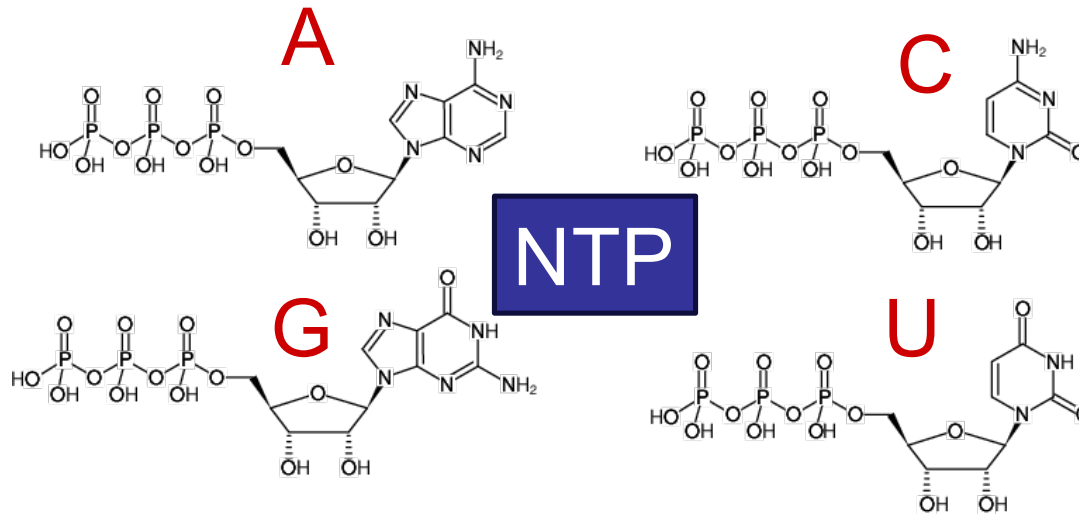


酵素とポリリン酸を用いた安価な 核酸合成技術

東京工業大学 地球生命研究所
教授 松浦 友亮

2024年5月21日

ヌクレオチド三リン酸



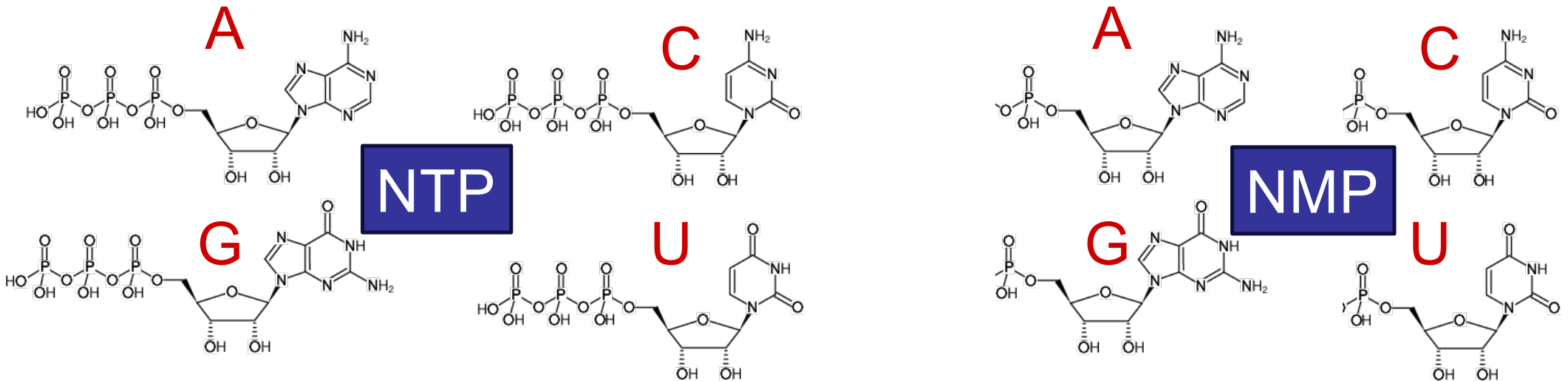
- トリヌクレオチド三リン酸は、酵素を用いた物質生産に必須なエネルギー物質
- ATPは、それ自体が薬
- mRNAの原料

ヌクレオチド三リン酸生産の課題

- ヌクレオチド三リン酸の合成法
 - 化学合成
 - 酵素合成
 - 微生物合成
- 酵素合成は、環境負荷の少ない反応であること、生成物の精製が容易であるなどの利点がある。
- 一方で、原料のコストが嵩む問題がある。

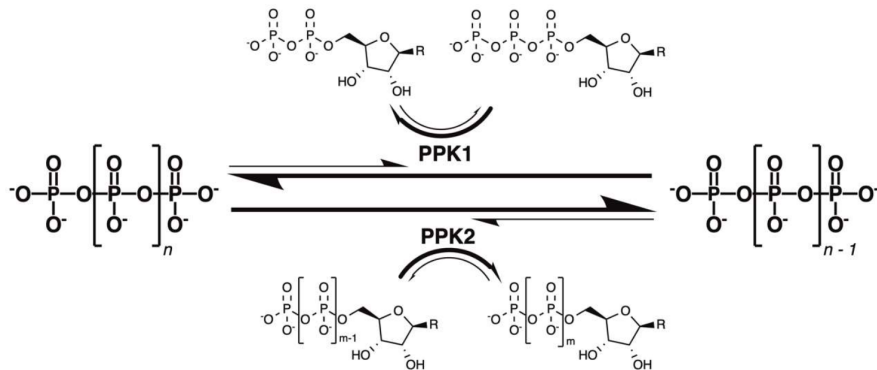
	グリーン	生産コスト	生成物精製の簡便さ
化学合成	-	低い	+++
酵素合成	+++	高い場合もある	+++
微生物合成	+	低い	+

