

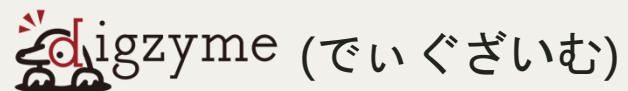


(株)digzymeにおける 産業用酵素の研究開発への 取り組みについて



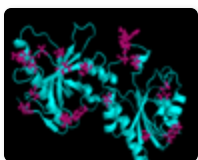
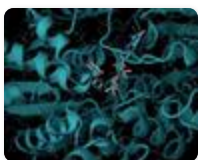
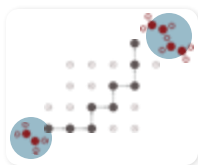
2024/9/3（火）Zoom配信
株式会社digzyme
取締役CTO 中村 祐哉

会社紹介



新橋オフィス (クラウドコンピュータ)

- ・ビジネス拠点
- ・酵素のデザイン



葛西ラボ

- ・酵素ライブラリの構築／保存
- ・スクリーニング
- ・アプリケーション開発



Board Member



渡来 CEO



中村 CTO



和泉 COO

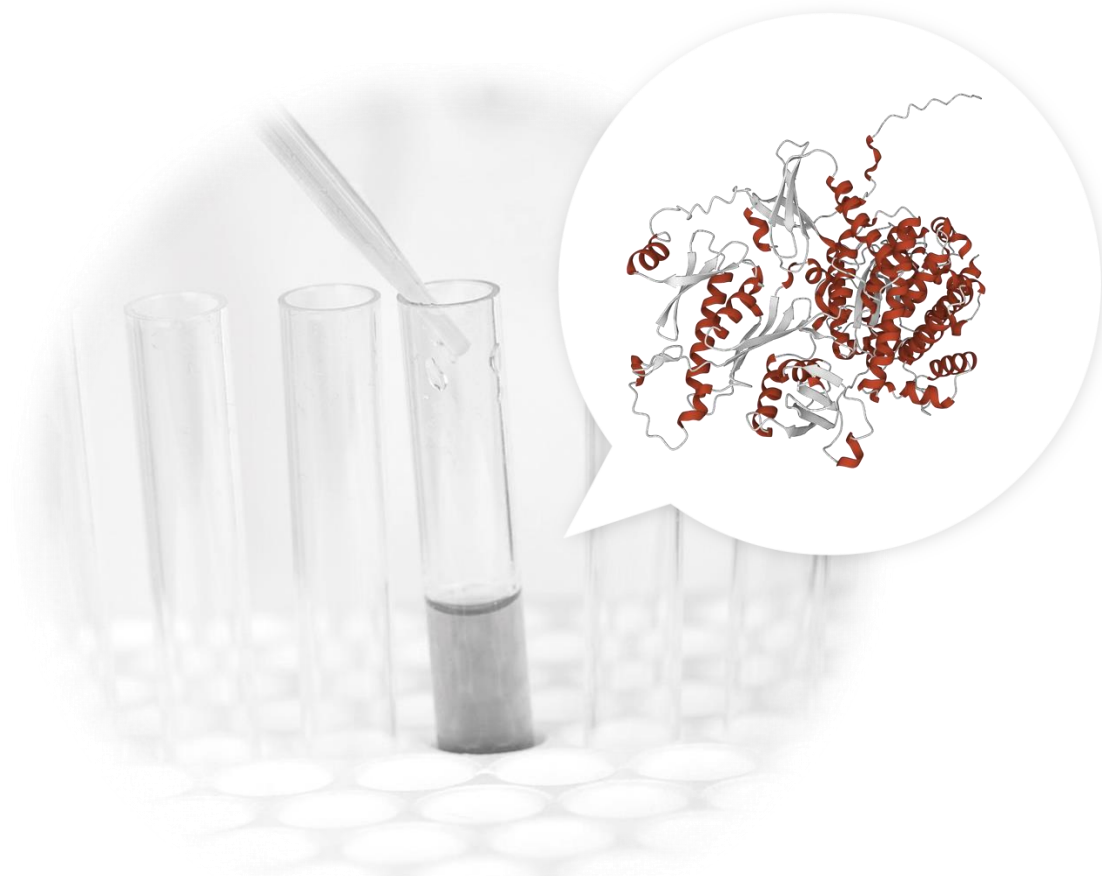


山田 CSO



宮内 CSMO

- | | |
|---------|------------------|
| ■ 会社設立 | 2019年8月26日 |
| ■ メンバー数 | フルタイム 17名 |
| ■ 累計調達 | 10.1億円 (2024年4月) |



酵素：生物が作り出す触媒機能をもつタンパク質分子

さまざまな開発要素が存在

- ・ 発現系（生産量）
- ・ 反応特異性（基質特異性）
- ・ 活性値（ k_{cat} , k_m ...）
- ・ 至適温度
- ・ 至適pH
- ・ 耐性（温度, pH, 溶媒, 圧力...）
- ・ 翻訳後修飾
- etc.

