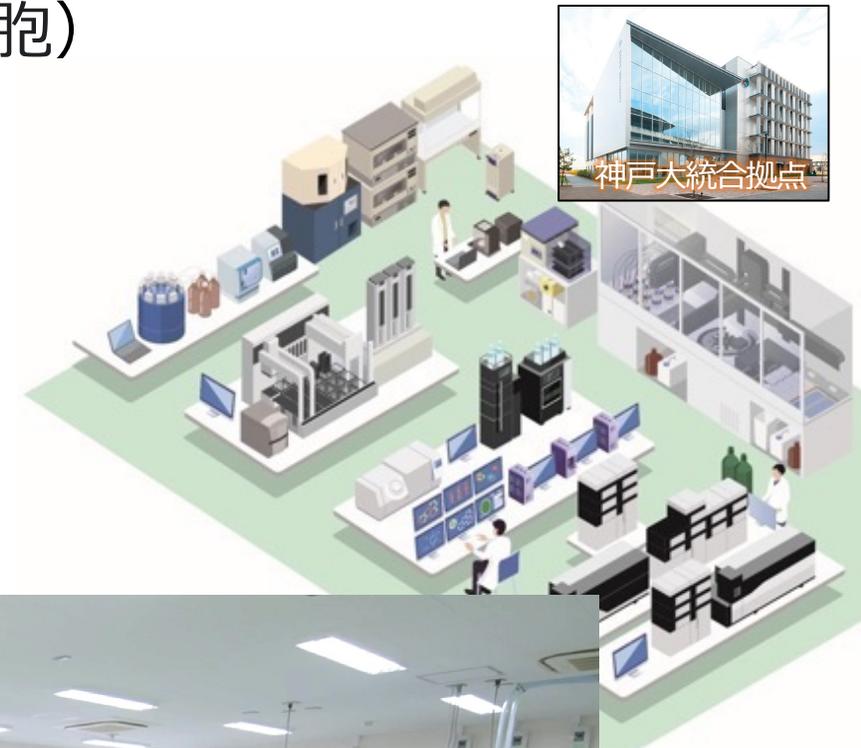
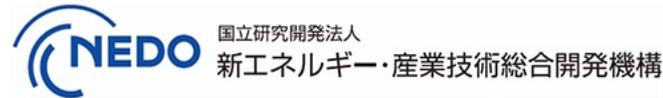
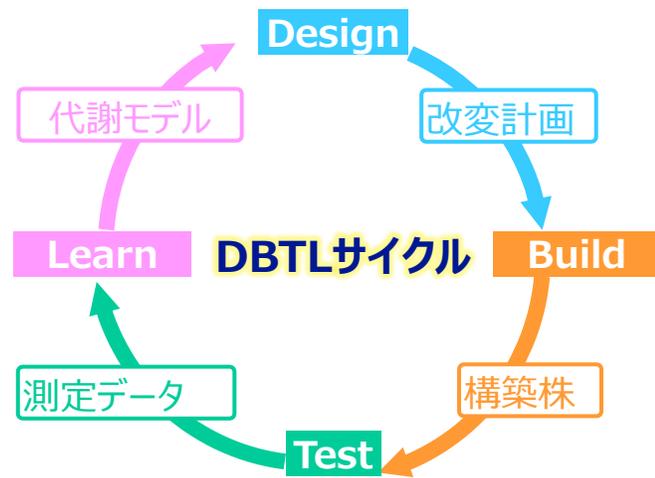
融合

バイオフィュードリー：微生物開発プラットフォーム

- ゲノム配列の意味を理解し、自由自在にデザインすることが可能に。
- 微生物開発の開発速度が飛躍的に向上

神戸大学バイオフィアウンドリー

スマートセル（目的とする物質の製造機能を合理的に高めた細胞）を開発するプラットフォームを神戸大学に構築



- Design : 代謝設計/遺伝子設計
- Build : 宿主構築
- Test : 生産性評価/代謝解析
- Learn : 実験結果の情報解析技術

独自技術を融合したトータルシステム

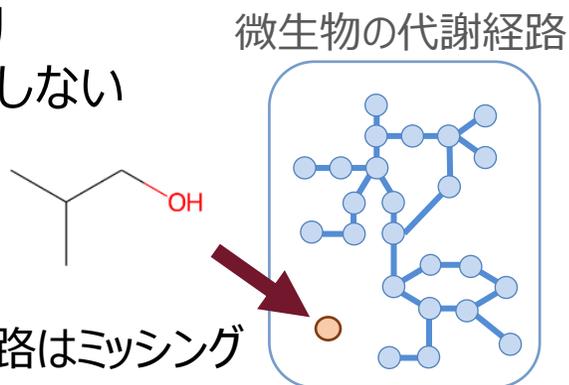
→ (株) Bacchus Bio Innovation社
に技術移転して、社会実装

バイオファウンドリー-高度化に向けた最大の課題

細胞に人工的な代謝経路を導入して、非天然化合物を生産する技術

非天然化合物

: 生物が合成しない
化合物

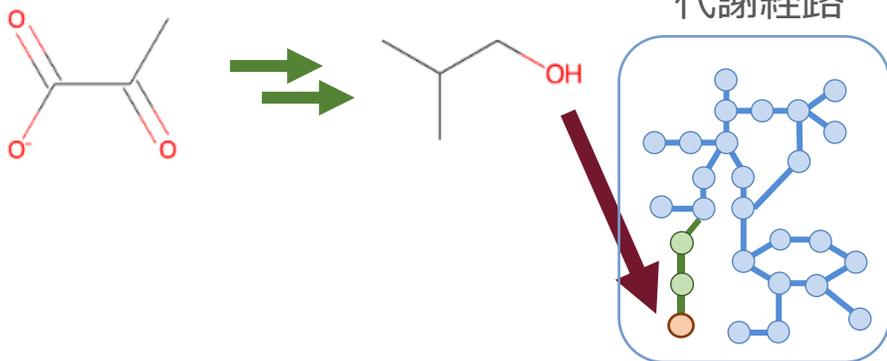


生産経路はミッシング

人工代謝経路設計システム
『BioProV, Mpath等』

人工代謝経路の探索・導入

人工的に設計した
代謝経路



人工代謝経路は酵素がキモ



設計された人工代謝経路の構築

⇒ 高活性酵素 X、Y と 人工酵素 Z が必要

最大の課題 :