ヌクレオチド三リン酸は高価

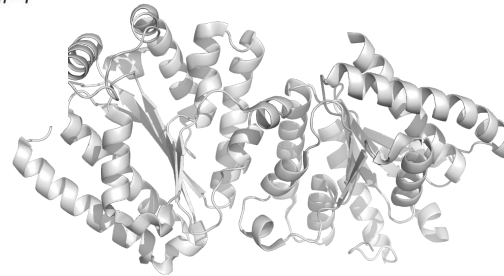
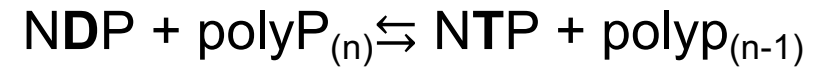


- ヌクレオチド**一リン酸**は、**三リン酸**より安価
(1/4~1/10の市場価格)
- NMPからNTPを安価に合成する方法は、市場
価値がある

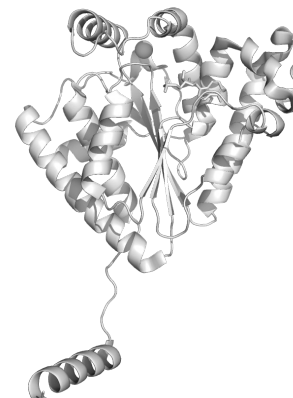
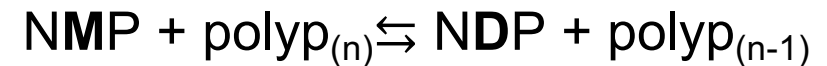
ポリリン酸キナーゼ2 (PPK2)



Class I (4YEG)



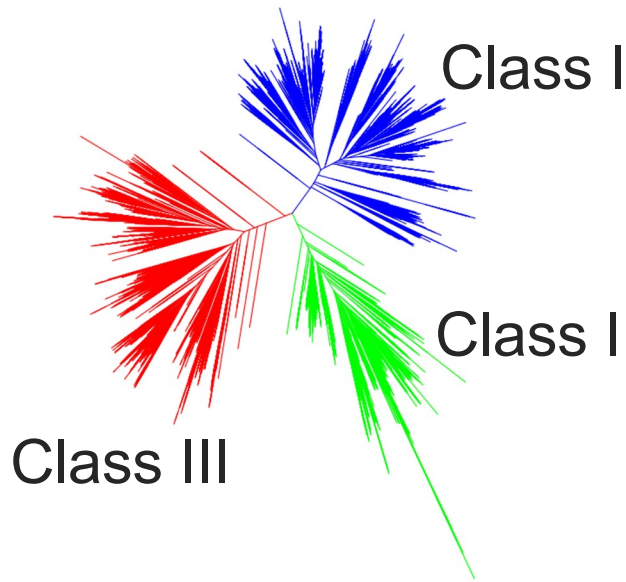
Class II (3CZP)



Class III (6ANG)



Motomura et al. *Appl Environ Microbio* 2014

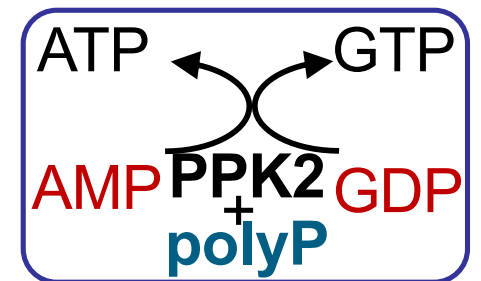
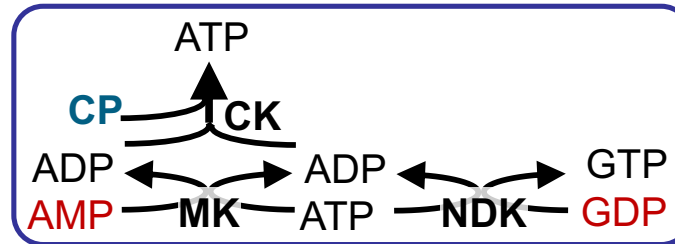
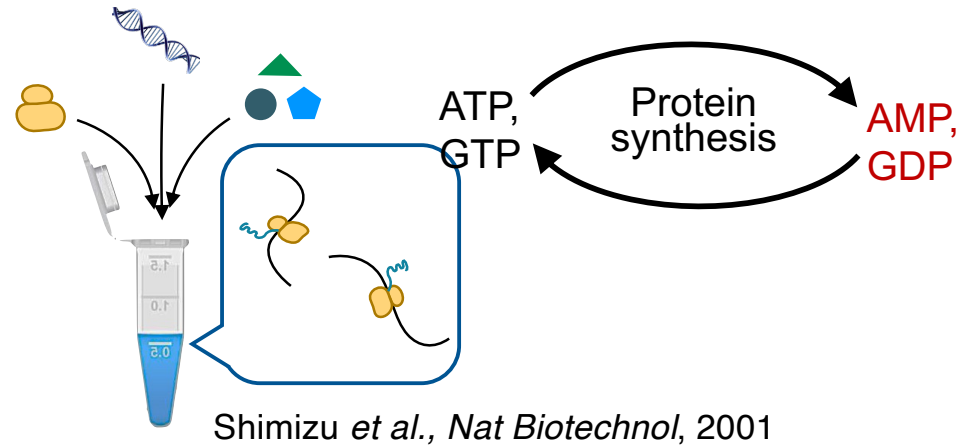
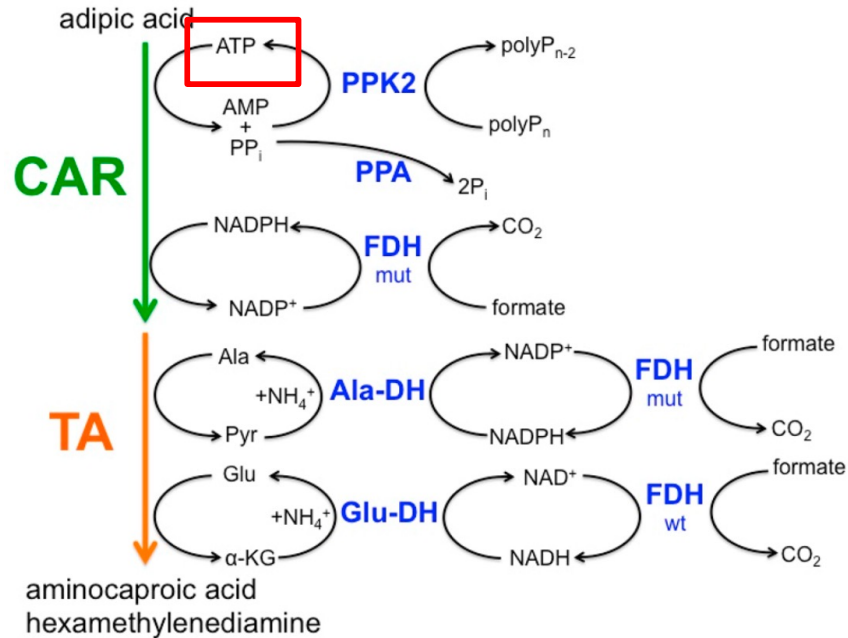