＋精製、固定化など利用方法

Our Business

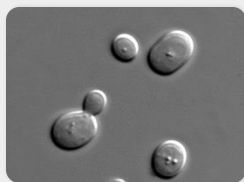


コア・テクノロジー

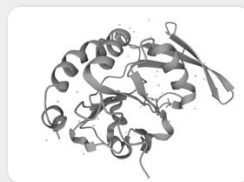
産業用酵素

酵素法

- 微生物に作らせた酵素を抽出して利用する



微生物 + 酵素遺伝子

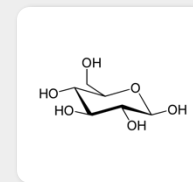


酵素

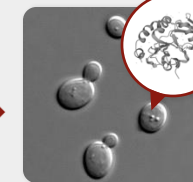
合成生物

精密発酵

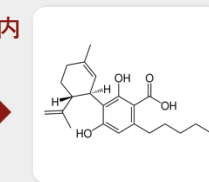
- 微生物は酵素を細胞内で利用して化合物を変換する



原料



微生物 + 酵素遺伝子



化合物

- 主なインダストリー



食品加工



洗濯洗剤



体外診断薬



廃水処理



研究試薬



天然物合成



石化品代替



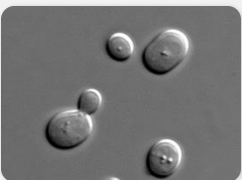
未活用資源

酵素の産業利用の例 (化学系)

酵素法

無細胞系

- 微生物に作らせた酵素を抽出して利用する

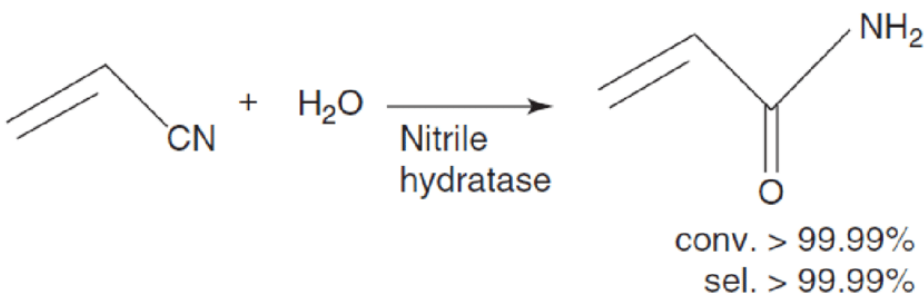


培養・分泌



微生物 + 酵素遺伝子

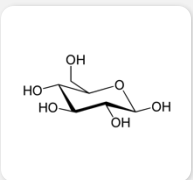
酵素



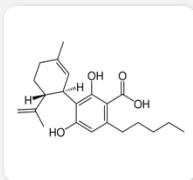
精密発酵

細胞系

- 微生物は酵素を細胞内で利用して化合物を変換する



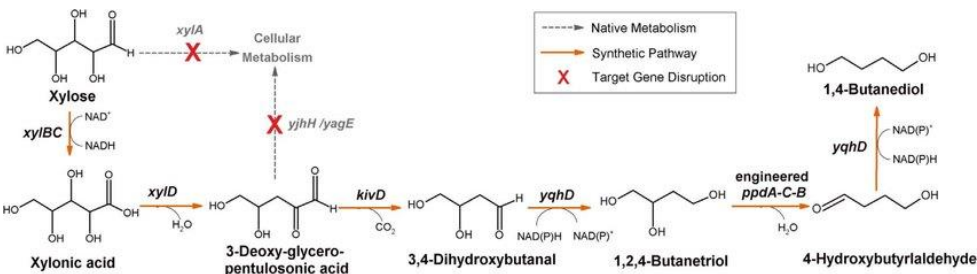
細胞内
酵素



原料

微生物 + 酵素遺伝子

化合物



Mitsui Chemicals

Global Site Language お問い合わせ

三井化学について 事業・製品 研究・開発 サステナビリティ 株主・投資家情報 採用 ニュース

概要

アクリルアミドは、アクリルニトリルの水和により合成される水溶性モノマーで、主に、排水処理用の高分子凝集剤、紙力増強剤、紙油回収剤等に用いられるポリアクリルアミドの原料として利用されます。

