特集

「バイオものづくり」のための共通基盤技術　2

テンプレート酵素からの高性能酵素の創出

工藤　恒 Hisashi KUDO　秀瀬涼太 Ryota HIDESE　那須野　亮 Ryo NASUNO
近藤昭彦 Akihiko KONDO　蓮沼誠久 Tomohisa HASUNUMA

酵素データベース空間を活用した有用酵素の新規開発手法について解説する。独自の酵素配列分類法「ムサシメソッド」により，広い基質特異性と高い触媒効率を併せ持つテンプレート酵素を探索し，これを基に計算科学に基づく酵素設計により，新たな基質特異性や高い触媒活性を付与した人工酵素を創出する。さらに，ラボオートメーションを統合することで，迅速な酵素開発ワークフローを構築した。

テンプレート酵素と人工酵素

バイオものづくりでは，目的とする化合物を効率良く生産するために，適切な酵素を選定・改変することが，プロセスの成否，ひいては産業競争力を左右する。しかし，酵素に関する情報は十分に整理・体系化されておらず，候補酵素の選定や改変方針の決定は，今なお研究者の経験と知識に大きく依存している。そのため，有用酵素の探索には多くの時間と労力を要する上，既知の酵素や反応に基づく開発に偏り，新たな酵素機能の創出や活性の飛躍的な向上には限界があった。そこで筆者らは，多様な基質を受け入れる広い基質特異性と高い触媒効率を併せ持つ「テンプレート酵素」に着目して，これを酵素設計の出発点とする（図1）。このテンプレート酵素に改変を施し，目的に応じて基質特異性や触媒活性を変化させることで，未知基質に特化して新規生成物を与える新規活性酵素や，特定の既存反応に対する活性をさらに高めた高活性型酵素などの「人工酵素」を創出する。これにより，天然化合物から人工化合物まで幅広い化合物の高効率なバイオ変換を実現することを目指す。本稿では，「テンプレート酵素から人工酵素へ」という考え方に基づく酵素開発ワークフローの構築と，これを活用した具体的な酵素開発例を紹介する。

くどう・ひさし
神戸大学先端バイオ工学研究センター　特命助教
〔経歴〕2019 年東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境化学系博士後期課程修了，博士（学術）。神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科博士研究員を経て，25 年より現職。〔専門〕タンパク質工学，計算科学。〔趣味〕旅行，ジム，日本酒。
E-mail: hkudo@people.kobe-u.ac.jp



ひでせ・りょうた
神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科
特命教授
〔専門〕応用微生物学，酵素工学，ラボオートメーション。〔趣味〕散策。
E-mail: hidese@people.kobe-u.ac.jp



なすの・りょう
神戸大学先端バイオ工学研究センター　特命准教授
〔専門〕酵母，ストレス耐性，アミノ酸代謝酵素。〔趣味〕音楽演奏，ゲーム，お酒。
E-mail: rnasuno@tiger.kobe-u.ac.jp



こんどう・あきひこ
神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科　客員教授
〔専門〕合成生物学。