Neville et al. *Int J Mol Sci* 2022, 23 (2).

Class III PPK2 は、安価なポリリン酸を供与基質として、4種のNTPを合成できる可能性がある

Class III PPK2

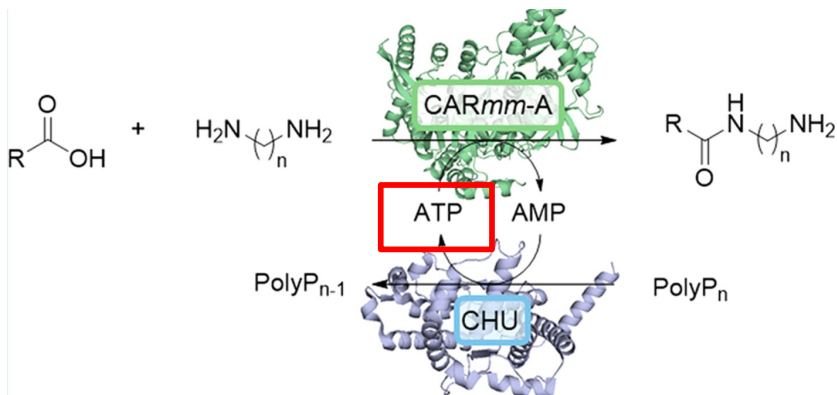
ATPの再生反応に使用されている



クレアチンリン酸
¥5000/g

Wang et al., ACS Synth Biol, 2020