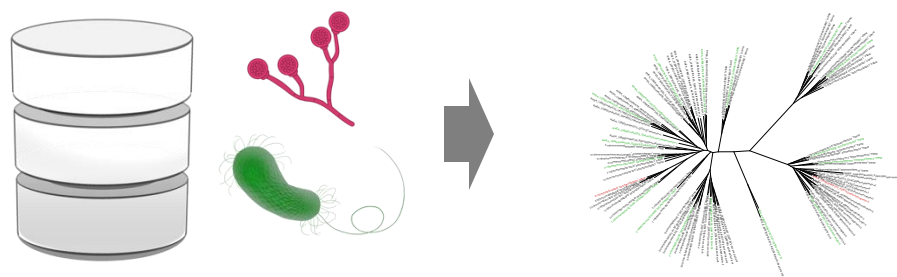
CAS番号 79-06-1
官報公示整理番号 化審法：2-1014

geno

Geno BDO™

Renewable bio-BDO™ (bio-1,4-butanediol), produced by the Geno BDO™ process technology from plant sugars instead of fossil feedstocks, is a major chemical intermediate that replaces conventional fossil-based BDO for direct use in a diverse range of everyday materials and consumer products, from spandex to shoes to plastics in cars and electronics.

天然配列からのスクリーニング



遺伝子データベース

系統解析

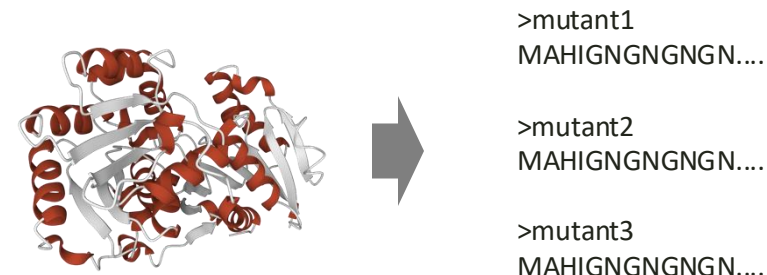
Pros.

- ・ 酵素タンパク質として機能するものが取れやすい
- ・ 食品用にはマスト（Non-GM開発も可能）

Cons.

- ・ 産業用としては機能が十分でないことも多い
（活性が高いように進化しているとは限らない）

人工配列（変異体）の作成



元になる酵素

変異体配列

Pros.

- ・ 産業に重要なプロパティを改善しやすい
- ・ 配列自体を特許発明として保護できる

Cons.

- ・ 酵素タンパク質として発現しないものが出やすい
⇒ 多様性が確保しにくい

digzyme Moonlight™

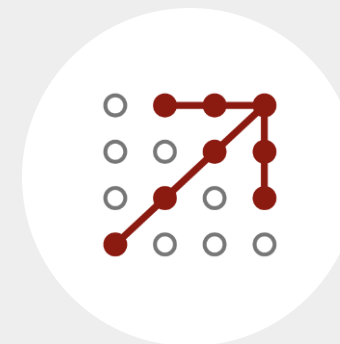
ニーズに合わせた酵素探索



バイオプロセス開発の最初の課題となる、酵素の探索を実施。解析システムにより、目的の化学反応に対応する機能の酵素を遺伝子データベースから探索します。

digzyme Spotlight™

機能を高める酵素改良



酵素の産業利用に向けて課題となる、酵素の機能改良を実施。AIにより、対象酵素の配列情報から機能向上（高活性化や耐熱化など）に重要な変異体を予測し作成します。

digzyme Moonlight™





This is release 2024_02 of UniProtKB, published on Wed Mar 27 2024.

Total number of entries in this release of UniProtKB

Section	Number of entries in total	Number of entries with an annotation update	Number of entries with a sequence update
UniProtKB	248,805,733	117,146,151	109
 Reviewed (Swiss-Prot)	571,282	436,850	59
 Unreviewed (TrEMBL)	248,234,451	116,709,301	50

Statistics for release 132 (2024-03-27)

The number of reactions given here is the number of [reaction quartets](#).