はすぬま・ともひさ
神戸大学先端バイオ工学研究センター　教授
〔専門〕合成生物学，代謝工学。

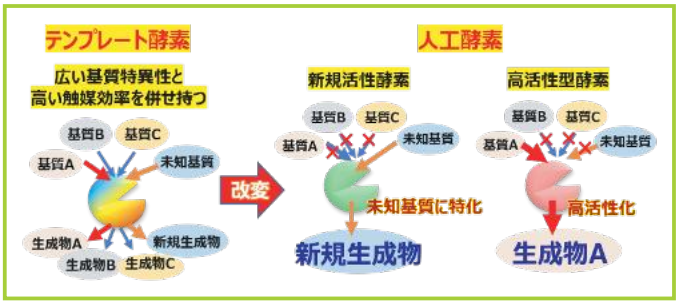


図1　テンプレート酵素と人工酵素

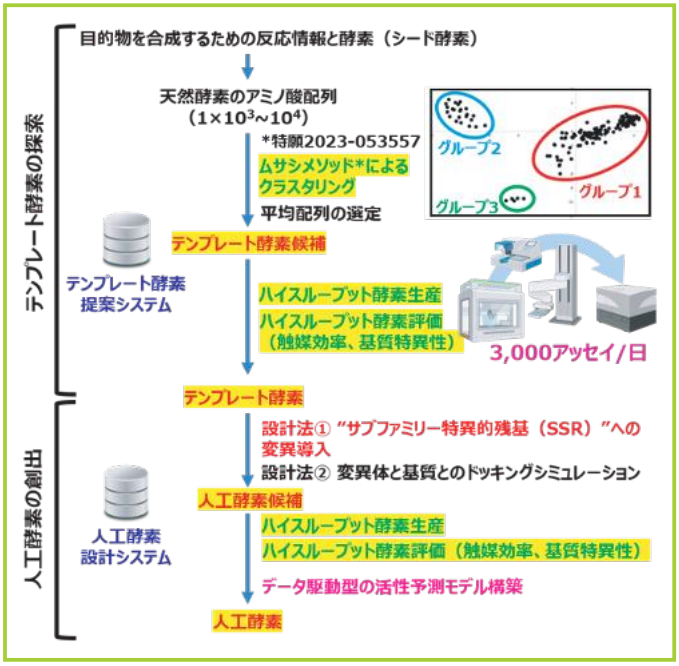


図 2　本研究における酵素開発ワークフロー



図 3　ラボオートメーションによる酵素生産・評価

酵素開発ワークフローと要素技術の紹介

筆者らは，目的反応の設定からテンプレート酵素候補の探索・選定，人工酵素候補の設計・創出までを一貫して進める酵素開発ワークフローを構築した（図2）。本ワークフローは「テンプレート酵素提案システム」と「人工酵素設計システム」の 2 段階から構成される。まず「テンプレート酵素提案システム」では，目的反応あるいは類似反応を触媒する既知酵素をシード酵素として酵素探索を開始する。次いで，データベース上から関連する天然酵素のアミノ酸配列を 1000〜1 万件規模で収集し，独自の酵素配列分類手法である「ムサシメソッド（MUltiple-Sequence Alignment-based protein Selection via clustering using HIgh-dimensional analysis，特願 2023-053557）」を適用する[1〜3]。「ムサシメソッド」では，アライメントした酵素配列中の 20 種類のアミノ酸とギャップを，それぞれ 5 次元の 0/1 ベクトルに対応づけた独自の真理値表を用いて数値化し，主成分解析によって類似した配列特徴をもつ酵素ほど近くに配置される 2 次元マップを作成する。この 2 次元マップを用いて酵素をクラスタリングし，各クラスター内で共通する配列特徴を最も多くもつ平均配列をテンプレート酵素候補として抽出する。抽出した候補は組換え酵素として生産し，ハイスループット酵素評価系を用いて複数の基質に対する触媒効率を測定する。さらに，基質特異性の広さを表す指標（シャノン-ウィーナー指数[4]）を導入して，触媒効率と併せて評価することで，テンプレート酵素を選定する。この評価系を支える要素技術として，微生物コロニーを自動選抜するコロニーピッカー，自動溶液分注装置，自動酵素アッセイ装置を組み合わせたラボオートメーション系を構築した（図 3）。条件を最適化した結果，酵素生産株の構築，コロニー選抜，培養・酵素発現，酵素精製までの工程では 1000 酵素種/週，NAD(P)H 依存性酵素の活性測定では 3000 アッセイ/日を達成した。その結果，酵素開発期間を従来法の 1/4〜1/5 に短縮することができた。テンプレート酵素の選定後は，「人工酵素設計システム」を用いて，目的に応じた人工酵素候補を設計する。本システムでは 2 つの設計法を導入した。第一は，テンプレート酵素の探索過程で蓄積した配列・活性データから，酵素サブファミリー間の機能差に関与するとされるサブファミリー特異的残基（subfamily-specific residue; SSR）[5]を同定し，その部位に変異を導入する方法である。第二は，酵素と基質との複合体構造を予測し，ドッキングシミュレーションによって有望な変異体を絞り込む方法である。前者では，活性中心や基質結合部位周辺以外の部位なども含めて変異導入候補として選定可能なため，後者の構造情報に基づく設計手法と補完し合う関係にあることが期待される。さらに，蓄積した変異体配列・活性データを機械学習による酵素活性予測モデル構築に活用し，人工酵素候補の選定精度向上を図っている。設計した変異体はハイスループット酵素評価系によって迅速に評価し，年間 15 種類以上の人工酵素取得に成功している。これらの結果から，配列・活性データに基づく SSR 解析と，構造情報に基づくドッキングシミュレーションのいずれも，人工酵素候補の設計に有効であることが示された。創出した人工酵素は物質生産へ展開している。以上のように，本ワークフローでは，ムサシメソッドを用いたデータベースからの酵素探索，ラボオートメーションによるハイスループット酵素生産・評価，さらに計算科学とデータ駆動型酵素活