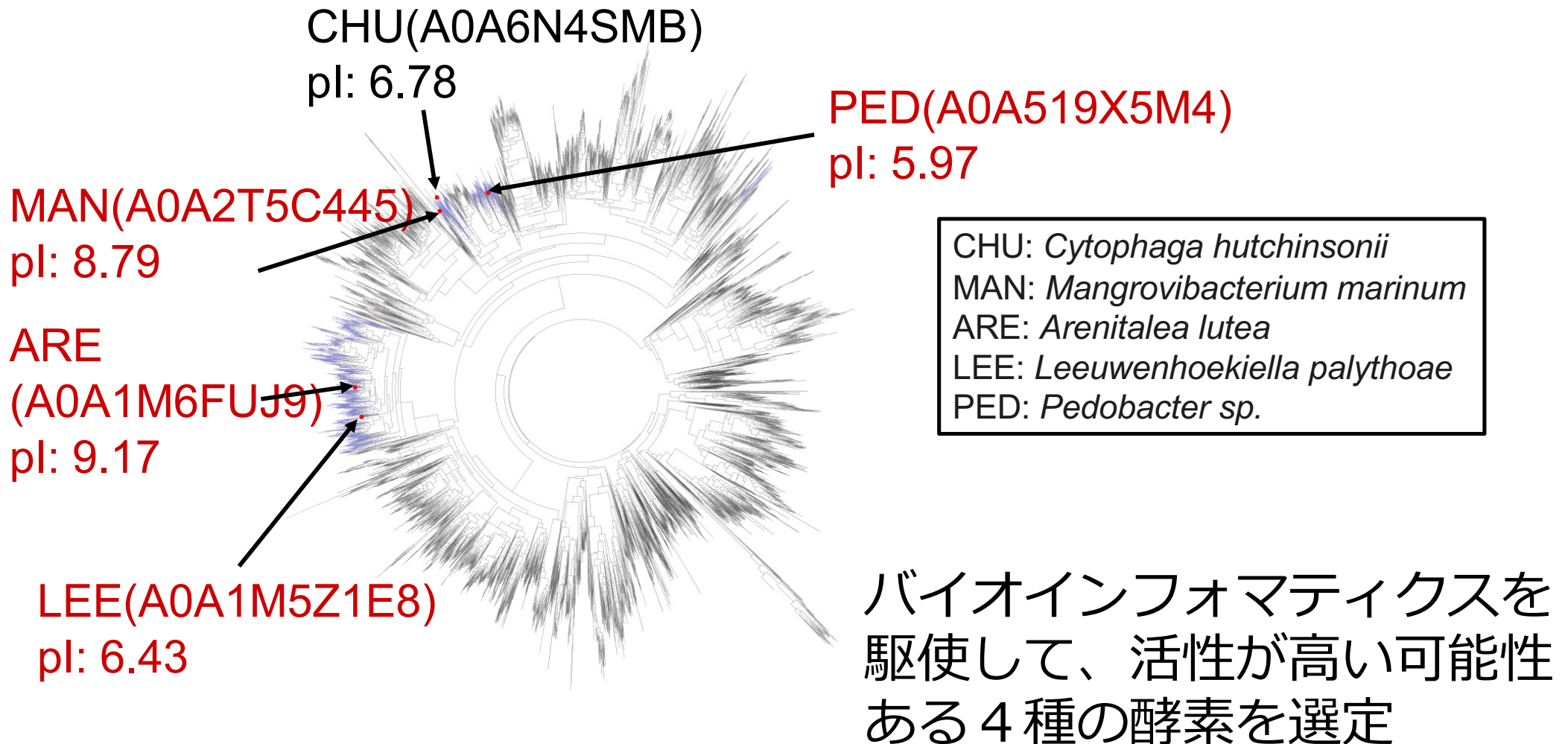
ポリリン酸
¥10/g



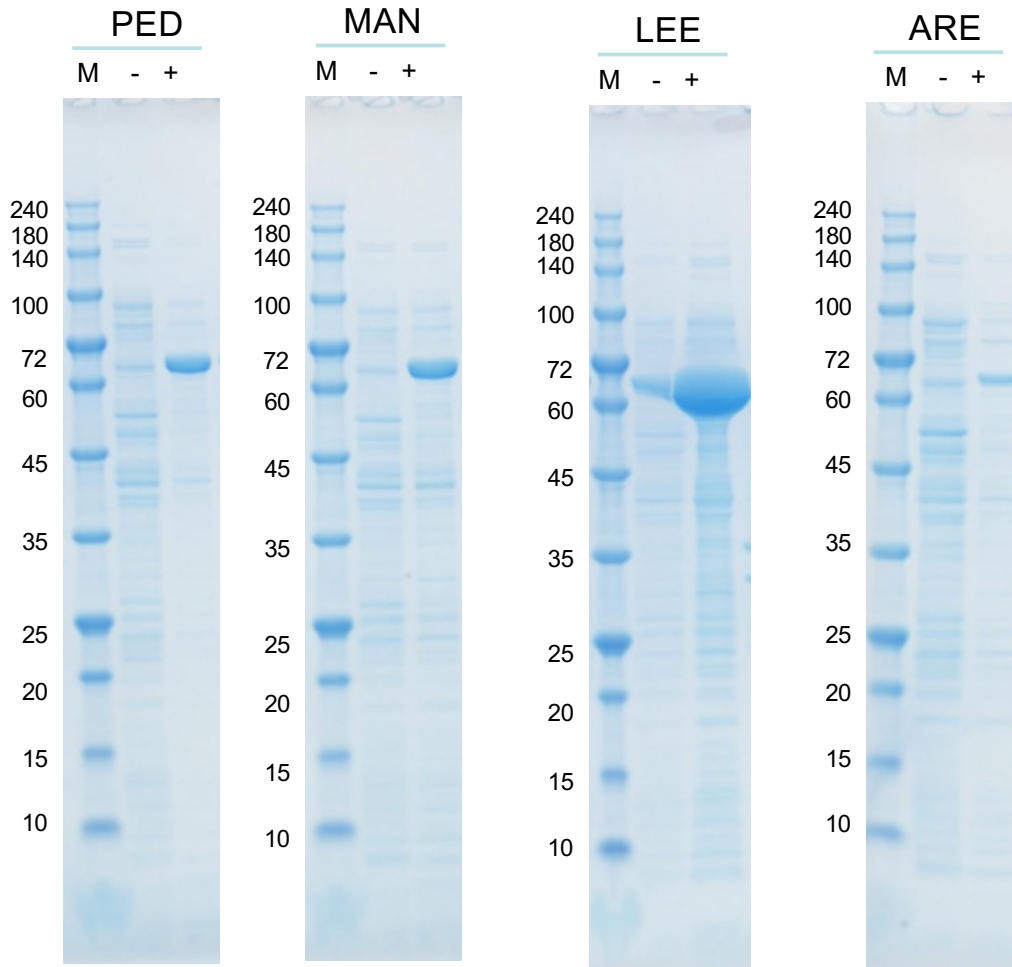
Fedorchuk, T. P. et al., *J Am Chem Soc* **2020**, *142*, 1038-1048.
Lubberink, M. et al., *ACS Catalysis* **2020**, *10*, 10005-10009.