Unique reactions: 16,410

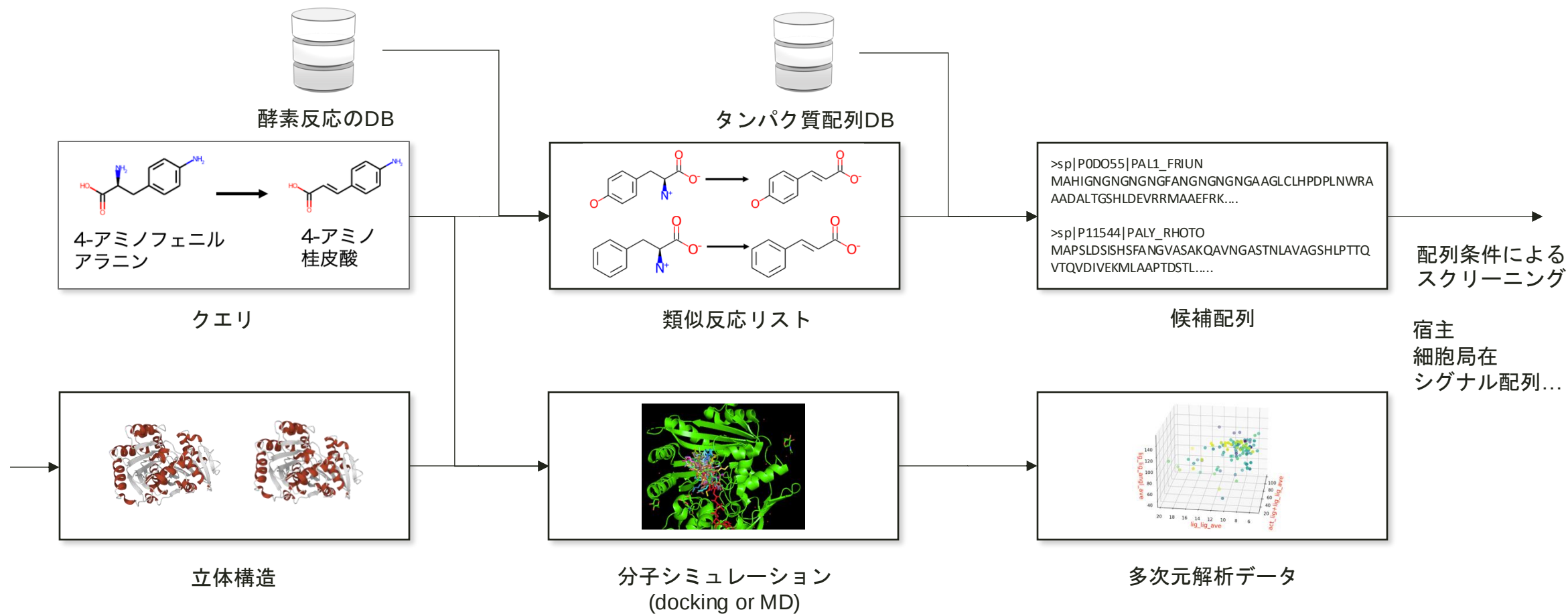
Unique reaction participants: 13,588



Reaction participants [?]		
Type	Participants	Reactions
Small molecule (ChEBI)	11,543	16,349
Macromolecule (Rhea)	1,793	2,935
Polymer (Rhea)	252	292

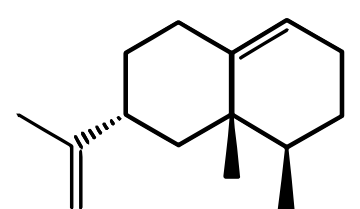
- ・世界中のゲノムデータ、酵素反応のデータが日々蓄積されて続けている
推定酵素遺伝子（全遺伝子の10%程度）に比較して、反応のデータが少なすぎる
- ・ほとんどの遺伝子データはUncharacterized、相同性検索で機能推定(UniRule等)がされている程度
- ・酵素の開発にとっては、“よくわからないもの”の塊

→これらの多様性をうまく有効活用することで、ニーズに合致する酵素を探すことができる

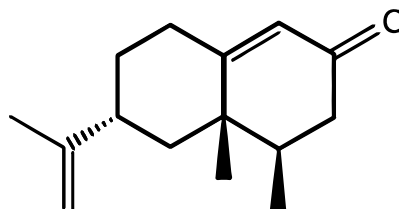
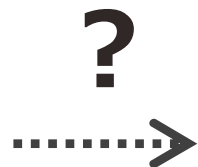