- どうやって高活性な酵素 X、Y をデータベース空間から迅速に見出すか？
- どうやって人工酵素 Z を迅速に創製するか？

迅速な酵素創製のための
独自ワークフローと独自データベース



従来型酵素開発

酵素の開発は、既知の情報から人間の手と頭脳で行われてきた

1. 特定のEC番号に基づく酵素選定



情報収集

バイオデータベースに対して酵素名を検索

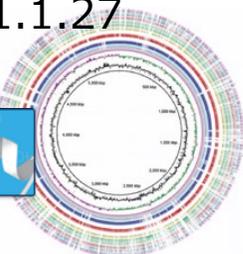
Lactate Dehydrogenase 検索

EC=1.1.1.27

文献検索ツール



酵素配列検索ツール



利用実績がある酵素または
相同性が高い酵素の生産と評価



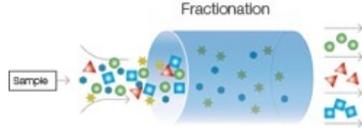
- 酵素選定は、知識や経験に依存する。
- 探索空間が限定的であるため、選定した酵素が期待通りの性能を示さない場合がある

2. 自然界よりスクリーニング

天然微生物のスクリーニング

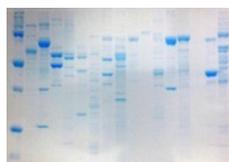
大量培養

酵素精製による
活性画分の回収



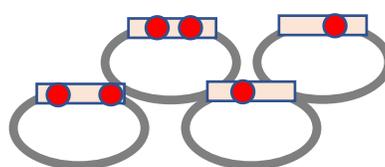
質量分析を利用した
目的酵素の同定

異種発現系を利用した
酵素生産と評価

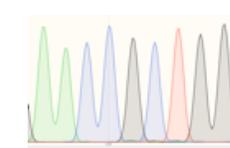
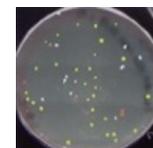


3. ランダム変異

エラープライムPCR



クローンライブラリーの評価/
ポジティブクローンの単離・同定



評価

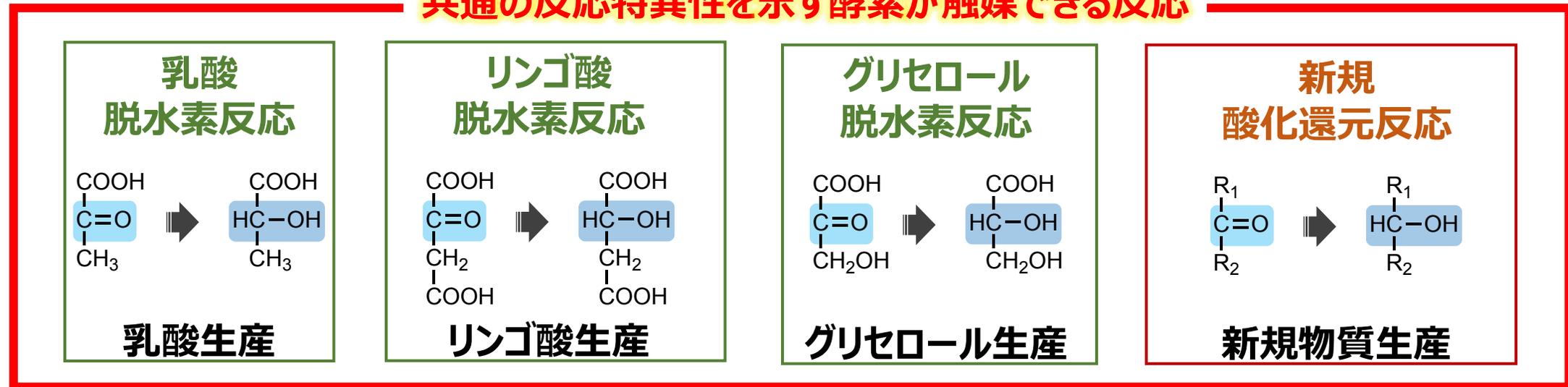
変異箇所同定

- 探索空間が膨大で、データ取得・処理に時間がかかる
- 得られた酵素が期待通りの性能を示さない場合がある

本研究のアイデア

- 既存のEC番号に基づく酵素選定にとらわれず、「**共通の反応特異性**」の観点から酵素探索空間を拡大する！
- EC番号に基づく酵素探索から脱却し、「**基質特異性や触媒効率等の活性情報**」を幅広く集積する！

共通の反応特異性を示す酵素が触媒できる反応



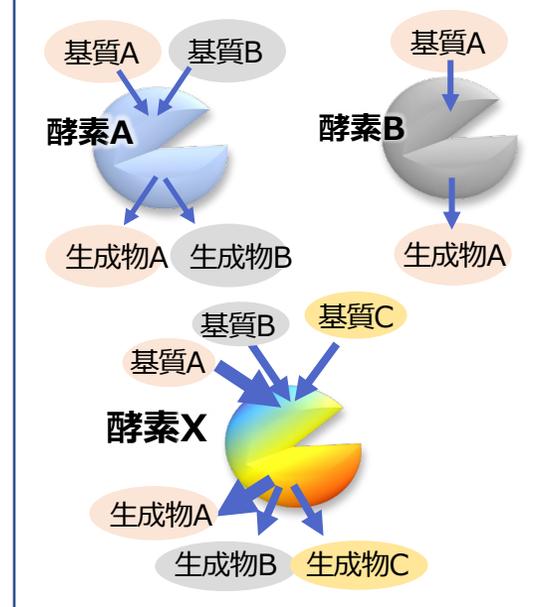
超高活性型酵素や新規活性酵素を含む人工酵素を**迅速に獲得**できる

酵素開発課題に対する独自アプローチ

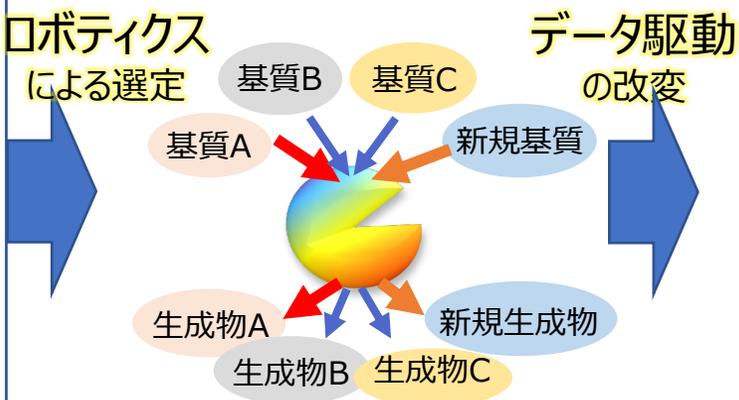
「**テンプレート酵素群**」の体系化と、バイオ生産につながる人工酵素の創出

→ **テンプレート酵素群**を起点とした**酵素工学**を行う

デジタル技術で導出した
テンプレート酵素候補
(天然由来)



