

2023. 06. 28

第66回 AIRC セミナー 「分子設計とAI：バイオDXの最前線」

バイオDXによる物質生産の効率化

池部仁善

産業技術総合研究所 人工知能研究センター

オーミクス情報研究チーム 研究員

本日の内容

- ・ バイオDXの一例
「生物を利用した物質生産の効率化」
- ・ バイオとAIを繋ぐ橋渡しをする「MSPER法」
- ・ MSPER法の産業応用例

- 1 : 生物を利用した物質生産とその問題点
- 2 : 生物体内で物質を作る「酵素」とその改良法
- 3 : 副産物を減らすDX技術「MSPER法」
- 4 : MSPER法の産業応用例

1 : 生物を利用した物質生産とその問題点

2 : 生物体内で物質を作る「酵素」と
その改良法

3 : 副産物を減らすDX技術「MSPER法」

4 : MSPER法の産業応用例

工業製品の原料となる物質生産

物質生成法

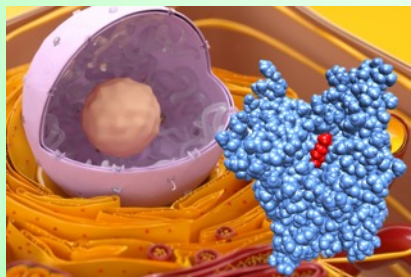
自然物から抽出



化学的に合成

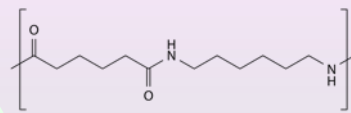
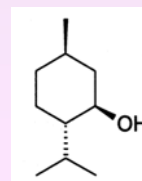


生物（酵素）を利用した物質生産

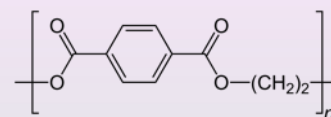


原料物質

香料



繊維



プラスチック

工業製品



自然物から抽出



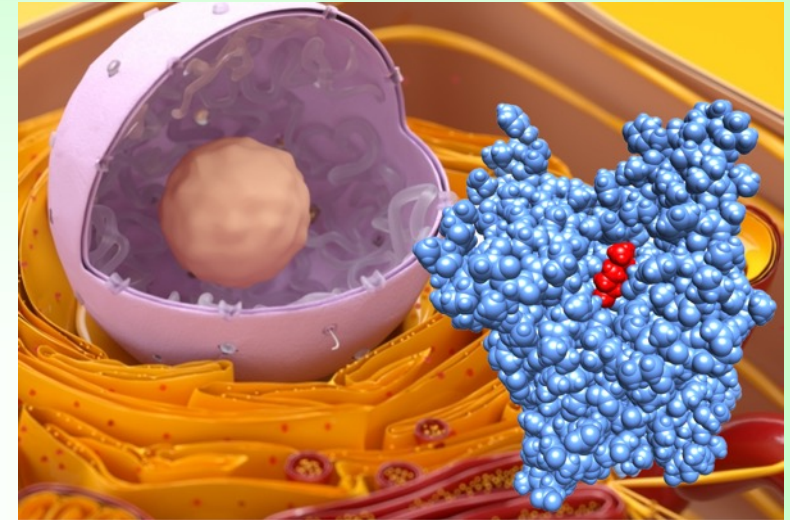
資源の枯渇
天候など外的要因
作付け面積、設備投資
栽培、採掘にかかる人件費

化学的に合成



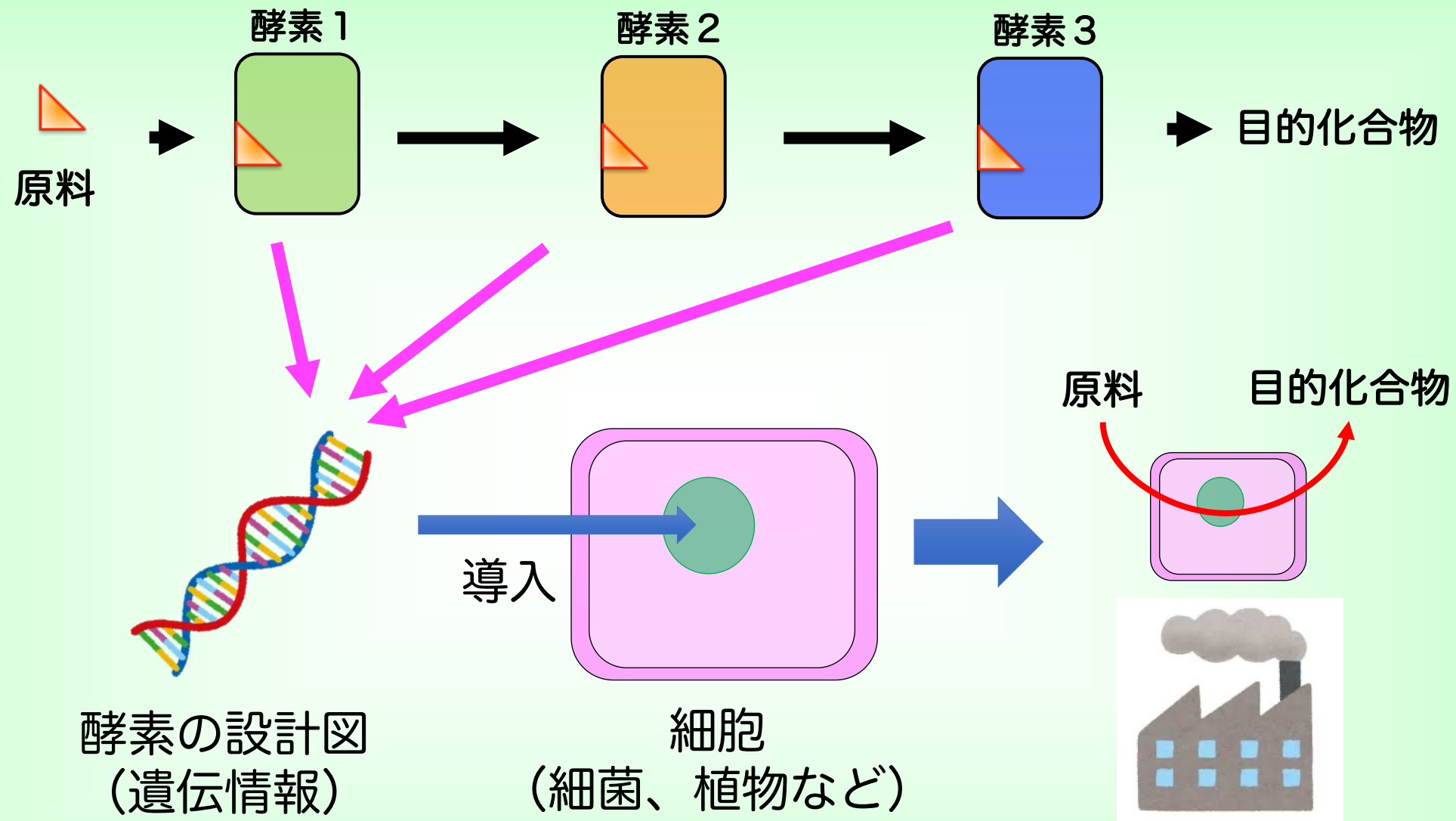
激しいエネルギー消費
有害物質の生成（環境負荷が高い）
大規模設備

生物（酵素）を利用した物質生産



省エネルギー
環境負荷の低減
実験室レベルの小規模施設
天候などの外部要因の影響を受けづらい
資源の有効活用

従来の方法と比べて大きなメリット！！



生物による「物質生産工場」が実現可能に！！

NEDO スマートセルプロジェクト（2016~2020年度）

「生物細胞が持つ物質生産能力を人工的に最大限まで引き出し、最適化した細胞（スマートセル）」
 の設計図をデザインするデジタル技術と、設計図を具現化するバイオ技術の開発

NEDOプロジェクトの概念図

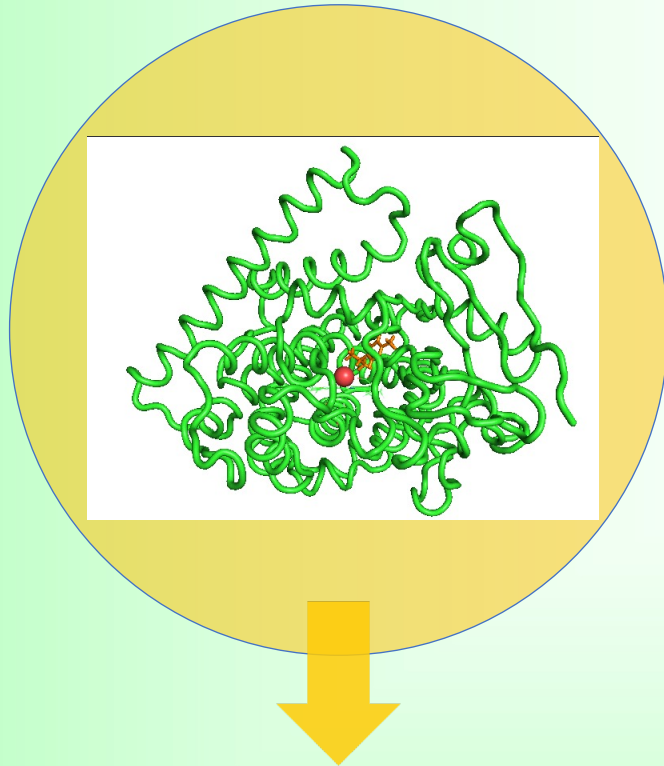


国際連合広報センター ホームページより引用

なぜ酵素を改変する必要があるのか？

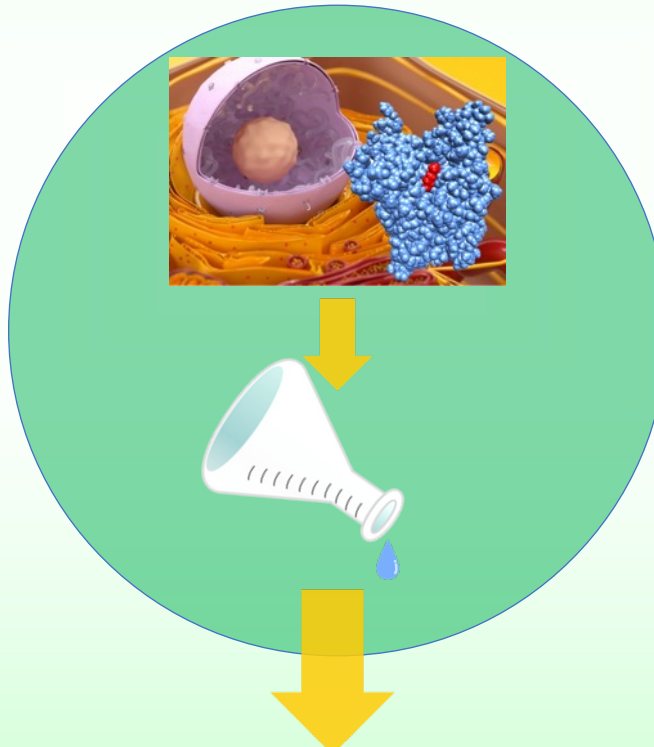
生物が持つ酵素（野生型酵素）をそのまま使うと...