具体例① 課題

課題：非遺伝子組換えの方法（ナチュラルオカレンス法）NootkatoneをValenceneより酵素合成したい。



Valencene



Nootkatone



東京工業大学
Tokyo Institute of Technology

×

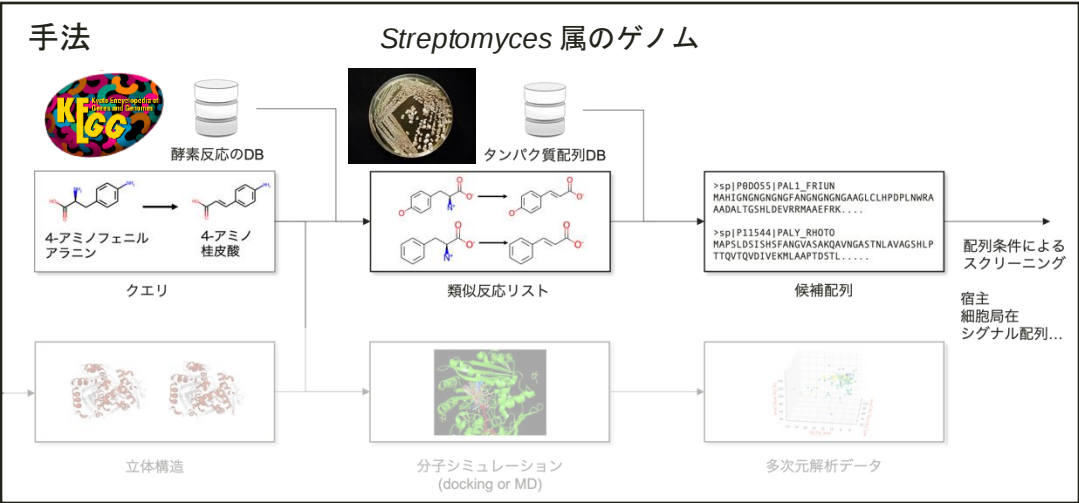


NAGASE

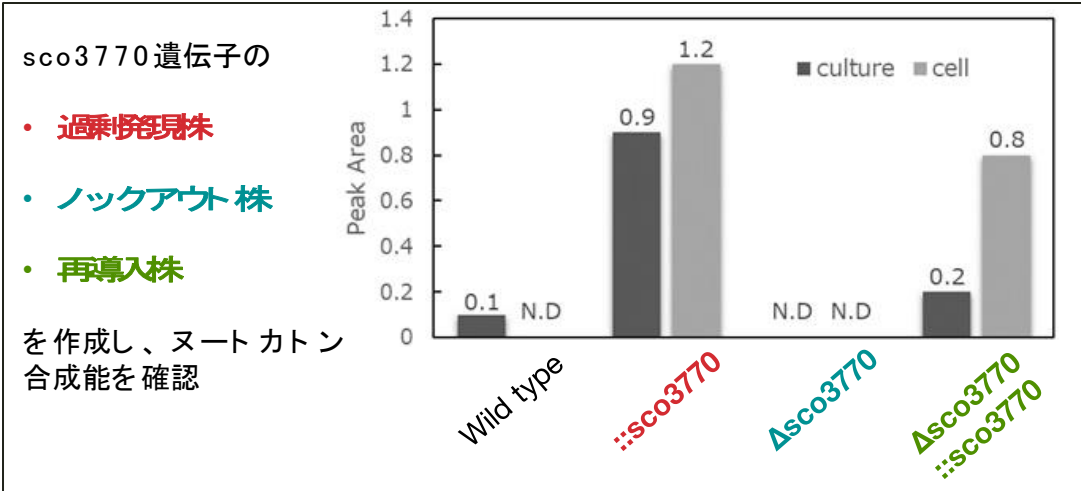
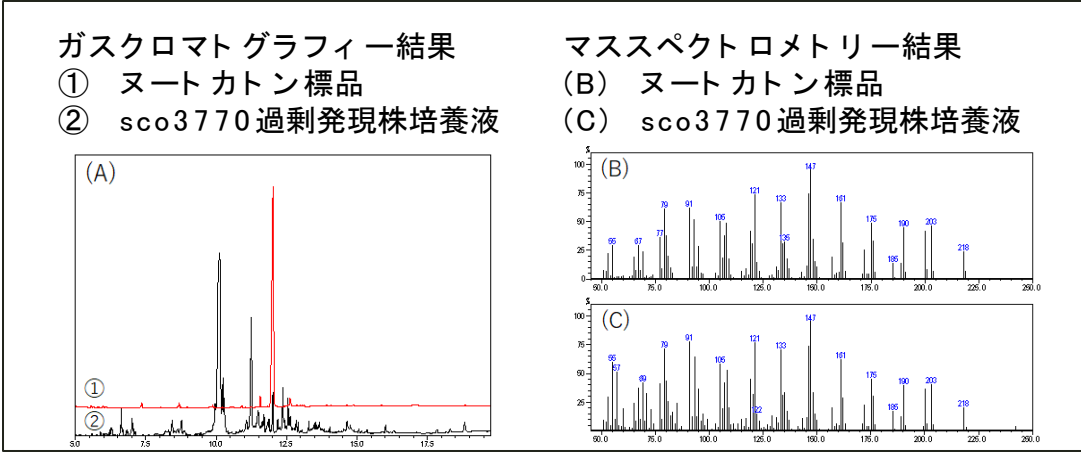
- ・ グレープフルーツの匂いがする香料
- ・ 食品添加物に使われることもあるため、非遺伝子組換え(Non-GM)での合成ができれば事業上有利※
- ・ 長瀬産業が得意とする放線菌を用いることができれば開発も早い
- ・ 東工大時代に技術PoCとして実施