テンプレート酵素X
広い基質特異性と
高い触媒効率を併せ持つ

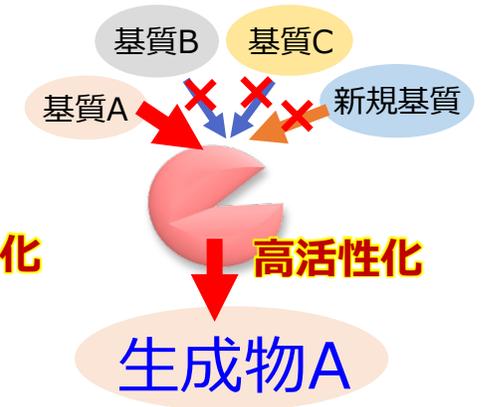


人工酵素

(新規活性酵素)
高活性型を維持したままで
新規基質に特化する



(高活性型酵素)
基質Aに対して活性を最大
限上げていく



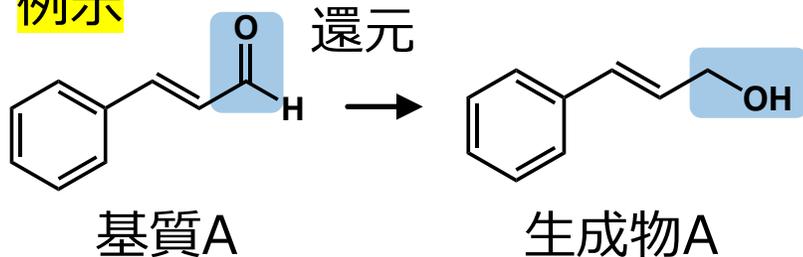
「**デジタル×ロボティクス**を駆使した**新規酵素開発プラットフォーム**」の構築