酵素が壊れやすくて
産業利用しづらい



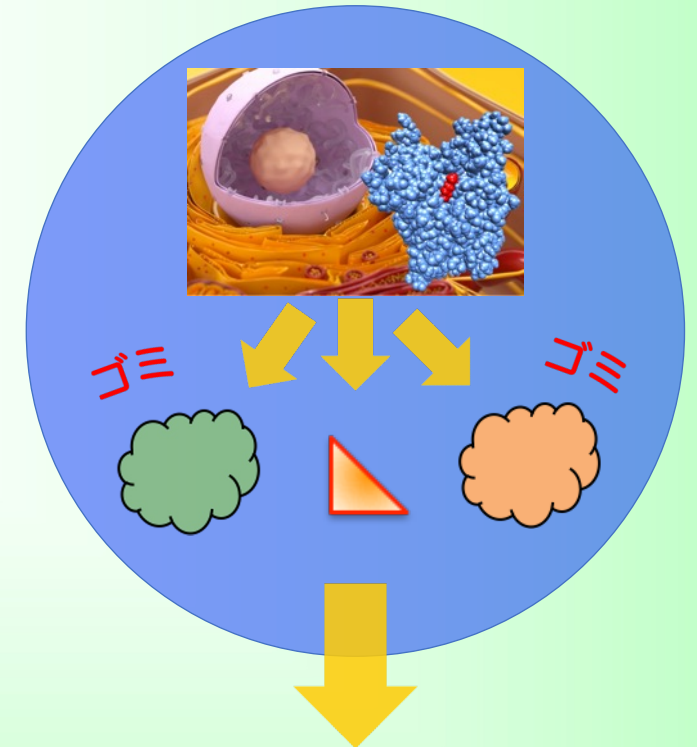
酵素安定性の向上

産業利用するには
物質生産量が少ない



物質生産量の向上

いらない物質（副産物）も
同時にできてしまう



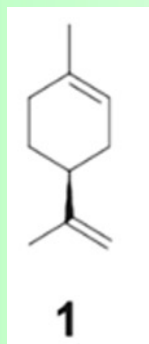
副産物生成の低減

私の研究課題：目的生成物の生産を維持しながら、副産物の生産を抑える

研究実例： 香料（6、12）の生成

原料

(S)-(-)-リモネン



レモンの香りの主成分

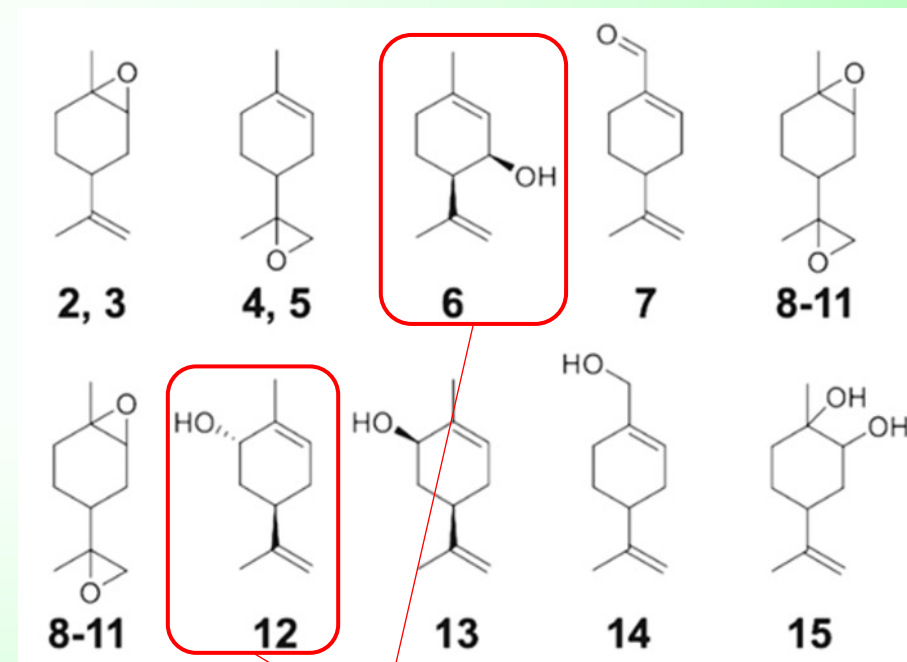
酵素

P450



酸素 (O) を付加する
化学反応

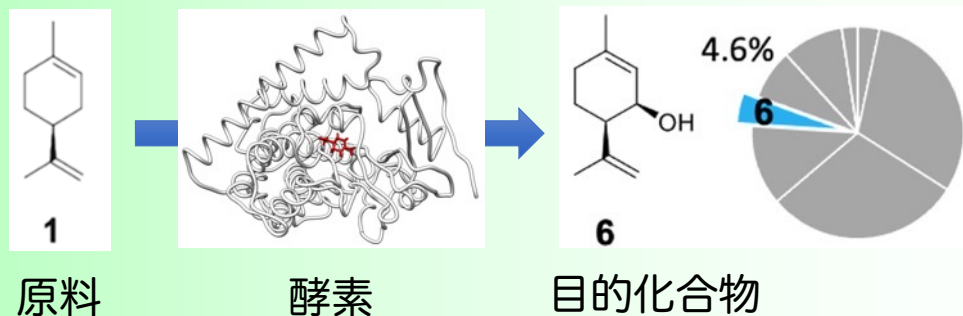
反応生成物



目的化合物

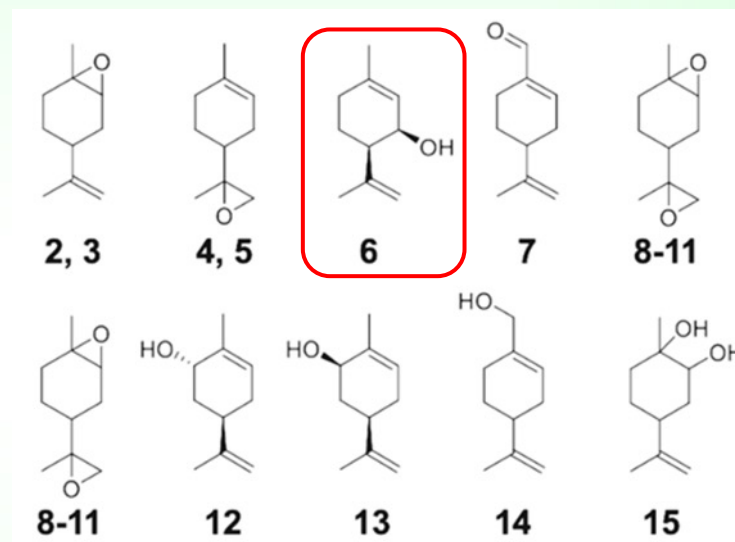
副産物ができるデメリット

1：原料が無駄に使われる



約95%が
無駄に

2：品質の低下

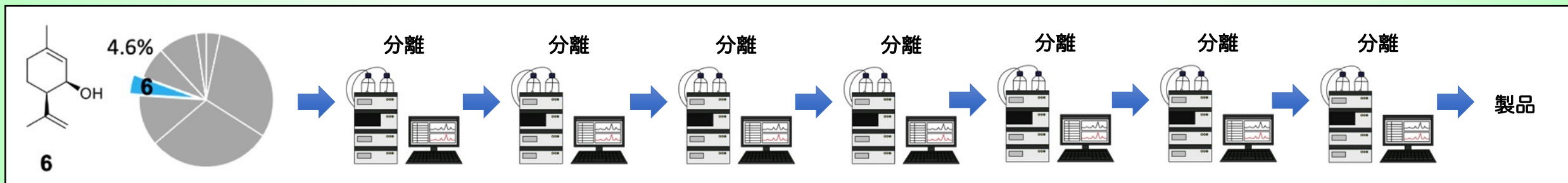


目的化合物：
オレンジの香り
+

副産物：
ミントの香り
キャラウェイの香り
カビの臭い
・
・

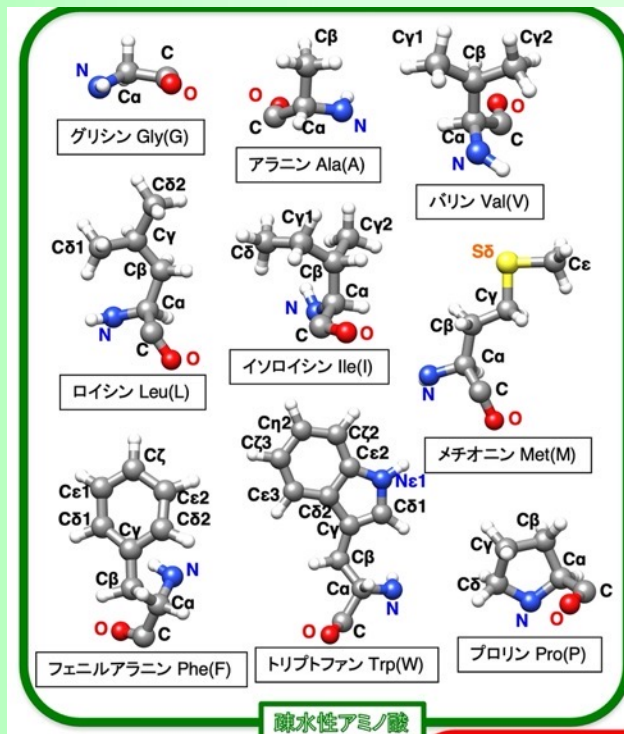
売り物にならない！！

3：分離作業でコストが上がる

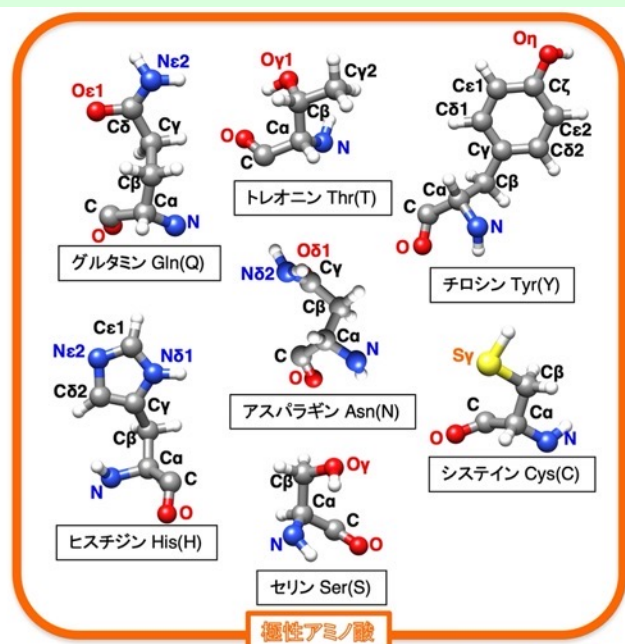


- 1 : 生物を利用した物質生産とその問題点
- 2 : 生物体内で物質を作る「酵素」とその改良法
- 3 : 副産物を減らすDX技術「MSPER法」
- 4 : MSPER法の産業応用例