※現在はisobionic社の「*Rhodobacter sphaeroides* 168株を利用して製造された香料バレンセン」について、「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」（平成16年3月25日食品安全委員会決定）に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断されている。

具体例① 結果

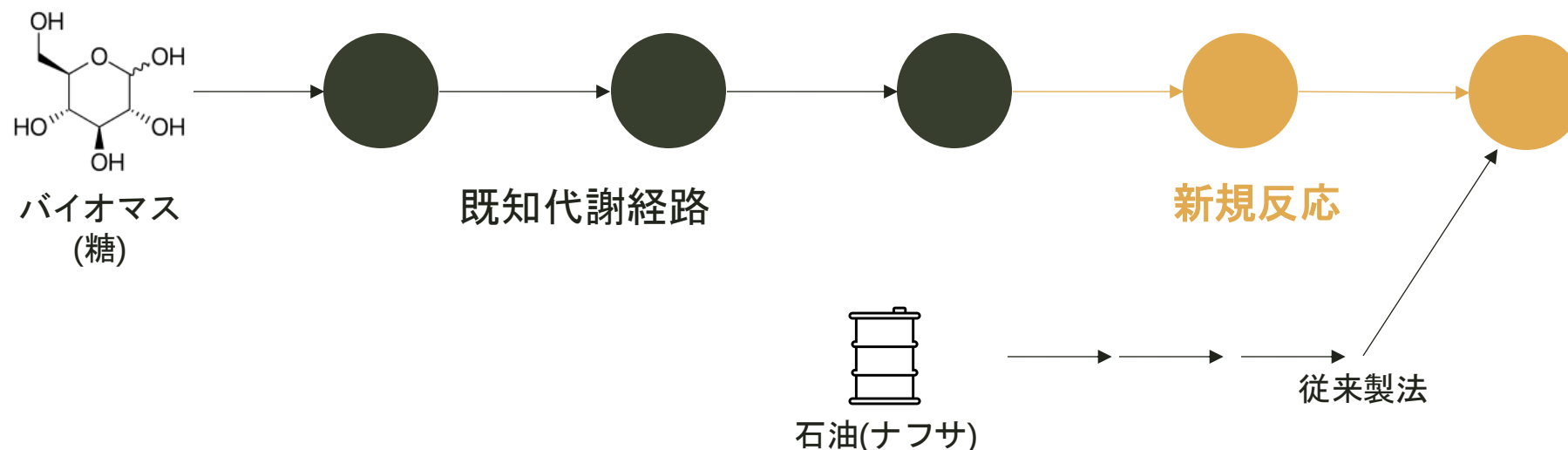


Gene name	Score	KEGG OC	Definition (KEGG)	KEGG Orthology
sco5223	0.646	OC.253802	cytochrome P450	K12645
sco3099	0.411	OC.122227	cytochrome P450 hydroxylase	-
sco3636	0.411	OC.122227	cytochrome P-450 hydroxylase	K00493
sco3770	0.411	OC.122227	cytochrome P450 oxidoreductase	-