「**基質特異性や触媒効率等**」を集積 → **テンプレート酵素群**を起点とする人工酵素の迅速創製

従来型酵素開発に対するテンプレート酵素の優位性

■ 従来型酵素開発

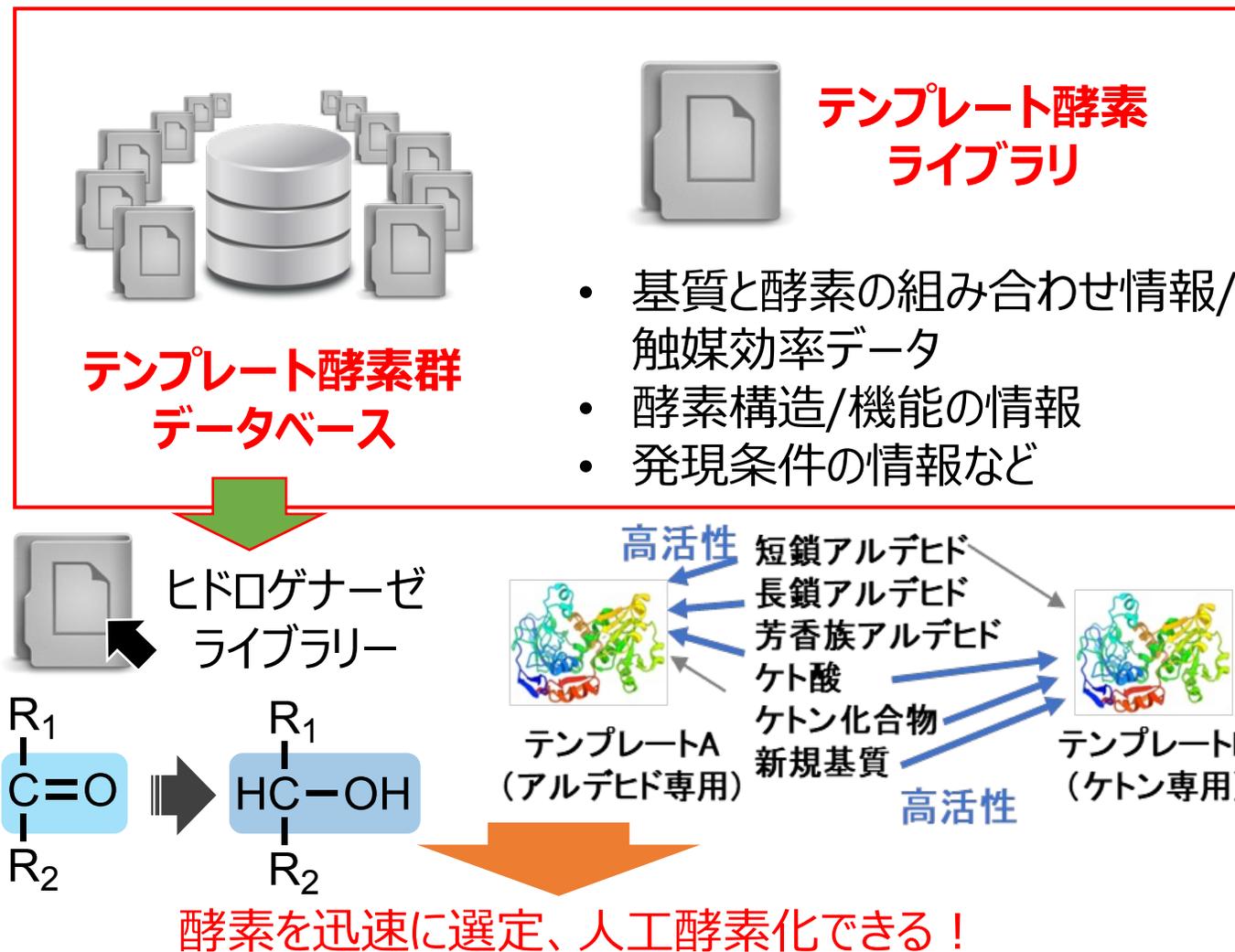
例示



- ✓ 基質毎 (=EC番号) に最適な酵素の選定 (探索空間が限定的)。
- ✓ 自然界よりスクリーニング、ランダム変異による酵素改変 (探索空間が膨大)。

望みの反応の獲得に時間を要している。

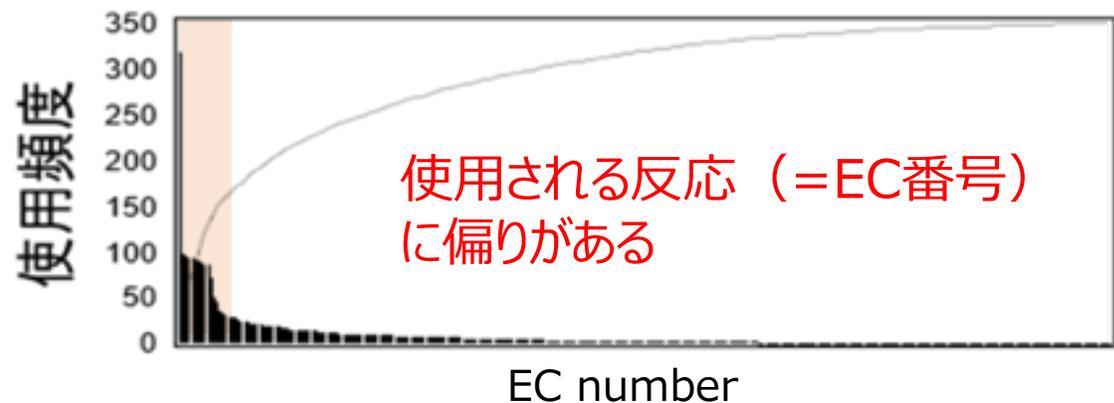
■ テンプレート酵素群からの酵素開発



目的化合物の高生産に資する『テンプレート酵素ライブラリー』を集積し、データベース化する

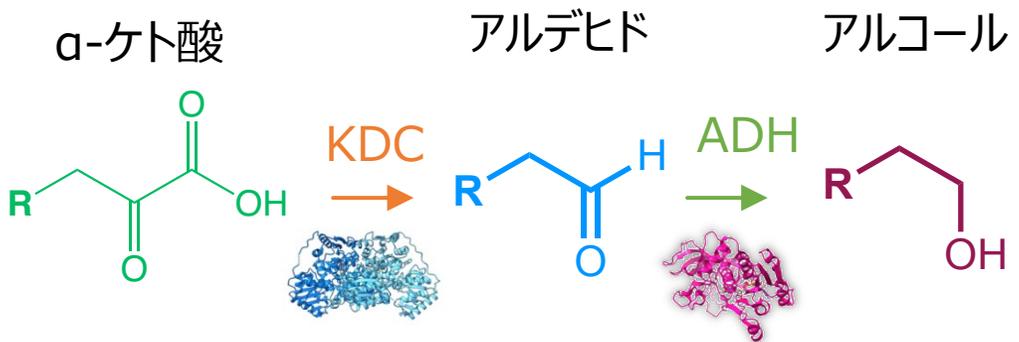
ケーススタディ：有用アルコール生産

産業ニーズの高い各種化合物の生産に関与する
反応の使用頻度を解析 (BioProVで予測)



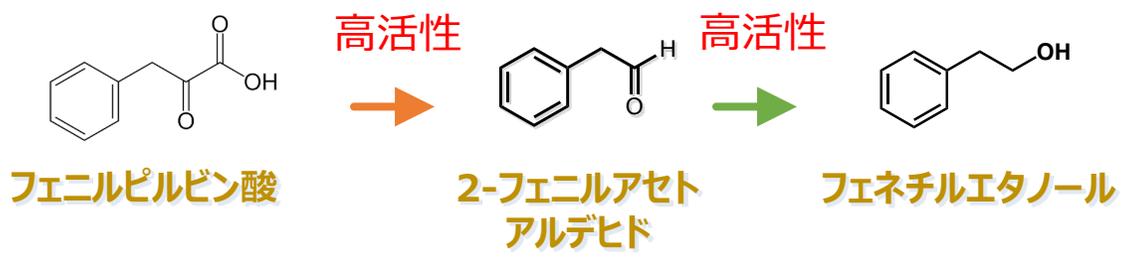
※各EC番号の使用頻度の合計
 ケト酸脱炭酸酵素 KDC : (110件以上※)
 アルコール脱水素酵素 ADH (220件以上※)

テンプレート酵素の選定



ケース① 目的物質の生産性向上に繋がる「超高活性型酵素」の取得