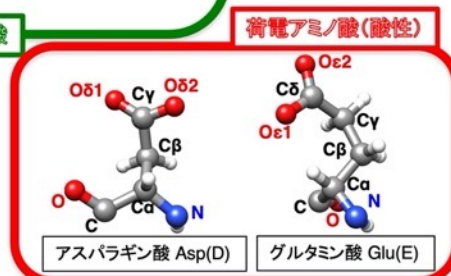
酵素改変 ～部品を変えて機能を変える～



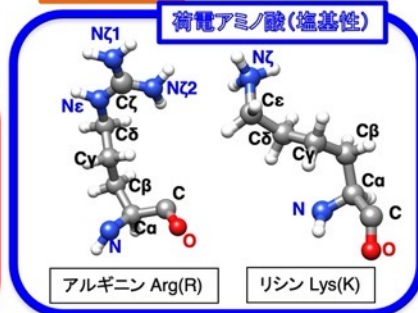
疎水性アミノ酸



極性アミノ酸

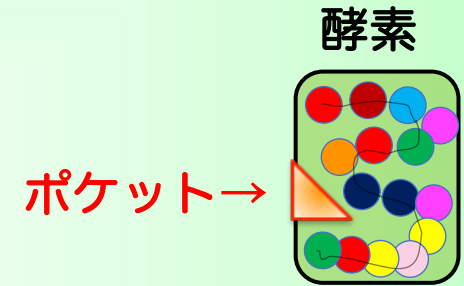
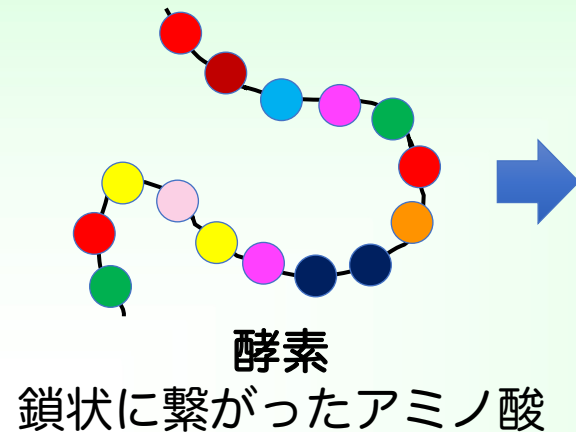


荷電アミノ酸(酸性)

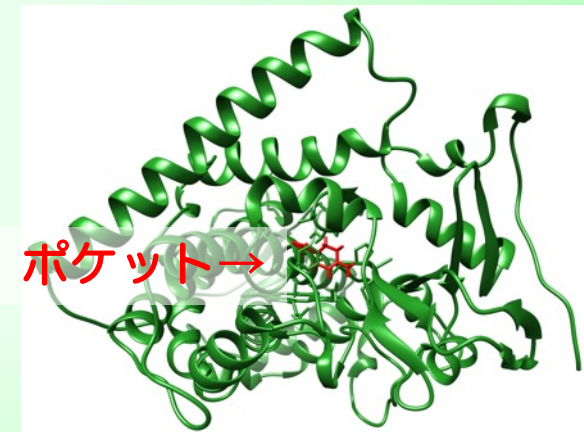
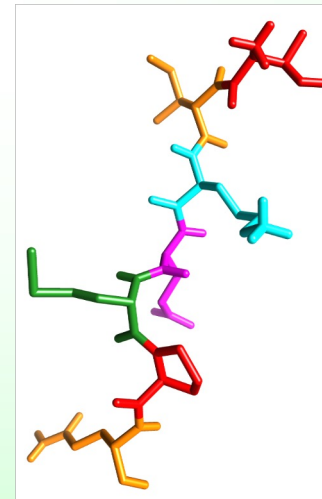


荷電アミノ酸(塩基性)

酵素の部品
20種類のアミノ酸



酵素の立体構造形成
ポケットの形によって
機能が変化する

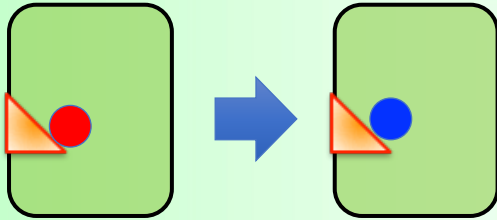


酵素改変 → 部品のアミノ酸を別の種類に変えた「変異体酵素」を作製
→ ポケットの形が変わり、機能が変化する

455個のアミノ酸からなる
酵素 P450 の場合...

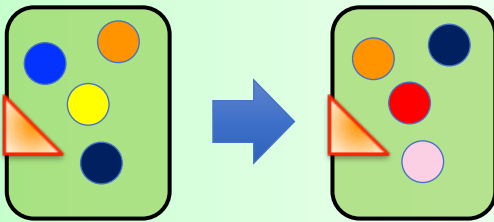
効率的に酵素改変を行うためには

変異 1 箇所



$455 \text{箇所} \times 19 \text{種} = 8,645 \text{通り}$

変異 4 箇所

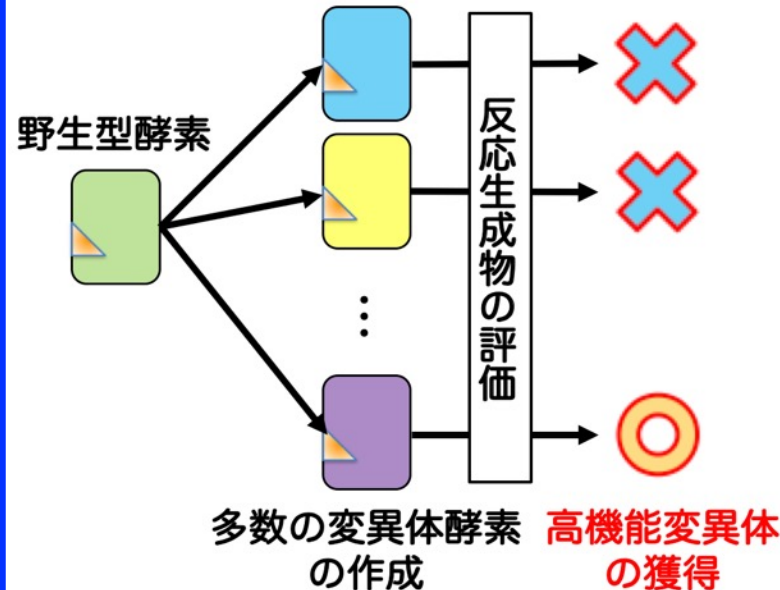


$455 C_4 \times 19^4 \doteq 2.30 \times 10^{14} \text{通り}$



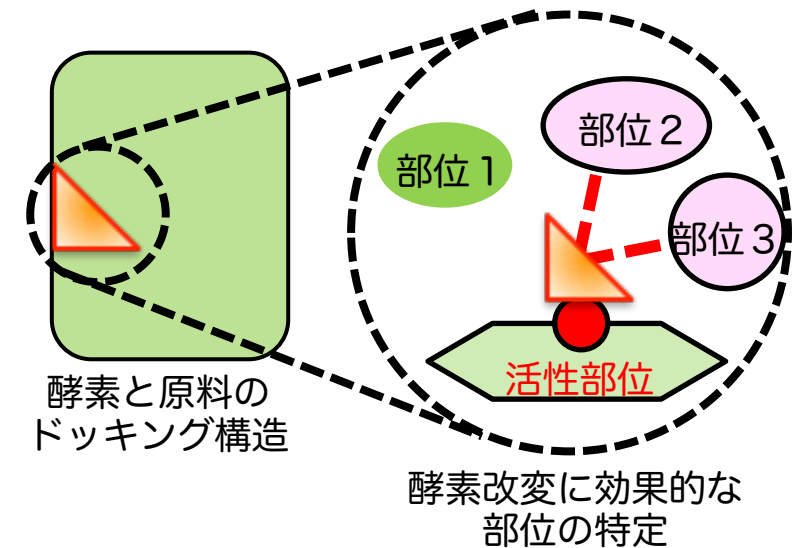
変異体の数は
指数関数的に増大

従来の酵素改変法
(指向性進化法)