既報では、特定種のClassIII PPK2
が使用されているが、より高活性の
酵素が存在する可能性がある

Class III PPK2



大腸菌を用いたClassIII PPK2の生産



- 大腸菌で高い発現量を示すため、酵素の製造コストも抑えることができる

M: Protein maker(multicolor)

(-) : non induction

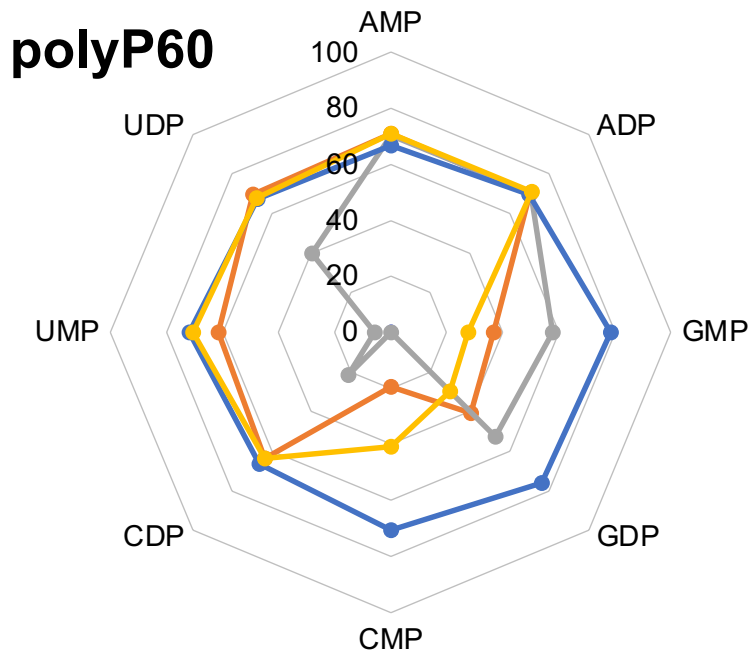
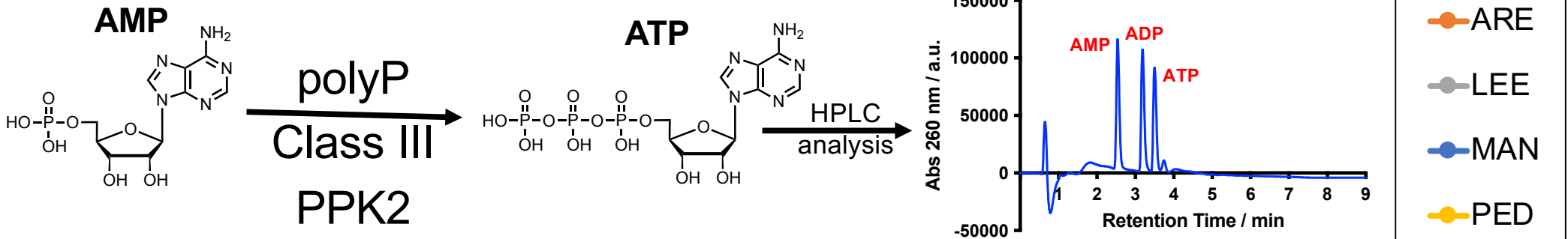
(+) : induction

WAKO Supersep Ace 10-20%

20mA cc, 1.5hr

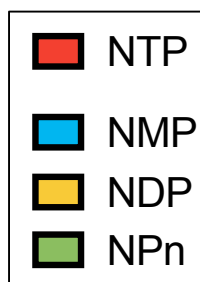
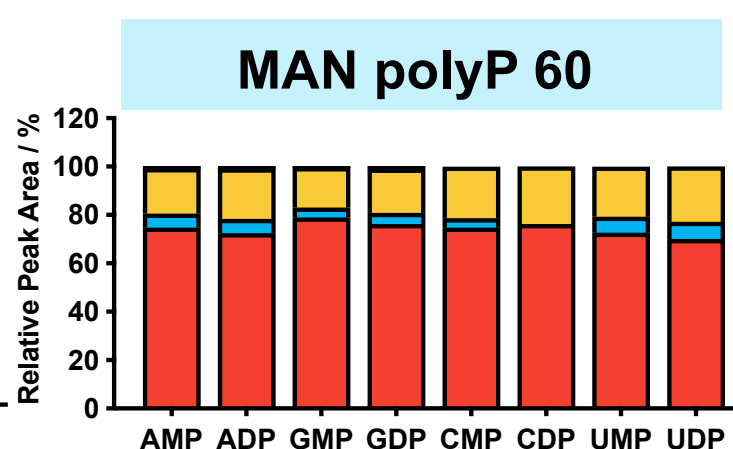
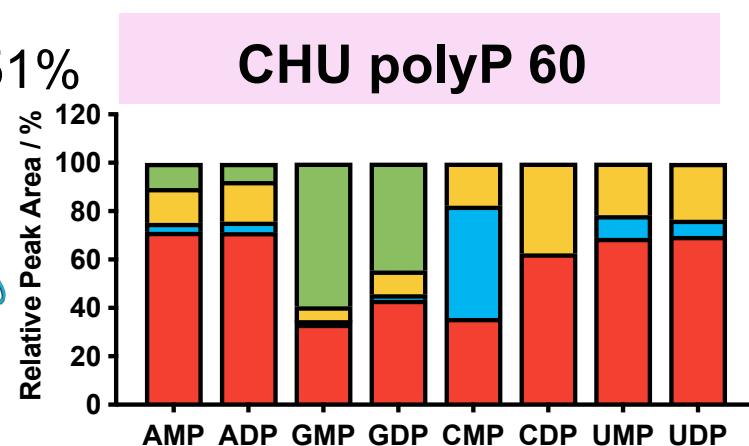
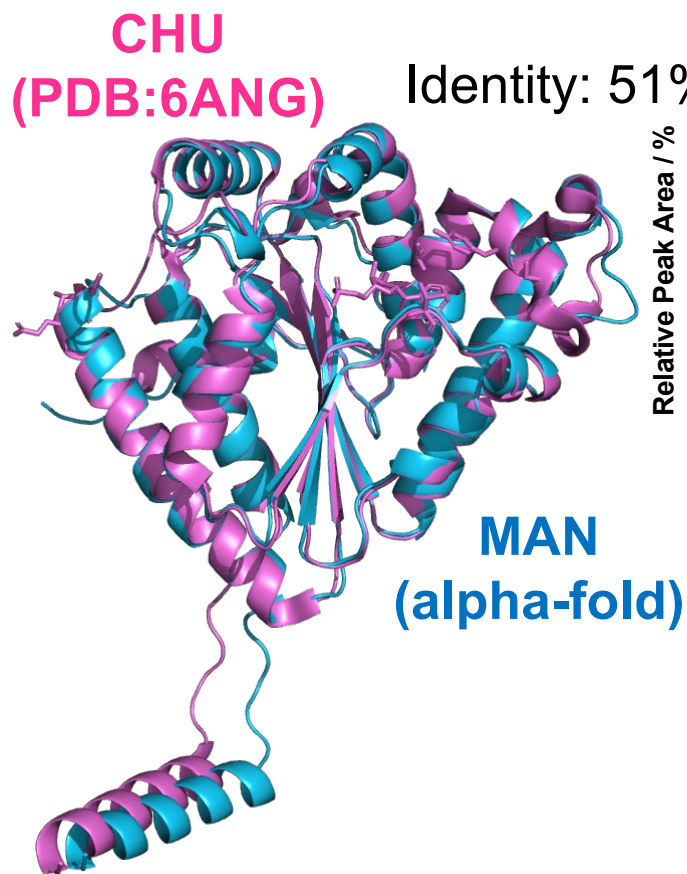
EzAqua gel stain, 90min