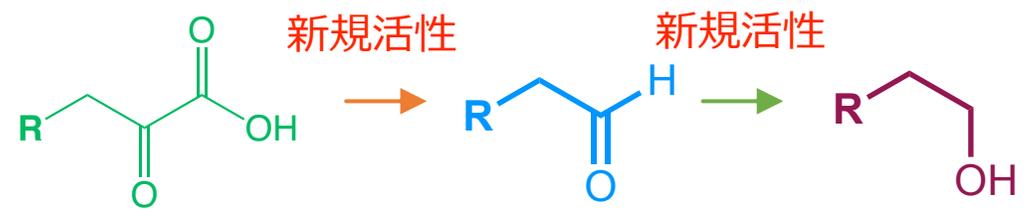
芳香族：香料、医薬中間体



脂肪族：燃料、化成品原料



ケース② 人工代謝経路の実現に繋がる「新規活性酵素」の取得



ハイスループット酵素活性評価システムの構築

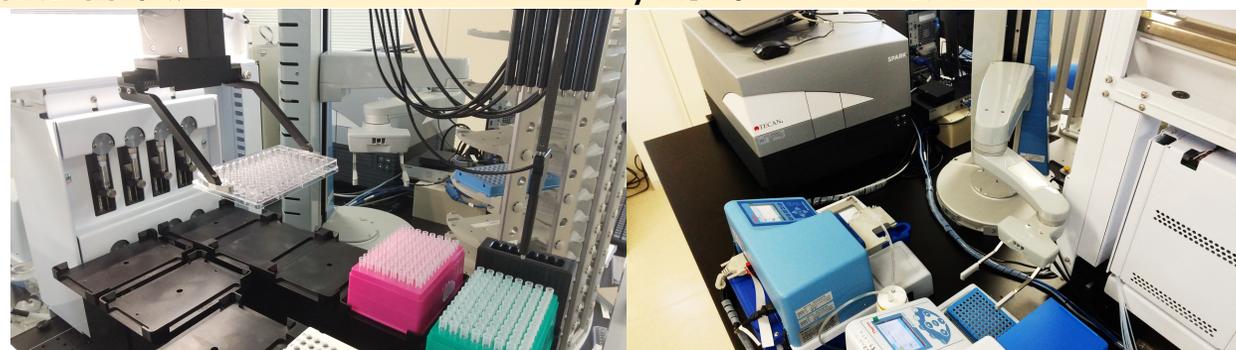
世界最高水準のスループット（数千酵素種/日）で高精度データ取得が可能

✓ 複雑で時間のかかる工程（クローン選抜・分注）を**自動化**し、酵素データを迅速に取得するシステムを構築した。

微生物コロニーピッキングロボット



自動溶液分注ワークステーション/酵素反応測定システム



✓ **自動化**に適合した酵素活性評価ワークフローを構築した。

様々なアッセイ系に適用可能



クローン選抜・培養・酵素発現

遺伝子ライブラリー → コロニーピッキング → 宿主微生物 → コロニー画像解析 (明視野・蛍光) → クローン選抜 → 多検体培養・酵素発現

酵素抽出・アフィニティ精製

分注ワークステーション → 酵素発現菌体 → 自動精製 → 精製酵素液

<活性評価例>

実験操作 実験時間

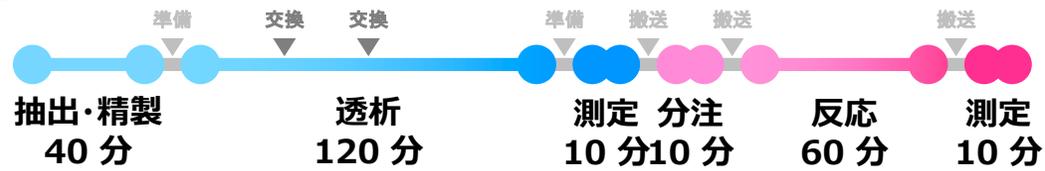
酵素活性測定

自動アッセイシステム → 比色・蛍光定量

比色・蛍光定量

時間 [秒]