多数の変異体を作製、評価
→ 多大な時間・労力・費用必要

我々の酵素改変法



事前に変異箇所を予測
→ 実験する変異体数を大幅に削減

副産物抑制においてAIを適用しづらい理由

酵素の安定性向上の場合

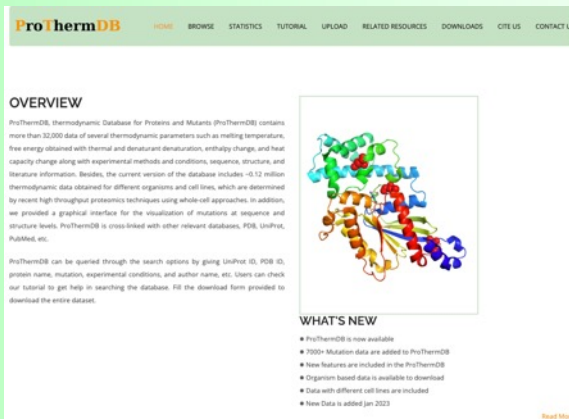
酵素の安定性 $\equiv$ 酵素の柔らかさ



多くの酵素にとって**共通の性質**

酵素（タンパク質）の
安定性データベース
ProTherm

人工知能へ適用



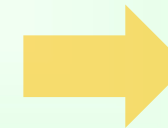
副産物抑制の場合

酵素反応によってできる生成物



各酵素、原料に**固有の問題**

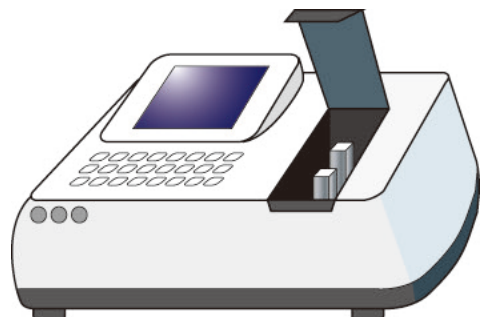
有効なデータベースがない 人工知能へ適用できない



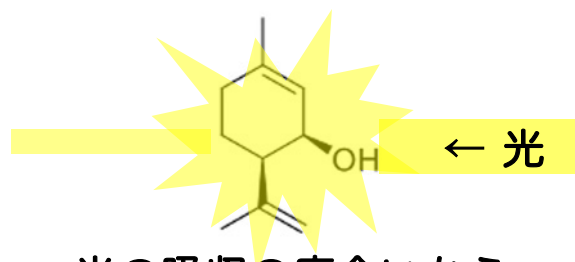
有効なデータベースがない

物質生産量向上の場合

検証実験：生成物の量を測定



分光光度法



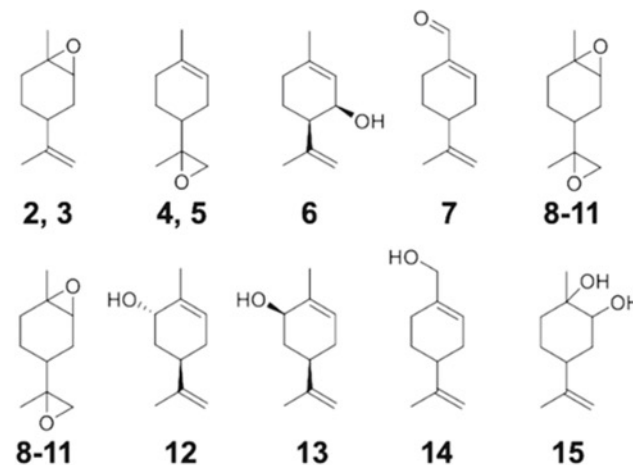
光の吸収の度合いから
生成物の量を測定

↓
ハイスループットな解析

機械で自動的に数百～数千の実験が可能

副産物抑制の場合

検証実験：各生成物を分離して
それぞれの量を測定



大きさ、質量、構成する原子の種類
全てが同じ化合物



LC/MS
GC/MS

↓
ロースループットな解析
(たくさんの実験ができない)

1～2ヶ月で数十種

データベースを作るのが難しい

酵素の副産物生成率を減少させる「MSPER 法」

バイオ実験と AI の橋渡しとなる技術

www.nature.com/scientificreports

scientific reports

OPEN Enzyme modification using mutation site prediction method for enhancing the regioselectivity of substrate reaction sites

Jinzen Ikebe¹, Munenori Suzuki², Aya Komori², Kaito Kobayashi¹ & Tomoshi Kameda^{1✉}

Enzymes with low regioselectivity of substrate reaction sites may produce multiple products from a single substrate. When a target product is produced industrially using these enzymes, the production of non-target products (byproducts) causes adverse effects such as increased processing costs for purification and the amount of raw material. Thus it is required the development of modified enzymes to reduce the amount of byproducts' production. In this paper, we report a method called mutation site prediction for enhancing the regioselectivity of substrate reaction sites (MSPER). MSPER takes conformational data for docking poses of an enzyme and a substrate as input and automatically generates a ranked list of mutation sites to destabilize docking poses for byproducts while maintaining those for target products in silico. We applied MSPER to the enzyme cytochrome P450 CYP102A1 (BM3) and the two substrates to enhance the regioselectivity for four target products with different reaction sites. The 13 of the total 14 top-ranked mutation sites predicted by MSPER for the four target products succeeded in selectively enhancing the regioselectivity up to 6.4-fold. The results indicate that MSPER can distinguish differences of substrate structures and the reaction sites, and can accurately predict mutation sites to enhance regioselectivity without selection by directed evolution screening.

J. Ikebe, M. Suzuki, A. Komori, K. Kobayashi, and T. Kameda
Sci. Rep. (2021) 11:19004



バイオ実験



MSPER

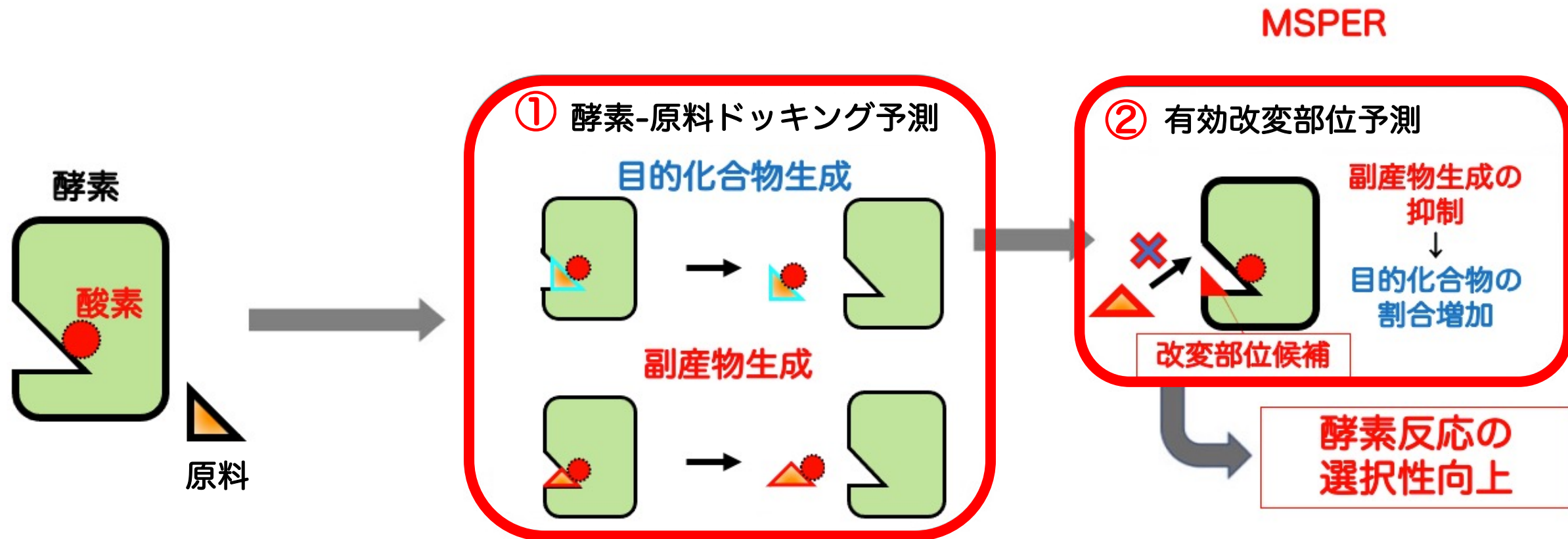


AI

Mutation Site Prediction method for Enhancing the Regioselectivity of substrate reaction sites (MSPER)

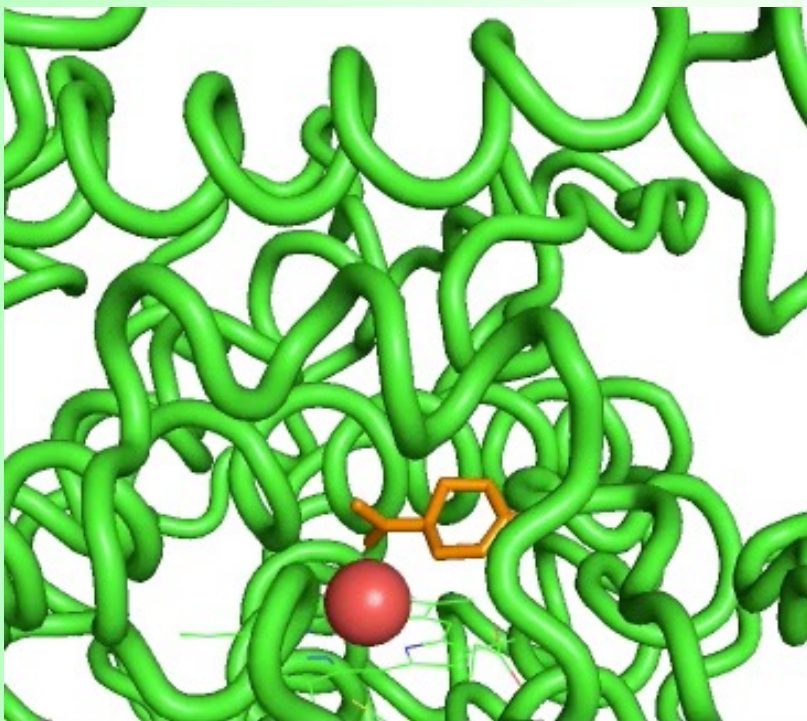
- 1 : 生物を利用した物質生産とその問題点
- 2 : 生物体内で物質を作る「酵素」とその改良法
- 3 : 副産物を減らすDX技術「MSPER法」
- 4 : MSPER法の産業応用例