ヌクレオチド三リン酸合成活性



- MANは、4種のなかで最も高いNTP合成活性を示した。
- 単一酵素で全てのNDP, NMPを70-80%の効率でNTPに変換可能

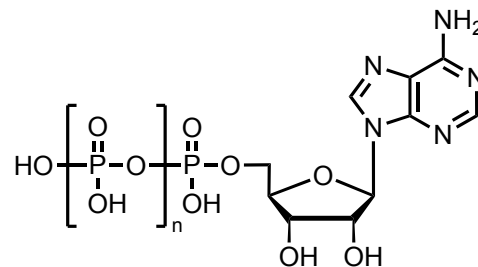
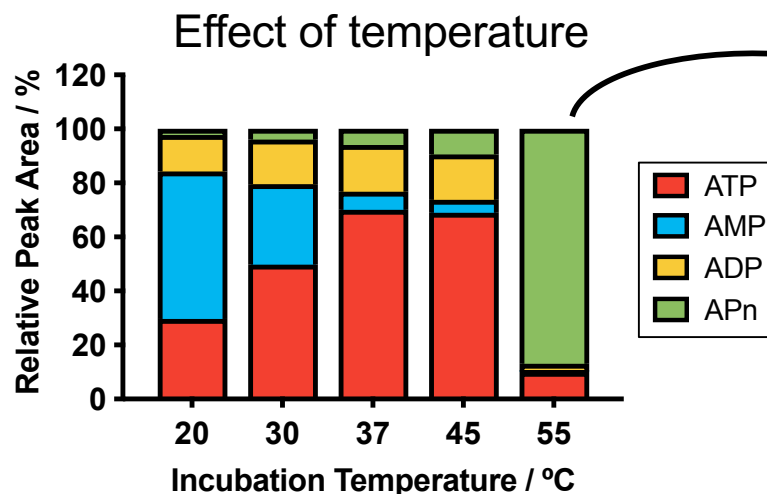
MANは既報のCHUより高活性



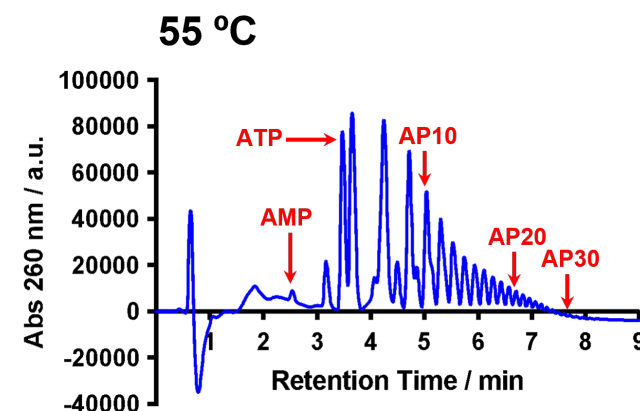
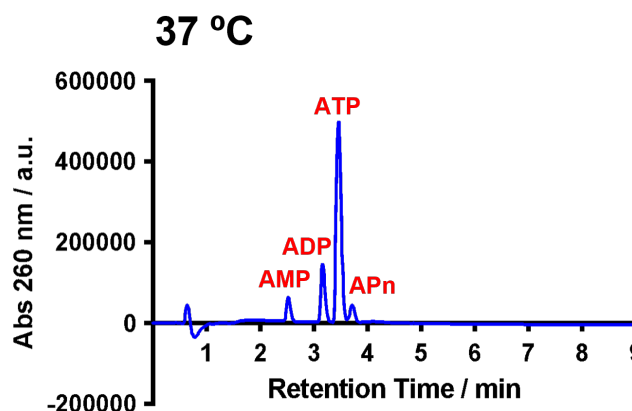
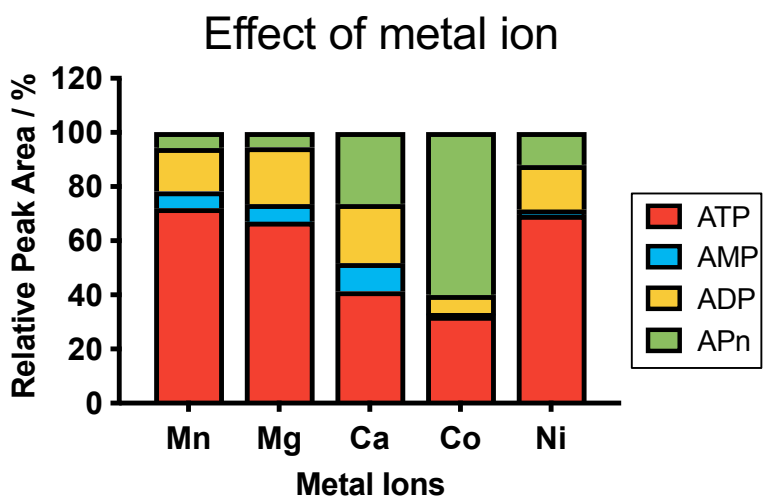
- MANは、既報のCHUより高活性
- NTP生産に他のPPKを使用している企業もある