時間 [秒]	Test #1 (ABS)	Test #2 (ABS)	Test #3 (ABS)
0	0.40	0.40	0.40
100	0.25	0.25	0.25
200	0.15	0.15	0.15
300	0.10	0.10	0.10



Step1 「酵素配列情報の系統的分類法（ムサシメソッド）」の開発

従来の分子系統解析(系統樹解析)の課題：

処理する情報量が多く、データが膨大の場合可視化しづらいので、重要な酵素を見落とす。

新規分類法(ムサシメソッド)

バイオデータベース (Uniprot) で、キーワード検索 (ADH_zinc_N) など。1万件以上の配列を収集 (ダウンロード)

配列冗長性を排除 (2400件に絞り込み)

各タンパク質配列をアライメント後、数値化

分散を最大化する主成分解析

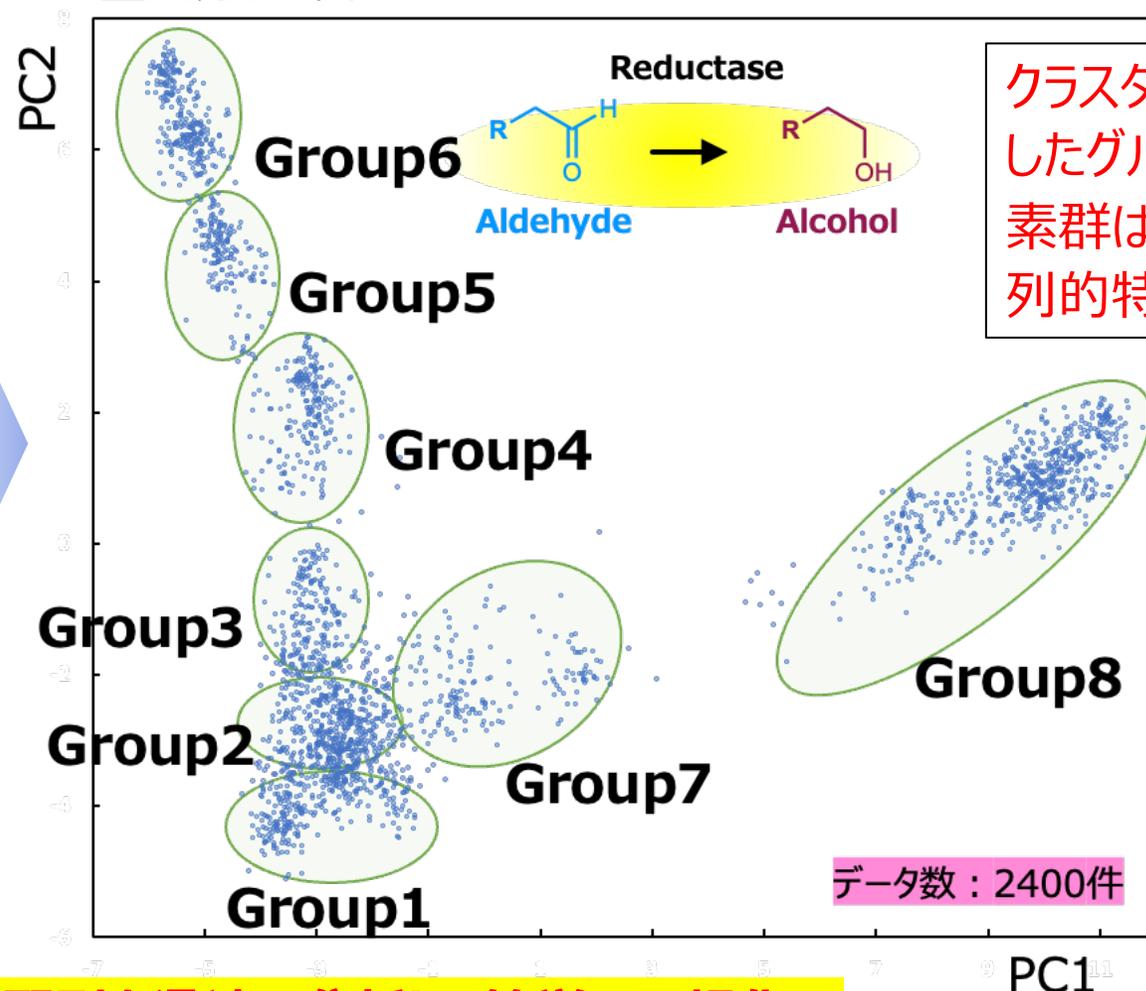
非階層クラスタリングによるグループ化

テンプレート酵素候補群の抽出

「ムサシメソッド」の特徴

- 何千ものタンパク質のアミノ酸配列を迅速に分析し、簡単に可視化！
- 類縁の酵素配列間で異なる特徴的な配列を見出すことに成功した！

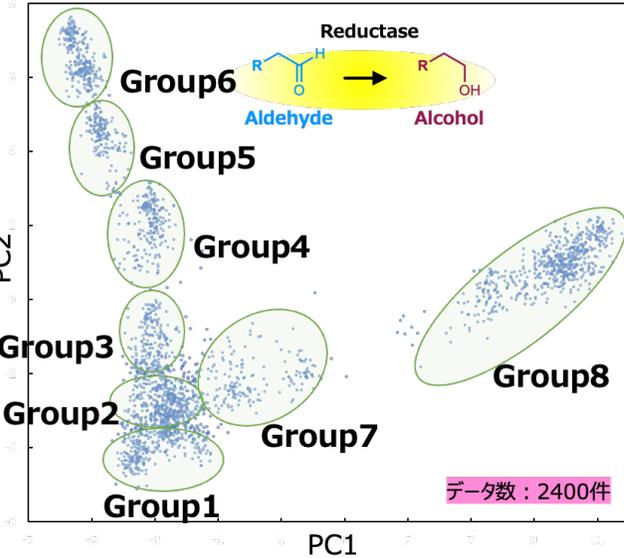
主成分プロット



Step2 テンプレート酵素候補群データ集積

ムサシメソッド分類

主成分プロット



8グループから各々2種類をテンプレート酵素候補として選定
→ データ集積



短鎖アルデヒド
芳香族アルデヒド
長鎖アルデヒド
ケト酸
ケトン
アルコール

○ : > 0.5 mM⁻¹·s⁻¹ △ : < 0.5 mM⁻¹·s⁻¹ × : 不検出

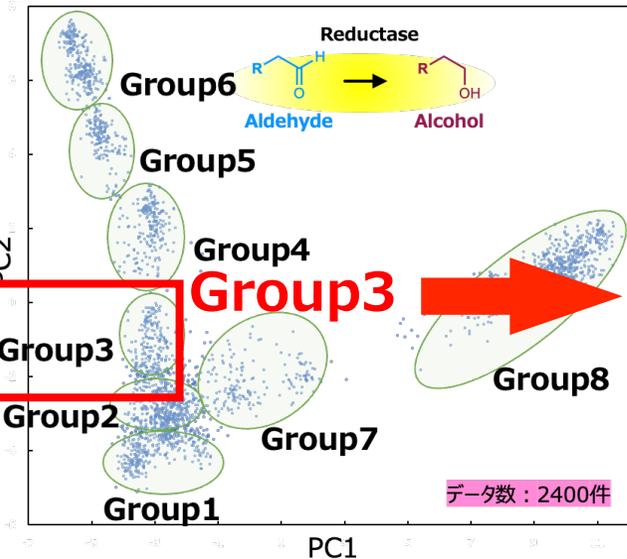
酵素	Group1		Group2		Group3		Group4		Group5		Group6		Group7		Group8	
	G1-1	G1-2	G2-1	G2-2	G3a-1	G3a-0	G4-1	G4-2	G5-1	G5-2	G6-1	G6-2	G7-1	G7-2	G8-1	G8-2
Acetaldehyde	△	△	△		○	○	○	×	○	○	△	○	×	×	×	△
Isobutyraldehyde	×	△	×		○	○	○	△	○		△	○	×	×	×	×
Butyraldehyde	×	×	×		○	○	○	△	○		×	○	×	×	×	×
Glyceraldehyde	×	×	×		○	○	△	△	×		×	△	×	×	×	×
Glutaraldehyde	○	×	×		○	○	○	×	○		×	○	×	×	×	×
4-Carboxybenzaldehyde	×	×	×		○	○	×	×	△		△	×	△	×	×	×
3-Methoxybenzaldehyde	○	×	×		○	○	×	△	△		△	×	×	×	×	×
5-Hydroxymethylfurfural	×	×	△		○	○	△	×	○		×	△	×	△	×	×
2-phenylpropionaldehyde	○	×	×		○	○	○	×	△		×	×	×	×	×	○
p-Hydroxybenzaldehyde	×	×	×		○	○	×	×	×		×	×	×	×	×	△
o-Phthalaldehyde	×	×	×		○	○	×	×	×		×	×	×	×	×	×
Phenylacetaldehyde	×	×	×		○	○	△	×	×		×	×	×	×	×	×
Benzaldehyde	×	×	×		△	○	○	×	○		×	○	△	×	○	×
Cinnamaldehyde	×	×	×		○	○	○	×	○		×	○	△	△	×	×
Furfural	×	△	△		○	○	○	×	○		×	○	×	×	×	×
Decanal	△	×	×		△	○	○	×	△		×	△	×	×	△	×
Capronaldehyde	×	×	×	○	○	○	×	×	○		×	○	△	×	×	△
m-Nitrobenzaldehyde	×	×	△		○	○	○	×	○		×	○	×	×	×	×
2-Oxoglutarate	△	○	△		△	△	△	×	△		△	△	×	×	×	○
Oxaloacetate	△	×	×		△	×	×	×	×		△	△	×	×	×	×
Methylglyoxal	△	×	△		○	○	○	○	○	△	△	○	×	×	×	×
Pyruvate	○	○	×		△	△	△	×	×		×	×	×	×	×	×
Phenylpyruvate	×	×	×		△	×	×	×	×		×	△	×	△	×	×
4-Hydroxy-2-butanone	×	×	×		△	×	×	×	×		×	×	×	×	×	×
Acetol	×	×	×		△	△	×	△	△		△	△	×	×	×	×
Acetone	×	×	×		○	○	○	△	○		×	○	×	×	×	×
2-Butanone	×	×	×		×	○	×	×	×		△	△	×	×	×	×
2-Decanone	△	×	×		×	△	△	△	△		△	×	×	×	×	×
2-Octanone	×	×	×		△	△	△	△	△		○	○	×	×	△	△
2-Pentanone	×	×	×		○	○	×	△	×		×	×	×	×	×	×
3-Methylcyclohexanone	×	×	×		○	○	×	×	×		×	×	×	×	×	×
Cyclohexanone	×	×	×		○	×	○	△	○		×	○	×	×	×	×
4-Methoxyphenylacetone	△	×	×		○	○	○	○	○		△	×	△	○	×	△
Ethanol	×	×	×		△	△	○	△	○		×	○	×	△	△	△
Cinnamyl alcohol	△	△	×		○	○	△	△	△		×	×	×	×	×	×
Decanol	△	△	○		○	○	△	△	○		×	○	×	×	△	○
Benzyl alcohol	△	×	×		○	○	○	△	○		△	○	×	×	×	×
Isopropanol	×	△	△		△	×	○	×	○		○	○	×	×	△	×
2,3-Butanediol	○	×	○		○	○	○	×	△		×	○	×	×	×	△

✓ テンプレート酵素は特定のクラスター（Group 3）に存在していることを発見

Step2 テンプレート酵素候補群データ集積

活性：低い  高い

主成分プロット



Group3の
酵素群の
データを拡充

短鎖
アルデヒド
芳香族
アルデヒド
長鎖
アルデヒド
ケト酸
ケトン
アルコール

・G3y-0、G3a-0、G3y-2
テンプレート酵素群
(35種類の反応をカバー)