副産物を減らすための 2つのステップ

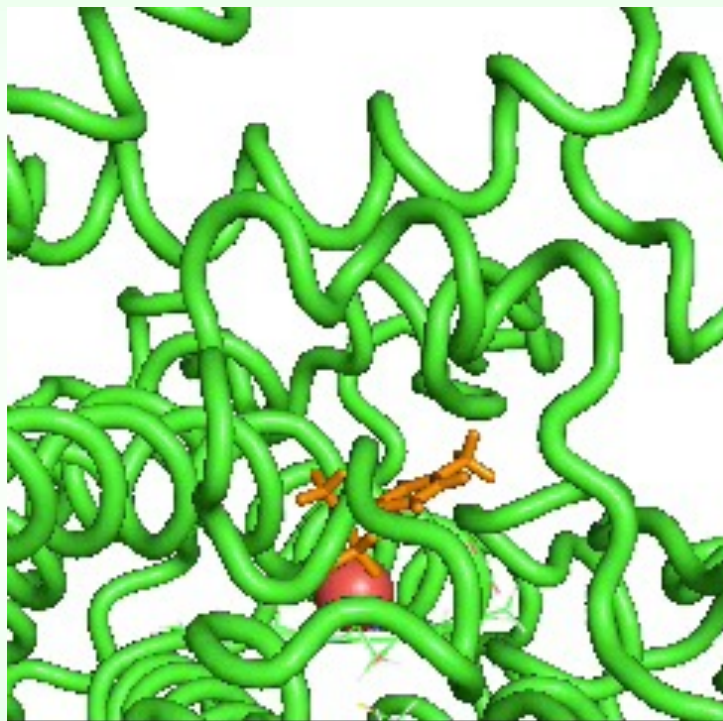


ステップ1：酵素-原料ドッキング構造予測

ドッキングシミュレーション

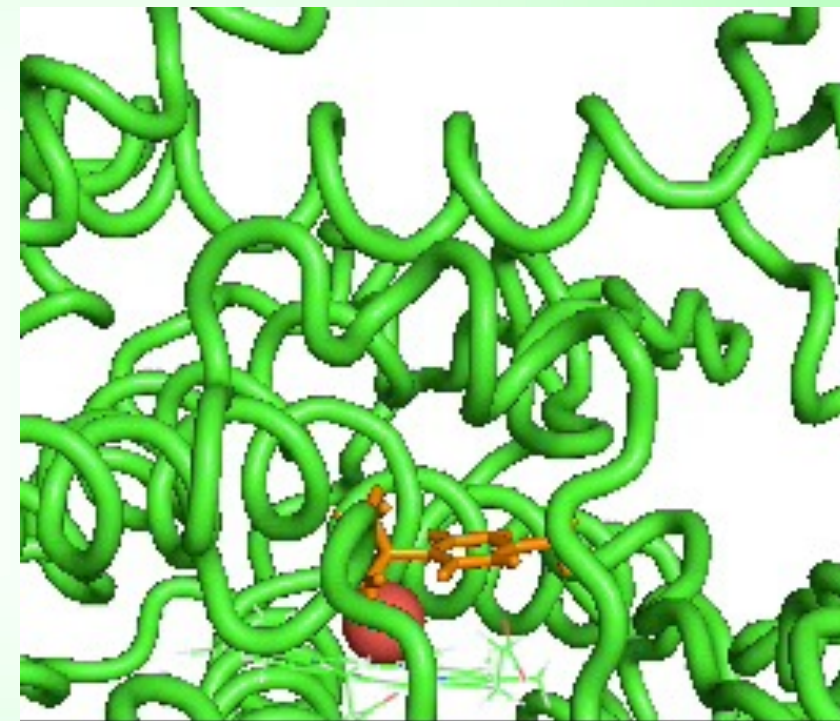


分子動力学 (MD)
シミュレーション



ALSD シミュレーション

J. Ikebe, S. Sakuraba, H. Kono (2014) *J. Comput. Chem.* 35:39-50



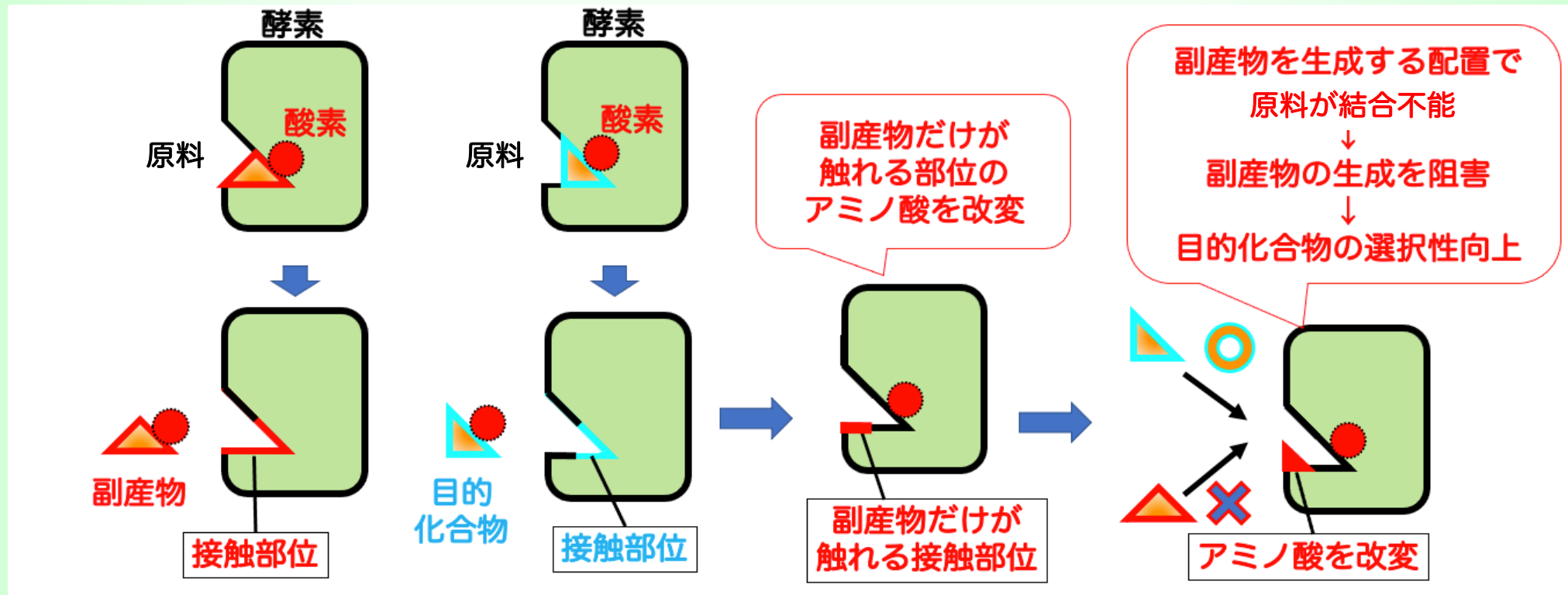
	ドッキング	MD	ALSD
酵素・原料の構造変化	×	○	◎
計算時間	◎	×	○

緑：酵素
赤：活性部位
橙：原料

ステップ2：酵素改変部位予測（MSPER 法）

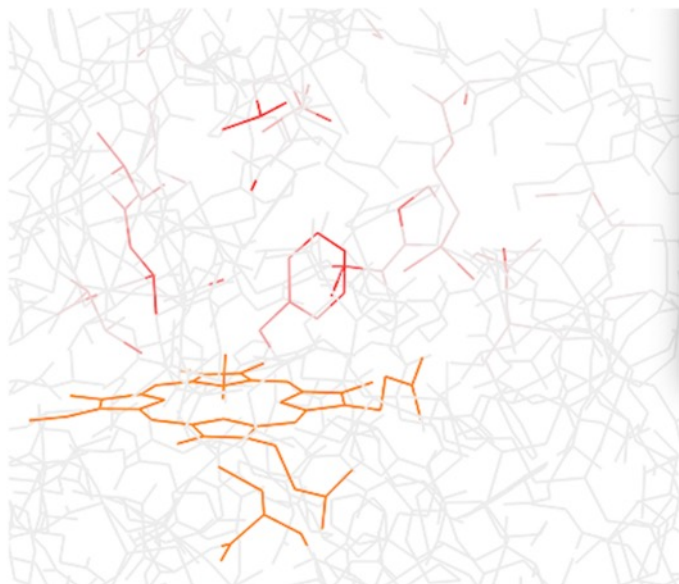
MSPER のコンセプト

ドッキング構造形成時に原料と接触する酵素のアミノ酸置換→ 生成量減少



目的化合物の生成をできるだけ維持しながら
副産物の生成を妨害できる変異部位を自動的に提案

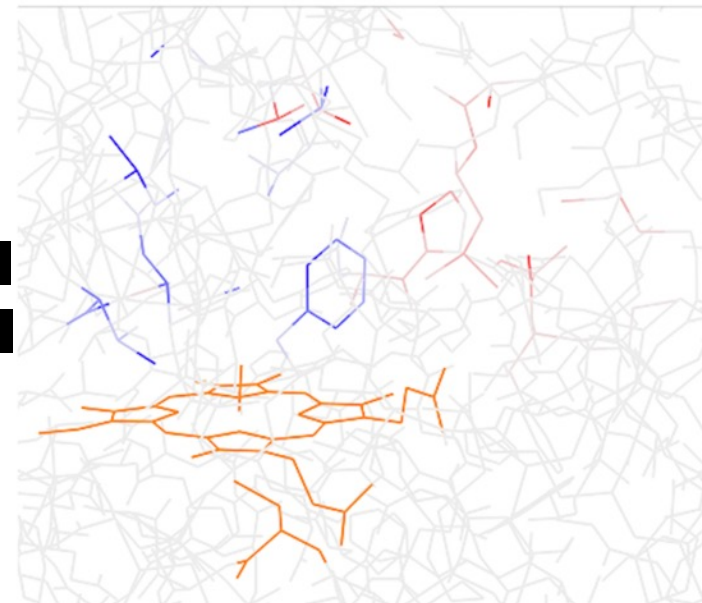
副産物生成時に接触する部位



目的化合物生成時に接触する部位



2つの接触率の差



0.0  +1.0

接触率

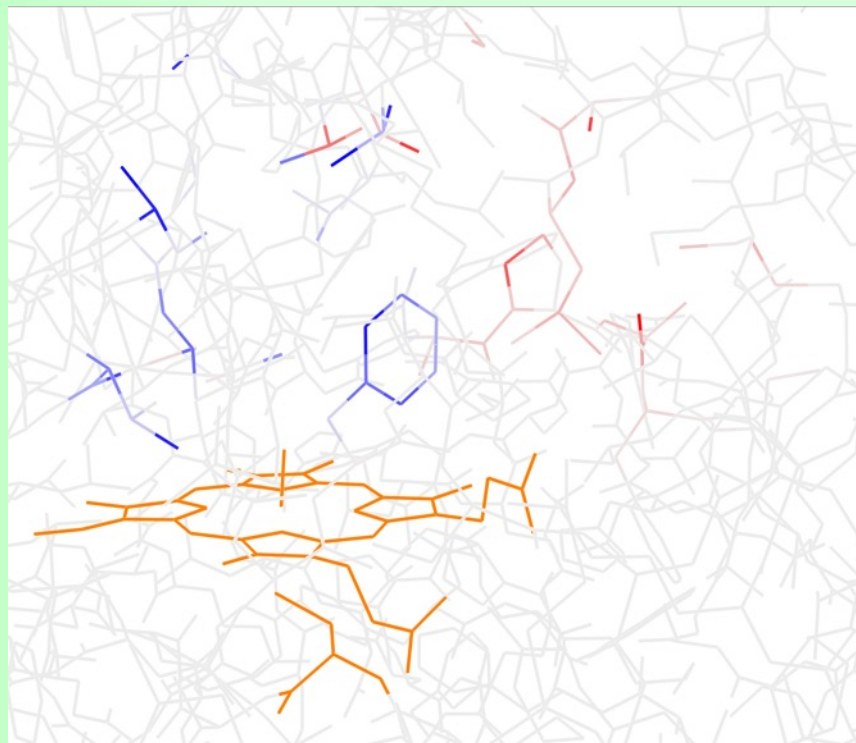
橙：P450 中の活性部位

-0.5  +0.5

接触率の差

↓
赤い部位に優先的に変異を導入

副産物抑制のための 変異導入部位ランキングリスト



接触率の差
(副産物 - 目的化合物)