性予測を統合することで，テンプレート酵素の探索から人工酵素の創出，物質生産までを一貫して迅速に進める酵素開発基盤を構築した。

本ワークフローを活用した酵素開発例

筆者らは，バイオものづくりにおいて特に重要な 4 種類の酵素，アミノ酸デアミナーゼ（AAD），ケト酸デカルボキシラーゼ（KDC），アルコールデヒドロゲナーゼ（ADH），アルデヒド脱ホルミル化オキシゲナーゼ（ADO）に注目した（図 4）。これらの酵素を組み合わせることで，アミノ酸を出発原料としてアルコールやアルカンをはじめとする多様な有用化合物を生産できる。具体的には，AAD がアミノ酸をケト酸へ変換し，KDC がケト酸からアルデヒドを生成する。生成したアルデヒドは，ADH によってアルコールへ，ADO によってアルカンへと変換される。得られるアルコールの代表例として，フェニルエタノールは香料，イソブタノールはバイオ燃料や化学品原料として利用され，アルカンは主に燃料用途が期待される。このように，4 種類の酵素は様々な有用物質生産の中核となる反応を担っている。

AAD では，アミノ酸 22 種類に対して高い活性をもつテンプレート AAD を見いだした[6]。このテンプレート AAD を起点とした人工酵素設計によって，芳香族アミノ酸に特化した人工 AAD を創出できたほか，14 種類のアミノ酸に対する相対活性（野生型比）が 5 倍以上向上した，基質特異性の比較的広い人工 AAD の創出にも成功した。KDC では，データベース上の 1 万 8000 件に上る候補の中からムサシメソッドを繰り返し行うことでグループを細分化し，非天然ケト酸 8 種を含む 10 種類の基質に対して新規の活性をもつテンプレート KDC を見いだすことができた。さらに人工酵素設計によって，ピルビン酸，フェニルグリオキシル酸および 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸それぞれに対する相対活性が 1.5 倍ほど向上した人工 KDC を創出できた。ADH では 35 種類ものアルデヒド基質を受け入れるテンプレート ADH 群を獲得できた[1]。さらに SSR を起点とした人工酵素設計によって，フェニルアセトアルデヒド，イソブチルアルデヒドそれぞれに対する触媒効率が 320 倍および 160 倍（ベンチマーク比）向上した人工 ADH を創出できた。最後に ADO では，ムサシメソッドによって直鎖アルデヒド（C12〜C18）に対して高活性なテンプレート ADO 群を見いだすことができた。さらに人工酵素設計によって，ドデカナールに対する相対活性（ベンチマーク比）が最大 2 倍向上した人工 ADO を創出できた。以上のように，本ワークフローを 4 種類の酵素へ適用することで，新規反応の開拓から高性能な人工酵素の創出までを実証し，多様な物質生産に利用可能な有用酵素群を創出した。

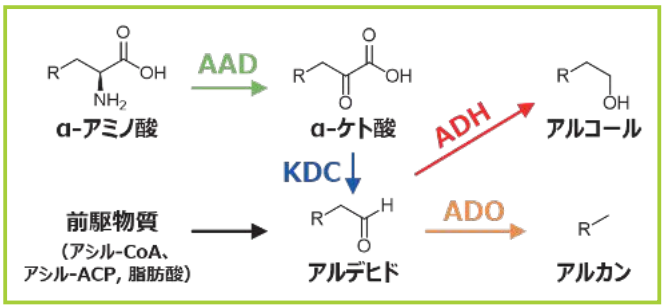


図 4　AAD，KDC，ADH，ADO を利用した生産経路

おわりに

本稿では，テンプレート酵素の探索から人工酵素の創出までを一貫して実現する酵素開発ワークフローと，AAD，KDC，ADH，ADO への適用例を紹介した。本ワークフローは，新規反応の開拓や高性能な人工酵素の創出を効率化し，バイオものづくりにおける有用酵素開発への有効性を示した。現在は，強化学習を活用したムサシメソッドの高度化や，データ駆動型酵素活性予測モデルの最適化を進め，目的酵素の獲得確率向上を図っている。上記で挙げた酵素 4 種以外にも本ワークフローまたはその一部が活用されており，高い立体選択性を有するカルベン転移酵素の取得[2]や，ビフェニル水酸化酵素の位置選択性および触媒活性の向上[3]といった成果が得られている。さらに複数の企業において，バイオものづくりに有用な産業酵素の開発に適用されており，本ワークフローの幅広い適用可能性が示されつつある。以上より，本ワークフローは，多様な酵素種や反応に適用可能な汎用性の高い酵素開発基盤へと発展しつつあり，今後は，多様な産業ニーズに迅速に応える基盤技術として，さらなる実用化・社会実装が期待される。

1）R. Hidese et al., *ACS Catal*. **2025**, *15*, 11931.
2）S. Kato et al., *Angew. Chem., Int. Ed*. **2026**, *65*, e26025.
3）C. J. Vavricka et al., *ACS Catal*. **2026**, *16*, 15949.
4）J. Y. Liu et al., *J. Mol. Catal., B Enzym*. **2013**, *89*, 41.
5）B. Brandt et al., *Nucleic Acids Res*. **2010**, *38*, 35.
6）R. Nasuno et al., *Metab. Eng*. **2026**, *96*, 234.

© 2026 The Chemical Society of Japan