・8つの酵素で39種類の
基質をカバー

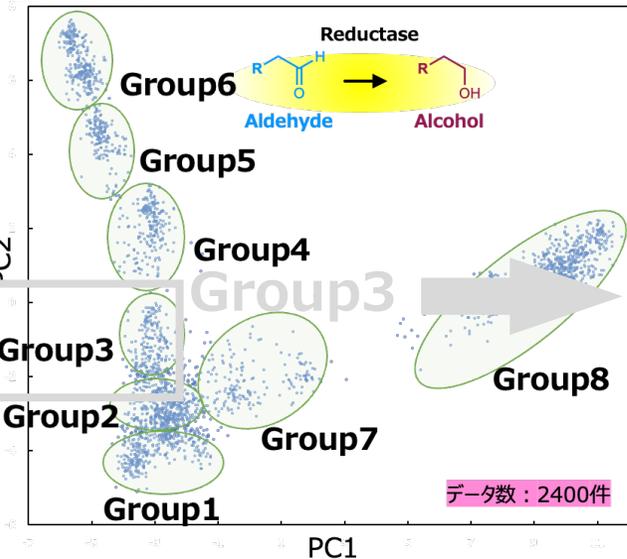


酵素	Group3							
	G3y-0	G3a-0	G3y-2	G3a-1	G3a-2	G3y-1	G3-1	G3-2
Acetaldehyde	Orange	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
Isobutyraldehyde	Green	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
Butyraldehyde	Green	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
Glyceraldehyde	Red	Green	Yellow	Orange	Green	Green	Green	Yellow
Glutaraldehyde	Green	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
4-Carboxybenzaldehyde	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
3-Methoxybenzaldehyde	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
5-Hydroxymethylfurfural	Orange	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
2-phenylpropionaldehyde	Green	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
p-Hydroxybenzaldehyde	Orange	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
o-Phthalaldehyde	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
Phenylacetaldehyde	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
Benzaldehyde	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
Cinnamaldehyde	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
Furfural	Orange	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
Decanal	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
Capronaldehyde	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
m-Nitrobenzaldehyde	Green	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
2-Oxoglutarate	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
Oxaloacetate	Green	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
Methylglyoxal	Red	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
Pyruvate	Red	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
Phenylpyruvate	Green	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
4-Hydroxy-2-butanone	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
Acetol	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
Acetone	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
2-Butanone	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
2-Decanone	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
2-Octanone	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
2-Pentanone	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
3-Methylcyclohexanone	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
Cyclohexanone	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
4-Methoxyphenylacetone	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
Ethanol	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
Cinnamyl alcohol	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
Decanol	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
Benzyl alcohol	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
Isopropanol	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
2,3-Butanediol	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow

Step2 テンプレート酵素候補群データ集積

活性：低い  高い

主成分プロット



Group3の
酵素群の
データを拡充

短鎖
アルデヒド
芳香族
アルデヒド
長鎖
アルデヒド
ケト酸
ケトン
アルコール

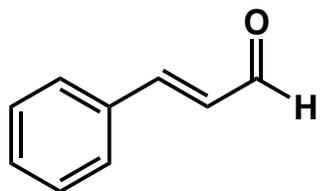
新規活性の発見：
o-フタルアルデヒドや
2-オキソグルタル酸



酵素	Group3							
	G3y-0	G3a-0	G3y-2	G3a-1	G3a-2	G3y-1	G3-1	G3-2
Acetaldehyde								
Isobutyraldehyde								
Butyraldehyde								
Glyceraldehyde								
Glutaraldehyde								
4-Carboxybenzaldehyde								
3-Methoxybenzaldehyde								
5-Hydroxybenzaldehyde								
2-Hydroxybenzaldehyde								
o-Phthalaldehyde								
Phenylacetaldehyde								
Benzaldehyde								
Cinnamaldehyde								
Furfural								
D-Glucose								
2-Oxoglutarate								
Oxaloacetate								
Methylglyoxal								
Pyruvate								
Phenylpyruvate								
4-Hydroxy-2-butanone								
Acetol								
Acetone								
2-Butanone								
2-Decanone								
2-Octanone								
2-Pentanone								
3-Methylcyclohexanone								
Cyclohexanone								
4-Methoxyphenylacetone								
Ethanol								
Cinnamyl alcohol								
Decanol								
Benzyl alcohol								
Isopropanol								
2,3-Butanediol								

Step3 テンプレート酵素群選定

香料



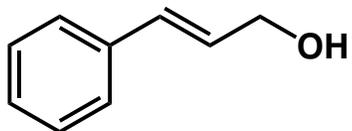
シナムアルデヒド

ADH

1,835

ベンチマーク

k_{cat}/K_m ($s^{-1} \cdot mM^{-1}$)