目的化合物生成の
不安定化

副産物生成の
不安定化

J. Ikebe, M. Suzuki, A. Komori, K. Kobayashi,
and T. Kameda. *Sci. Rep.* (2021) 11:19004

Residue name	Ranking average	S _{scr} ranking		S _{scr}	
		1	2	1	2
A330	1.5	1	2	0.806	0.855
L75	2.5	4	1	0.492	1.266
P329	3.5	3	4	0.508	0.654
L437	3.5	2	5	0.599	0.640
A74	4.0	5	3	0.460	0.667
A328	7.0	8	6	0.145	0.588
M354	7.5	7	8	0.156	0.323
S72	8.5	10	7	0.086	0.381
F331	9.5	9	10	0.091	0.050
S332	10.0	11	9	0.031	0.073
T436	13.0	12	14	0.007	0.001
K69	13.5	15	12	0.001	0.006
G83	16.0	18	14	0.000	0.001
I259	16.0	18	14	0.000	0.001
M177	16.0	18	14	0.000	0.001
V26	16.0	18	14	0.000	0.001
L188	16.5	14	19	0.002	0.000
G265	17.0	15	19	0.001	0.000
I357	17.0	15	19	0.001	0.000
M185	224.0	6	442	0.173	-0.574
A82	225.0	439	11	-0.009	0.034
T88	226.5	13	440	0.004	-0.040
H266	227.5	18	437	0.000	-0.001
T268	228.0	443	13	-0.184	0.005
F81	438.5	438	439	-0.007	-0.035
T327	439.5	441	438	-0.036	-0.023
E267	442.0	440	444	-0.025	-0.794
T438	442.5	442	443	-0.152	-0.700
V78	443.5	446	441	-1.035	-0.437
L181	445.0	445	445	-0.431	-0.867
A264	445.5	444	447	-0.410	-1.147
T260	447.0	448	446	-1.246	-0.954
I263	447.5	447	448	-1.156	-2.268
F87	449.0	449	449	-1.592	-3.286

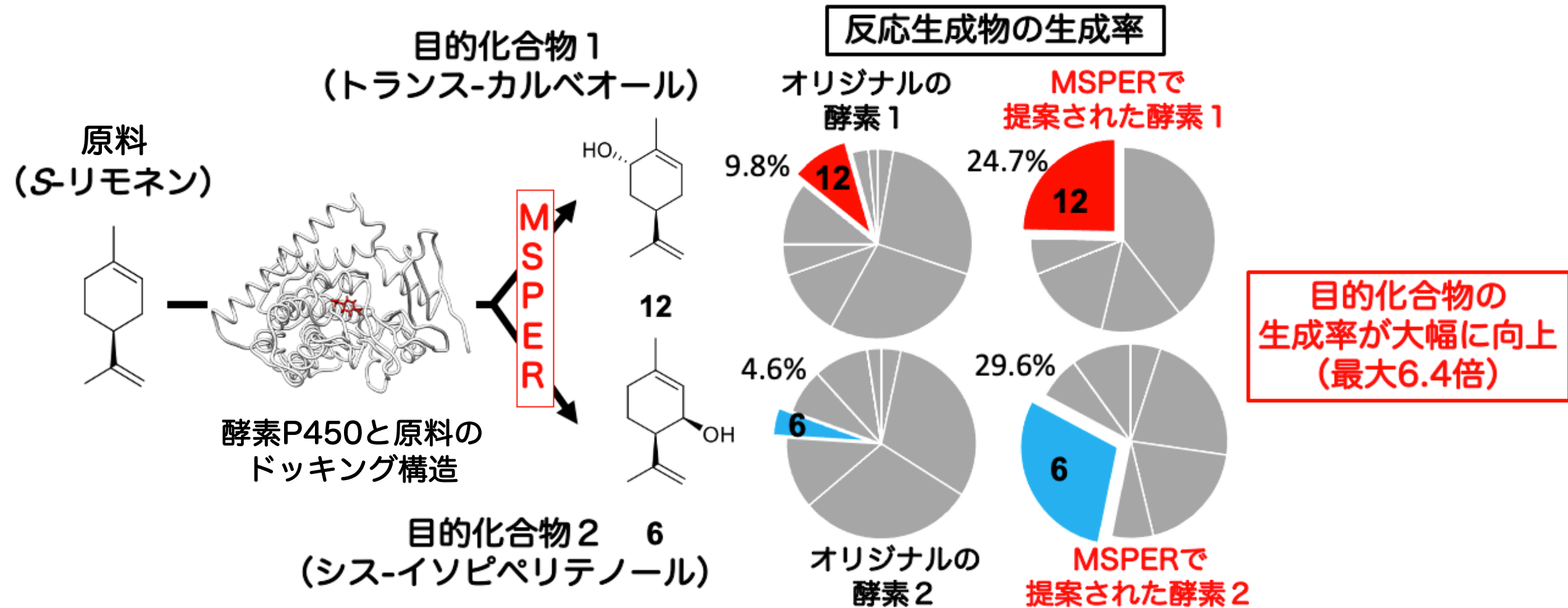
変異 1 箇所の変異体を作成



上位 4 つの変異箇所
目的化合物の生成率が向上
(43/76 変異体)

Sample	S _{scr} ranking average	12 (%)
WT		9.8 ± 0.1
A330P	1.5	16.1 ± 0.1
L75F	2.5	13.3 ± 0.4
P329L	3.5	22.5 ± 0.3
L437F	3.5	24.7 ± 0.2

下位 3 つの変異箇所全てで
目的化合物の生成率が減少
(55/57 変異体)

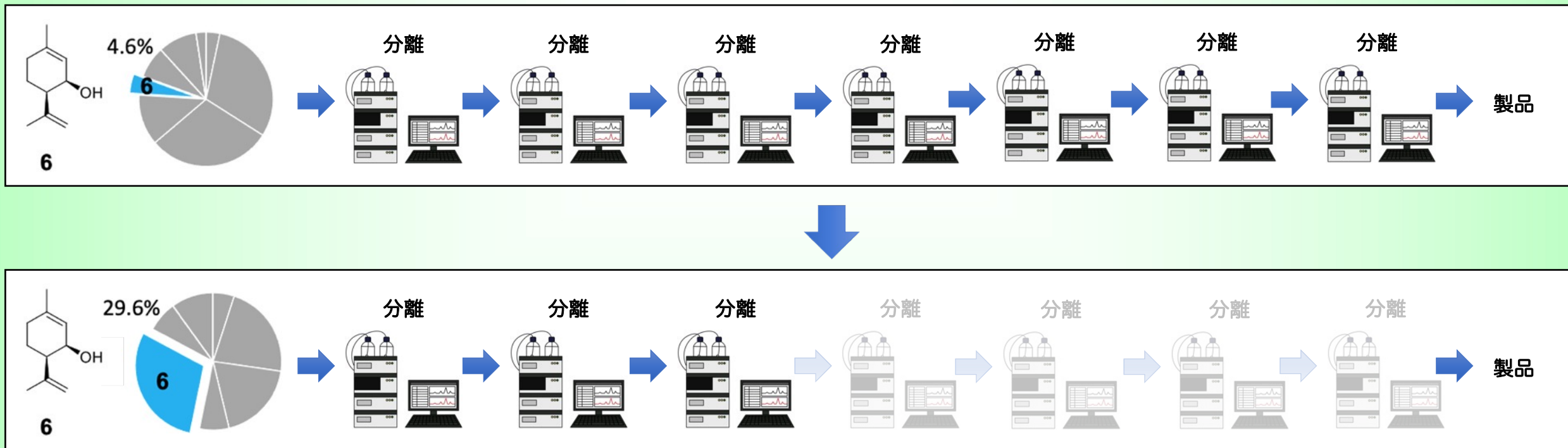


変異を入れるべき効果的な場所を高精度に予測

従来法（指向性進化法）と比べて...

変異体実験数 : 1/170 ~ 1/1000
開発時間 : 1年半 → 2ヶ月半
生成に用いる原料 : 1/6

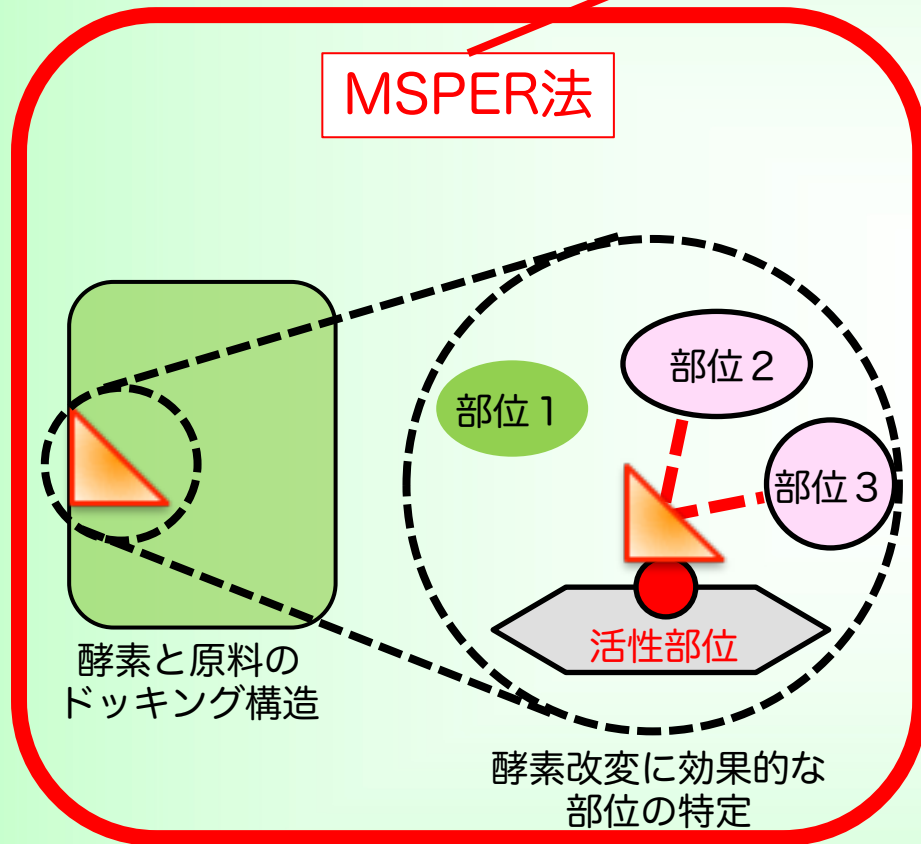
分離作業も7回から3回に



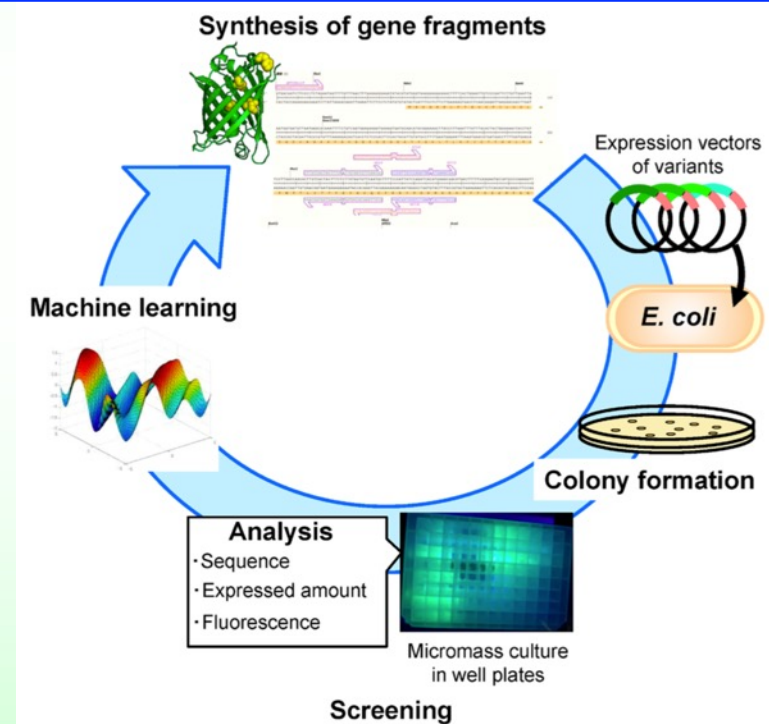
MSPER と AI の併用

酵素のどの部位を何の種類のアミノ酸に変えるべきか

MSPER法



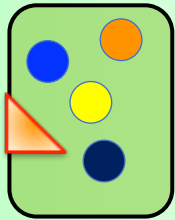
オーミクス 齋藤主任研究員らによる
AI（ベイズ最適化）による酵素改変技術



Yutaka Saito, *et. al.* (2018) *ACS Synth. Biol.* 7, 9, :2014-2022

酵素のどの部位を改変すれば良いかを予測

最大4箇所に変異を導入する例...