特願2023-182220

MANはポリリン酸核酸誘導体を生成可能

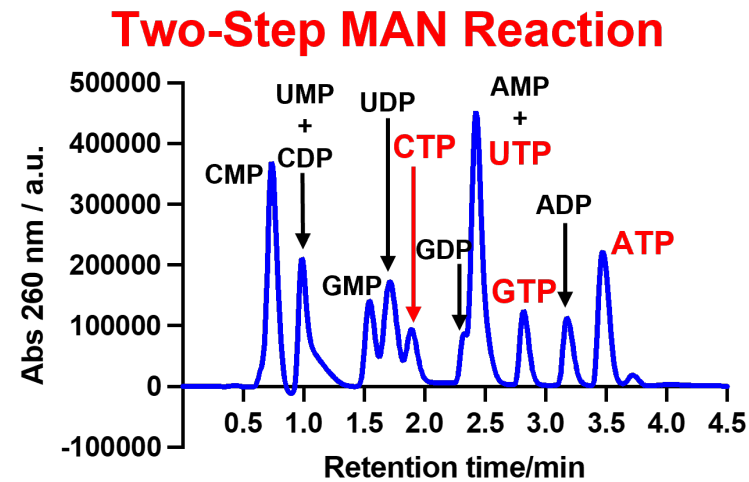
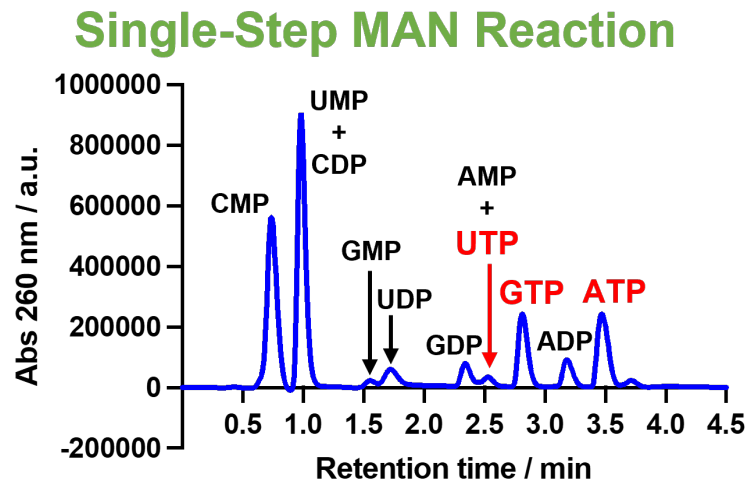
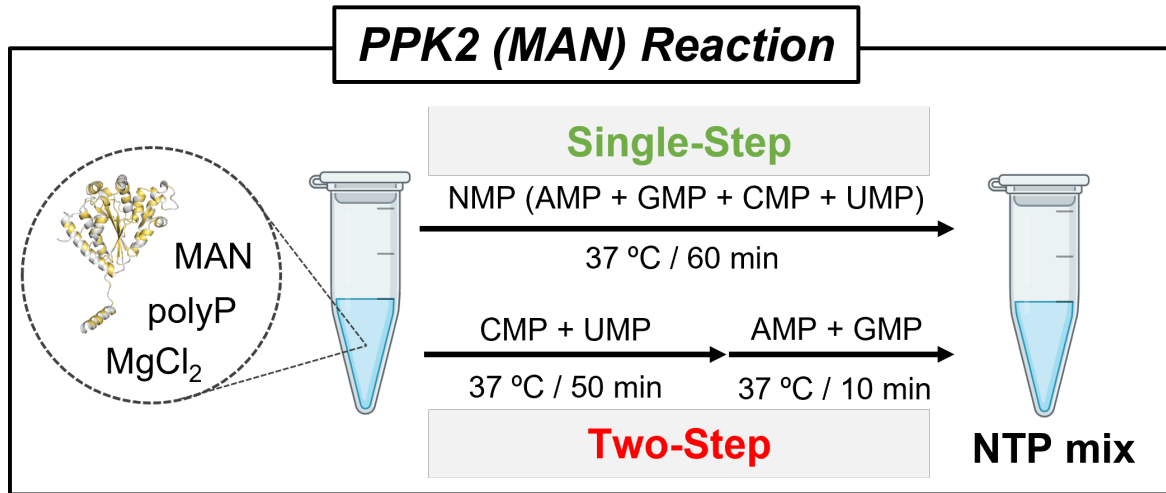


Ogawa et al., *ChemBioChem*, 2019
Mordhorst et al. *ChemBioChem*, 2019
Frank et al., *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020