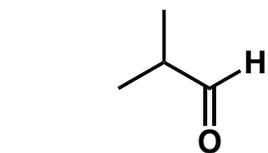
シナミルアルコール

G3a-0

1,685

G3y-2

509



イソブチルアルデヒド

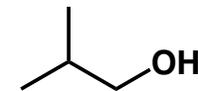
AdhA

2.8

ベンチマーク

YqhD

0.5



イソブタノール

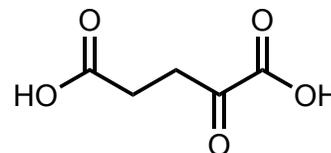
G3a-0

10

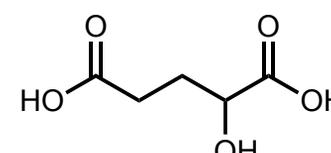
G3y-2

527

世界最高の活性値



2-オキソグルタル酸



2-ヒドロキシグルタル酸

新規活性

G3a-0

0.40

G3y-2

0.24

化成品原料

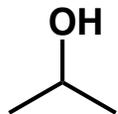


アセトン

IPADH

141

ベンチマーク



イソプロパノール

G3a-0

0.68

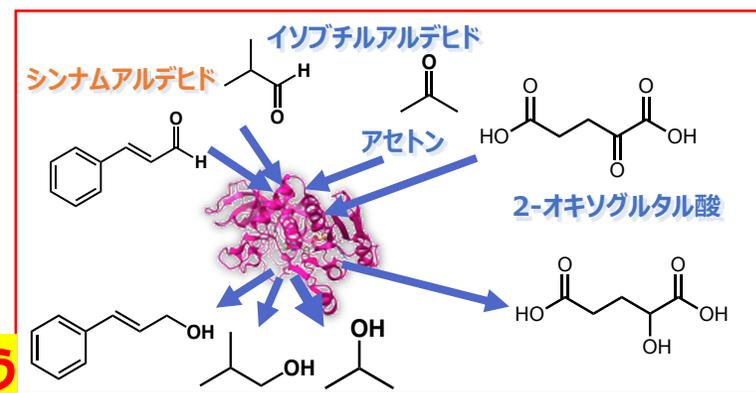
世界最高の活性値

G3y-2

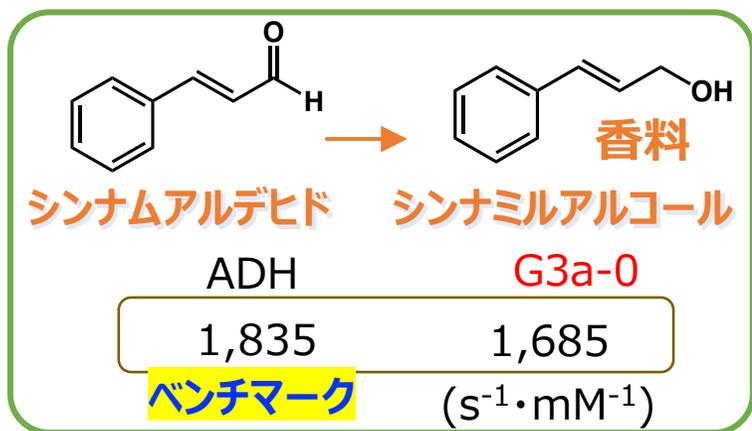
185

G3a-0, G3y-2はテンプレート酵素

ケーススタディとしてAhrを起点とした人工酵素化を行う

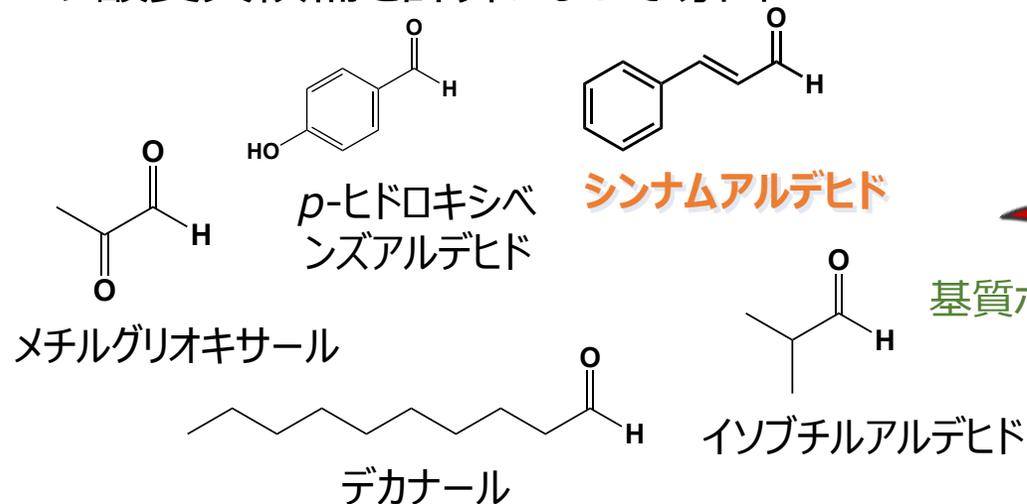


Step4 人工酵素の創生



分子ドッキングシミュレーションに基づく酵素改変

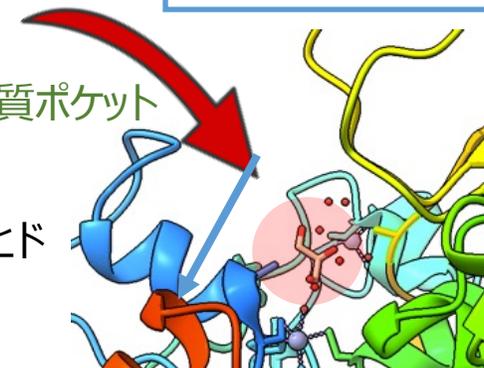
シナムアルデヒドに対する基質親和性の向上するアミノ酸変異候補を計算によって導出



MOE
MOLECULAR OPERATING ENVIRONMENT

活性中心近傍に存在するアミノ酸残基の置換

基質ポケット



➤ 酵素活性評価 低い 高い



基質/酵素	k_{cat}/K_m [mM ⁻¹ s ⁻¹]				
	G3a-0	変異A	変異B	変異C	変異D
メチルグリオキサール	150	27.0	25.8	38.0	80.9
イソブチルアルデヒド	3.19	2.92	6.52	3.30	2.73
シナムアルデヒド	1650	2650	3180	1740	2500
p-ヒドロキシベンズアルデヒド	370	131	169	349	380
デカナル	93.0	10.8	43.9	7.08	N.D.

✓ 酵素改変でシナムアルデヒド指向型酵素の作出に成功した。

✓ シナムアルデヒドの還元に対して世界最高値の触媒効率を示す酵素の作出に成功した。

➤ 改変型酵素の活性データを収集して、人工酵素設計支援システム開発につなげる。

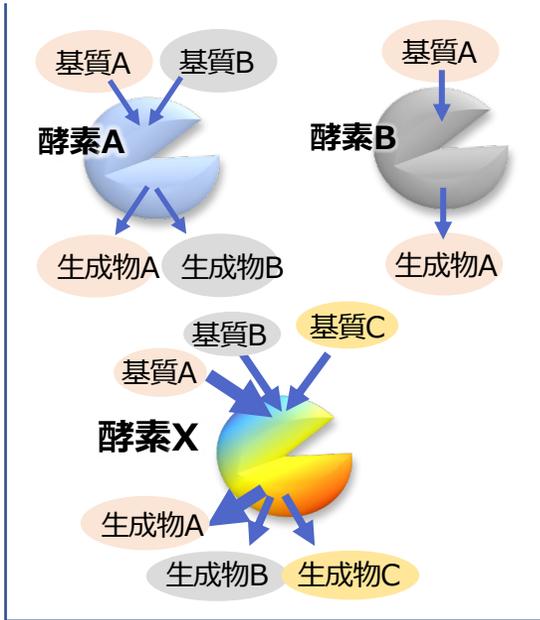


今後の取組

「テンプレート酵素群」の体系化と、バイオ生産につながる人工酵素の創出

デジタル技術で導出した

テンプレート酵素候補 (天然由来)

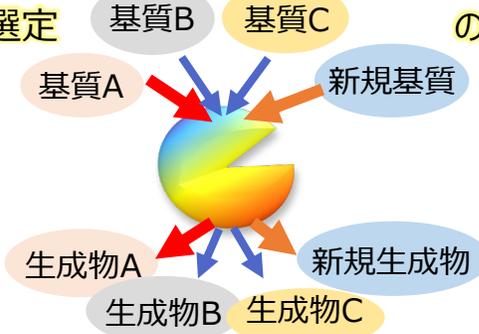


テンプレート酵素X

広い基質特異性と
高い触媒効率を併せ持つ

ロボティクス
による選定

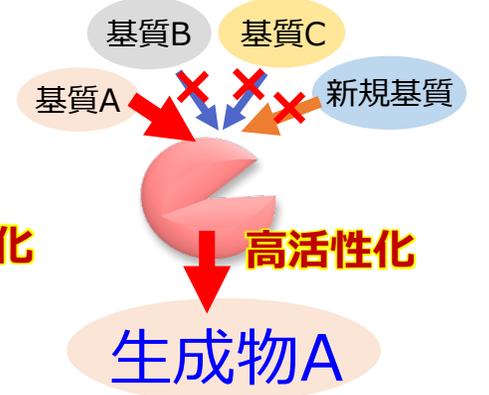
データ駆動
の改変



人工酵素

(新規活性酵素)
高活性型を維持したままで
新規基質に特化する

(高活性型酵素)
基質Aに対して活性を最大
限上げていく



酵素開発事例を学習用データ (教師データ) として、酵素選定・酵素開発のAI化に取り組む