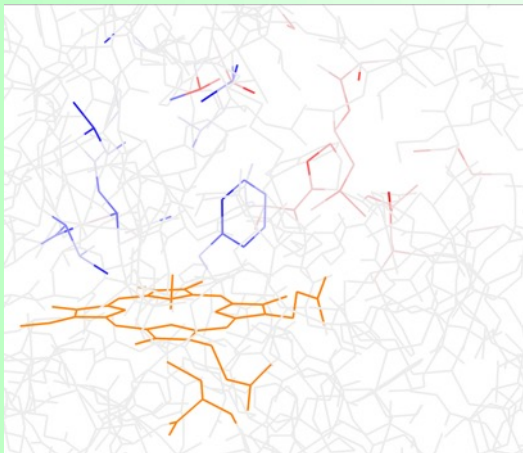
全変異体パターン

$${}_{455}C_4 \times 20^4 \doteq 2.82 \times 10^{14} \text{通り}$$



① 改変する部位の決定

MSPER ランキングの上位部位



Residue name	Ranking average	S _{seq} ranking	1	2	S _{seq} 1	S _{seq} 2
A330	1.5	1	2		0.806	0.855
L75	2.5	4	1		0.492	1.266
P329	3.5	3	4		0.508	0.654
L437	3.5	2	5		0.599	0.640
A74	4.0	5	3		0.460	0.667
A328	7.0	8	6		0.145	0.588
M354	7.5	7	8		0.156	0.323
S72	8.5	10	7		0.086	0.381
F331	9.5	9	10		0.091	0.050
S332	10.0	11	9		0.031	0.073
T436	13.0	12	14		0.007	0.001
K69	13.5	15	12		0.001	0.006
G83	16.0	18	14		0.000	0.001
G59	16.0	18	14		0.000	0.001
M777	16.0	18	14		0.000	0.001
V26	16.0	18	14		0.000	0.001
L188	16.5	14	19		0.002	0.000
G265	17.0	15	19		0.001	0.000
G57	17.0	15	19		0.001	0.000
M185	224.0	6	442		0.173	-0.574
A82	225.0	439	11		-0.009	0.034
T88	226.5	13	440		0.004	-0.040
H266	227.5	18	437		0.000	-0.001
T268	228.0	443	13		-0.184	0.005
F81	438.5	438	439		-0.007	-0.035
T327	439.5	441	438		-0.036	-0.023
E267	442.0	440	444		-0.025	-0.794
T438	442.5	442	443		-0.152	-0.700
V78	443.5	446	441		-1.035	-0.437
L181	445.0	445	445		-0.431	-0.867
A264	445.5	444	447		-0.410	-1.147
T260	447.0	448	446		-1.246	-0.954
G63	447.5	447	448		-1.156	-2.268
F87	449.0	449	449		-1.592	-3.286

$$20^4 = 160,000 \text{ 通り}$$

MSPER の検証実験結果

オリジナル酵素 : 1 種

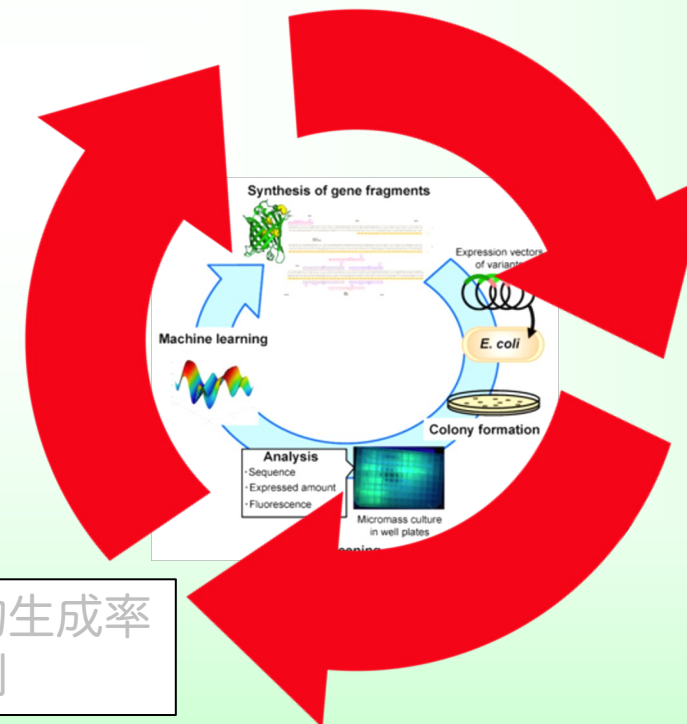
1 箇所変異 : 7 6 種

(追加) 2 箇所変異 : 5 3 種

計

1 3 0 種 (0.08%)

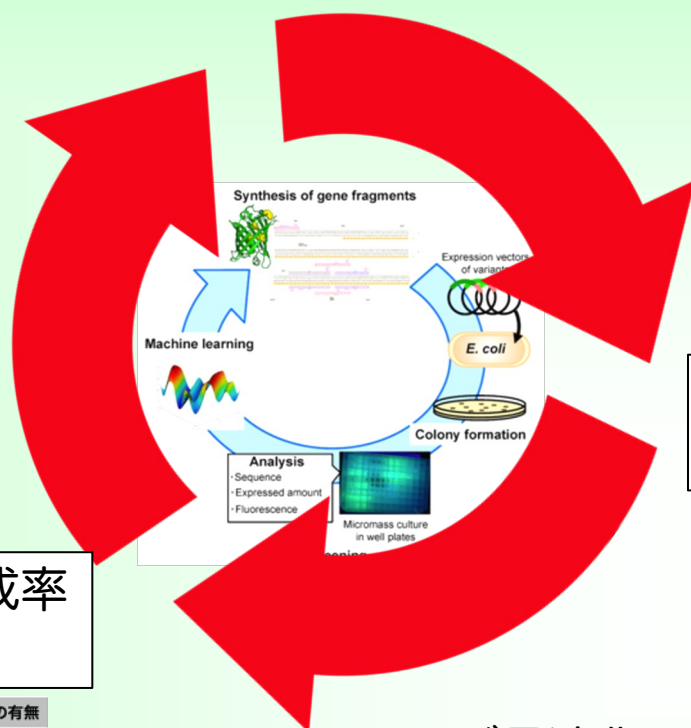
② 機械学習用実験データの作成



③ 特徴ベクトルの作成とベイズ最適化

④ 目的化合物生成率
スコア予測

② 機械学習用実験データの作成



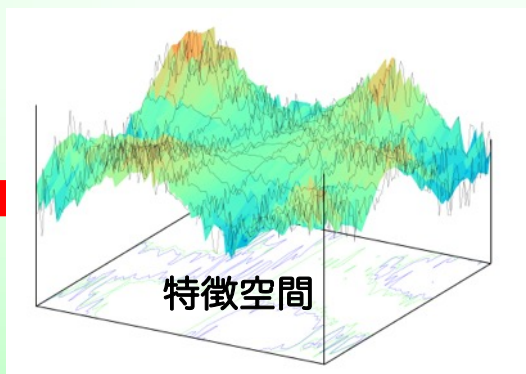
③ 特徴ベクトルの作成とベイズ最適化

④ 目的化合物生成率スコア予測

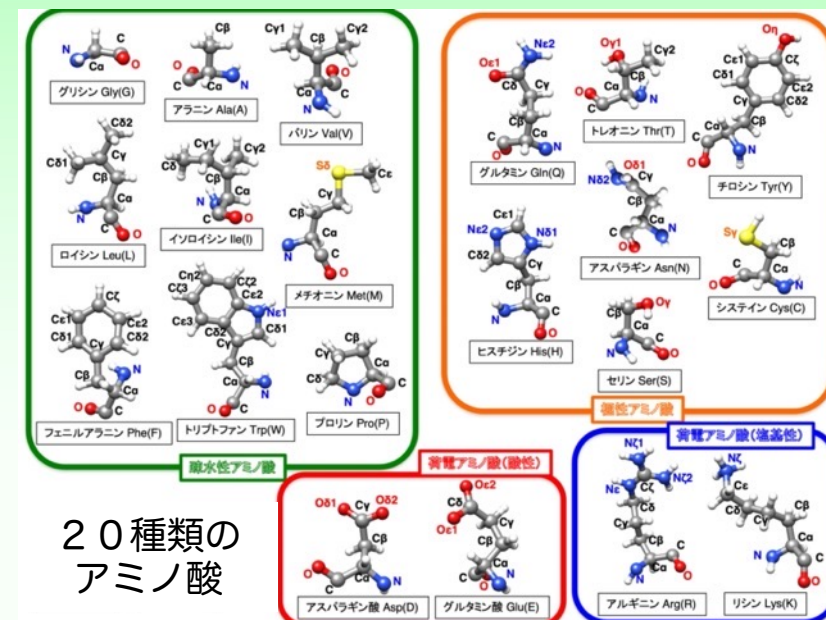
順位	変異体	予測スコア (%)	実験値の有無
1	****	29.63	o
2	****	21.83	-
3	****	21.22	-
4	****	20.83	-
5	****	20.75	-
6	****	18.62	-
7	****	18.58	-
8	****	18.38	-
9	****	18.03	o
10	****	17.98	-
11	****	17.71	o
12	****	17.69	o
13	****	17.68	-
14	****	17.51	-
15	****	17.37	o

上位の変異体を
実験により検証

ベイズ最適化
(pythonモジュール COMBO)



16万の変異体のスコアを予測



20種類の
アミノ酸

アミノ酸を表現する特徴ベクトル
ProtFP (Protein FingerPrint)

G. Van Westen, *et. al.* (2013) *J. Cheminformatics.* 5, 41

1 アミノ酸 → 8次元ベクトル

特徴ベクトル

1 変異体 (4 アミノ酸) → $8 \times 4 = 32$ 次元ベクトル



ラベル (実験データ)

目的化合物の割合

教師データ

- 1 : 生物を利用した物質生産とその問題点
- 2 : 生物体内で物質を作る「酵素」とその改良法
- 3 : 副産物を減らすDX技術「MSPER法」
- 4 : **MSPER法の産業応用例**

MSPERによる酵素開発例



目的反応物：L-メントール（ハッカの香料成分）
市場規模 11億5900万ドル（2025年予想）

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2021年9月16日(16.09.2021)

WIPO PCT

(10) 国際公開番号
WO 2021/182611 A1

(51) 国際特許分類:
C12P 41/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 9/78 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

田 倫史(KAMEDA, Tomoshi); 〒1350064 東京都江東区青海2-4-7 国立研究開発法人産業技術総合研究所 臨海副都心センター別館内 Tokyo (JP). 池部 仁善(IKEBE, Jinzen); 〒1350064 東京都江東区青海2-4-7 国立研究開発法人産業技術総合研究所 臨海副都心センター別館内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/010072

(22) 国際出願日: 2021年3月12日(12.03.2021)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2020-044455 2020年3月13日(13.03.2020) JP

(71) 出願人: 天野エンザイム株式会社 (AMANO ENZYME INC.) (JP/JP); 〒4608630 愛知県名古屋市中区錦1丁目2番7号 Aichi (JP).