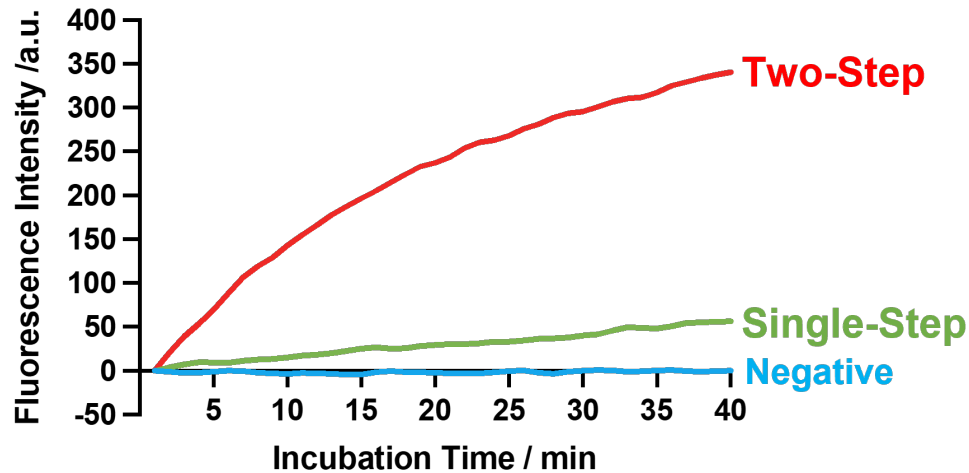
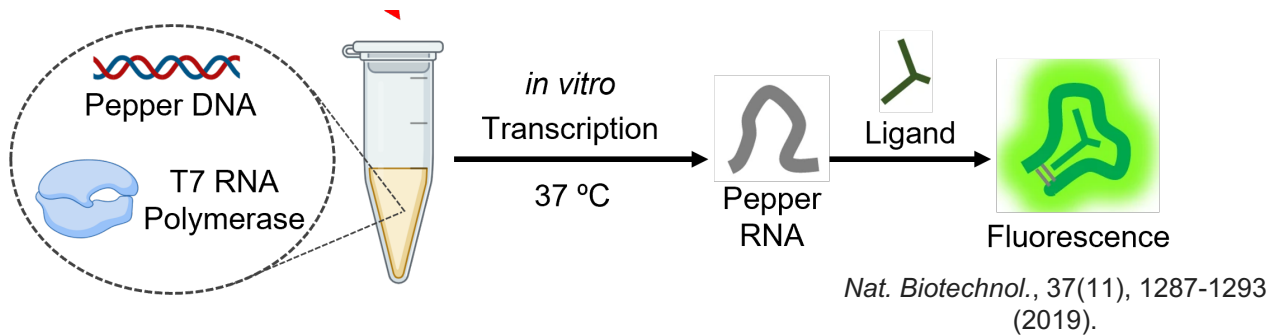


温度条件や金属イオンを調整することで、MANは世界最長のポリリン酸核酸を生成できた

MANはワンポットでNTP4種を同時生成



MANはNMPとpolyPからmRNAを生成



- MANは、安価なNMP、polyPから高付加価値のmRNAを生成可能
- 国内でのNTP生産技術基盤となる可能性がある

新技術の特徴・従来技術との比較

従来法（化学合成）

1. 微生物からRNA精製
2. ヌクレアーゼでNMPに分解
3. NMPをそれぞれ精製
4. 化学合成によりNTPに変換
5. NTPの精製

- 酵素合成は、化学合成より環境負荷が低い
- 酵素合成は、微生物合成より精製プロセスを簡素化できる
- 本技術により、安価なNMP、NDP、及びポリリン酸から、一つの酵素（MAN）でNTPを製造できる。単一プロセスでの製造が可能

今後の方向性・実用化に向けた課題

- MANは、ピリミジン塩基(C, U)よりもプリン塩基(A, G)を好むため、4種に対して同程度の k_{cat}/K_m を有する酵素の創出が課題
- 反応後のpolyPの除去方法を検討する必要あり。(PPXを検討したい)
- MANは、高価な人工塩基（主にウリジン誘導体）の生成に有用である可能性が高く、その可能性を早急に明らかにすべき

企業への期待

- 現在のNTP製造法に対する優位性の立証
- MANを用いたNTPの製造プロセスの構築
(共同研究も可能)
- 人工塩基合成ビジネスを展開する・あるいは
その予定がある企業との共同研究

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：ヌクレオシド三リン酸の製造方法
- 出願番号：特願2023-182220
- 出願人：東京工業大学
- 発明者：松浦 友亮、リアム マイケル ロンゴ、
渡邊 貴嘉、松本 龍征

産学連携の経歴

- 2012年-2013年
 - JST A-stepフュージビリティスタディステージ 探索タイプ事業に採択（カネカ株式会社と共同研究）
- 2015年-2017年
 - 第一三共と共同研究実施（TaNeDSプロジェクト）
- 2020年-現在
 - GeneFrontierと共同研究実施

お問い合わせ先

東京工業大学 研究推進部 産学連携課

TEL : 03-5734-3817

Mail : sangaku@sangaku.titech.ac.jp

URL : <https://www.ori.titech.ac.jp/>

質問事項

- 『原料のポリリン酸は化学合成品か、あるいは生物由来か。』
 - 現在使っているのは、化学合成品。生物由来も使用可能
 - ポリリン酸は食品添加物として大量に使われているため、市場で入手が容易で、安全性や価格面でメリットが高い
- 『不純物の種類、比率について生産物に起因するものと生産物に起因しないもの、それぞれの情報』
 - 反応後に通常の核酸精製方法で、精製すれば、不純物は取り除ける。
 - NTPの合成を目指す場合、不純物はNMP, NDPで総核酸に対して不純物が20-30%ほど（未精製の場合）。
 - 生産物に由来しない不純物としては供与基質のpolyPがあるが、PPXで分解すれば比較的簡便な精製方法で取り除けると考えられる。