(72) 発明者: 吉田 和典 (YOSHIDA, Kazunori); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザード目6番 天野エンザイム株式会社 イノベーションセンター内 Gifu (JP). 佐藤 幸秀(SATO, Yukihide); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザード目6番 天野エンザイム株式会社 イノベーションセンター内 Gifu (JP). 亀

(74) 代理人: 田中 順也, 外(TANAKA, Junya et al.); 〒5300005 大阪府大阪市北区中之島6-2-40 中之島インテス21階 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS,

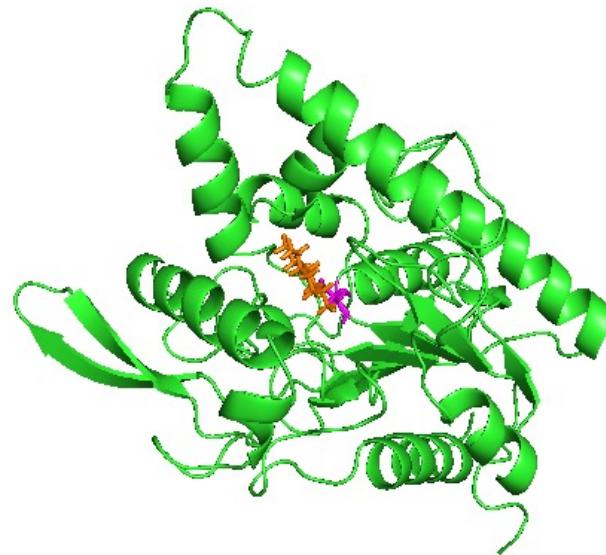
(54) Title: POLYPEPTIDE HAVING ESTERIFICATION ACTIVITY FOR L-MENTHOL AND/OR HYDROLYZING ACTIVITY FOR L-MENTHOL ESTER

(54) 発明の名称: L-メントールに対するエステル化活性及び/又はL-メントールエステルに対する加水分解活性を有するポリペプチド

(57) Abstract: Provided is a technique that can further improve substrate specificity to an L-form during L-menthol and/or L-menthol ester production. A polypeptide that has A120G, Q88A, Q88G, Q88D, Q88M, Q88L variants of a polypeptide comprising the amino acid sequence represented by sequence no. 1, and in said variants, has a random different moiety other than an amino-acid residue into which a substitution has been introduced, has esterification activity for L-menthol and/or hydrolyzing activity for L-menthol ester, and improves substrate specificity to L-menthol and/or L-menthol ester compared to a polypeptide comprising the amino acid sequence represented by sequence no. 1. During L-menthol and/or L-menthol ester production, the polypeptide can further improve the optical purity of the product.

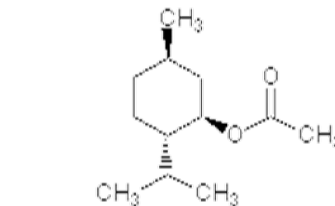
(57) 要約: L-メントール及び/又はそのエステルの製造において、L-体に対する基質特異性をさらに向上させる技術を提供する。配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドのA120G、Q88A、Q88G、Q88D、Q88M、Q88L変異体、及び、当該変異体において、前記置換が導入されたアミノ酸残基以外の任意相連部位を有し、L-メントールに対するエステル化活性及び/又はL-メントールエステルに対する加水分解活性を有し、且つ、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドに比してL-メントール及び/又はL-メントールエステルに対する基質特異性が向上しているポリペプチドは、L-メントール及び/又はそのエステルの製造において、製造物の光学純度をさらに向上させる。

酵素リパーゼ
原料メンチルアセテート

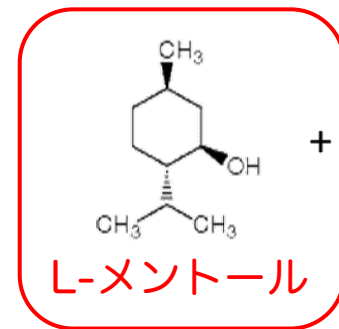


原料

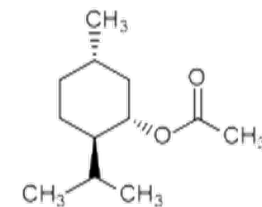
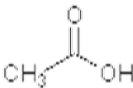
生成物



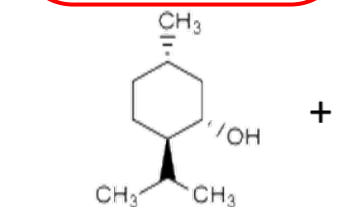
L-メンチルアセテート



L-メントール

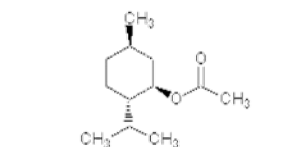
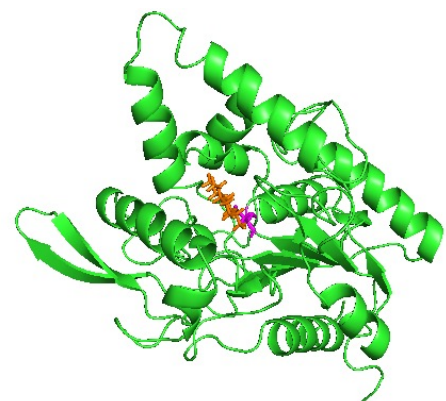


D-メンチルアセテート

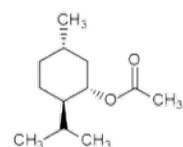


D-メントール (副産物)

MSPER ランキング 1 位の部位を 1 箇所改変させた変異体



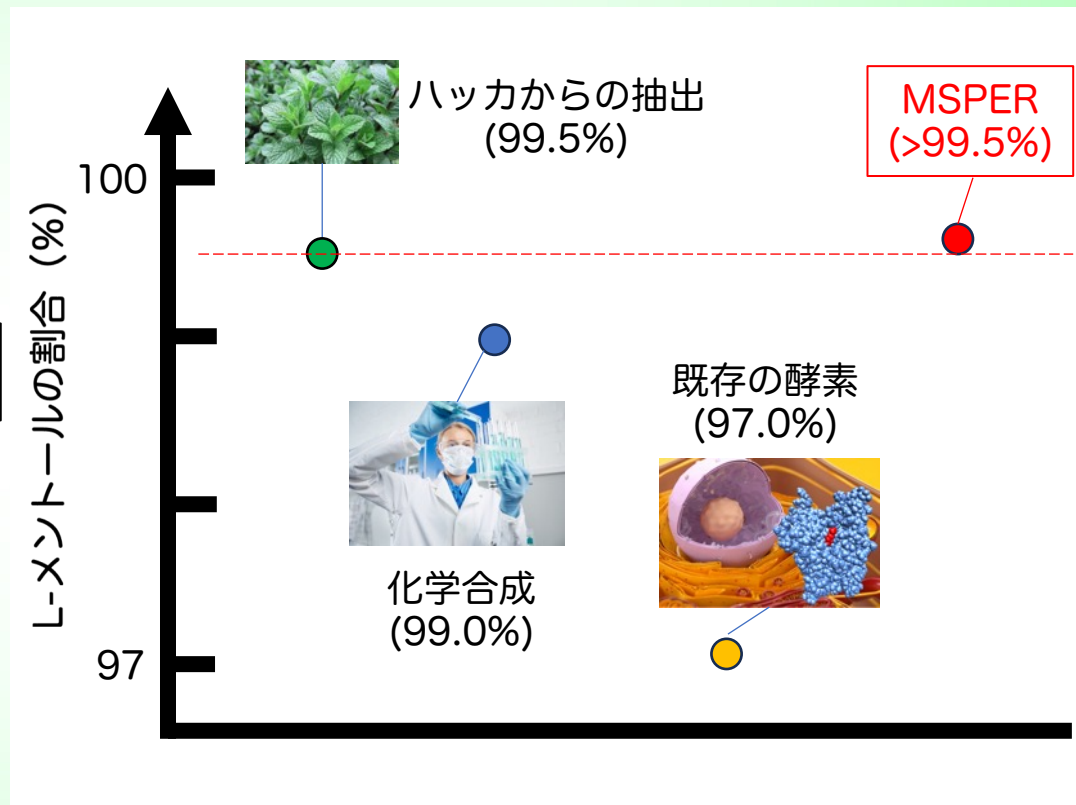
L-メンチルアセテート



D-メンチルアセテート

D-メンチルアセテートとの結合を妨害し
L-メンチルアセテートに優先的に結合させる変異部位を予測

MSPER



ハッカからの抽出と同等の変異体の開発に成功

本日の内容

- バイオDXの一例
「生物を利用した物質生産の効率化」
- バイオとAIを繋ぐ橋渡しをする「MSPER法」
- MSPER法の産業応用例

謝辞

- ・ MSPER 法開発、酵素 P450 による香料生産

産総研

亀田 倫史 様

小林 海渡 様

小川香料株式会社

鈴木 宗典 様

神戸天然物化学株式会社

小森 彩 様

- ・ 酵素リパーゼによる L-メントール生産

産総研

亀田 倫史 様

北里大学

来見田 遥一 様

天野エンザイム株式会社

石原 聡 様

吉田 和典 様

NEDO スマートセルプロジェクト

「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」