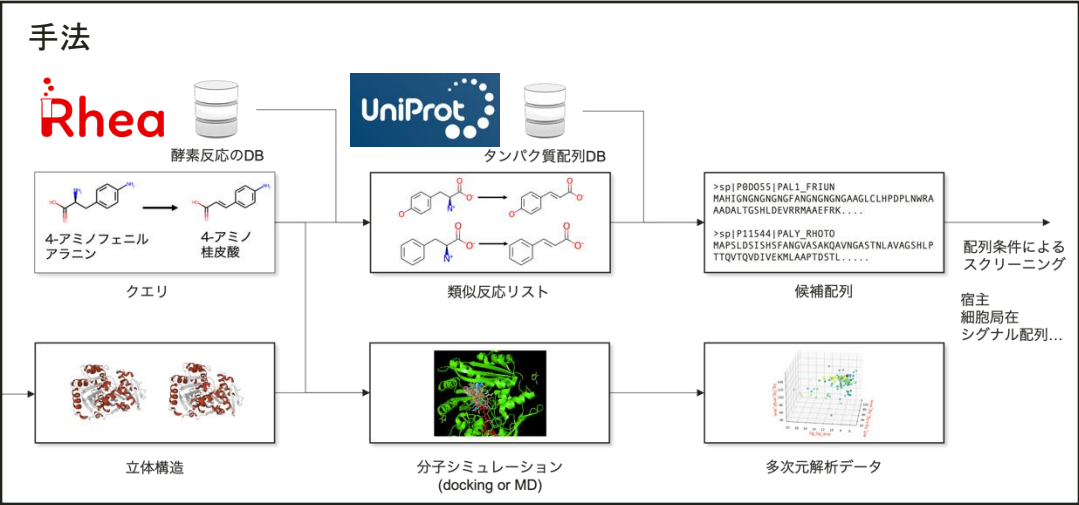
具体例② 課題

課題：精密発酵法で、プラスチックXの原料を合成する代謝経路の一部の酵素を新規に探索したい。

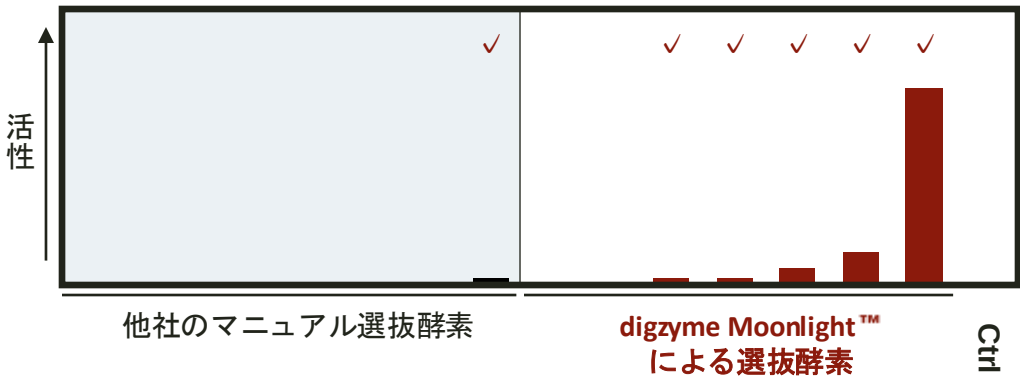


- ・ 石油化学で作られていたプラスチック原料をバイオ化度100%にする目的
- ・ 原料としては糖からの代謝経路を設計する必要がある
- ・ 生体が本来持っている代謝反応の中間体からバイパスさせて目的物を合成する方法が主流
- ・ 目的物に近い反応を担う酵素は新規に開発する必要がある
(非天然物なので既存のDBには無いことが普通)

具体例② 結果



結果 高い精度でかつ活性の高い酵素の探索に成功



1. 類似反応2反応から、121配列を抽出してドッキング解析
2. 系統的ばらつきとスコアを考慮して7配列のDNAを合成、大腸菌にて組み換え
3. 培養条件を調整して発現させ検証
(※最初は発現せず、全滅かと思われていた)

	他社		Moonlight™
Hit率 (精度)	13% (1/8)	5.7倍	71% (5/7)
活性値 (品質)	1	42倍	42

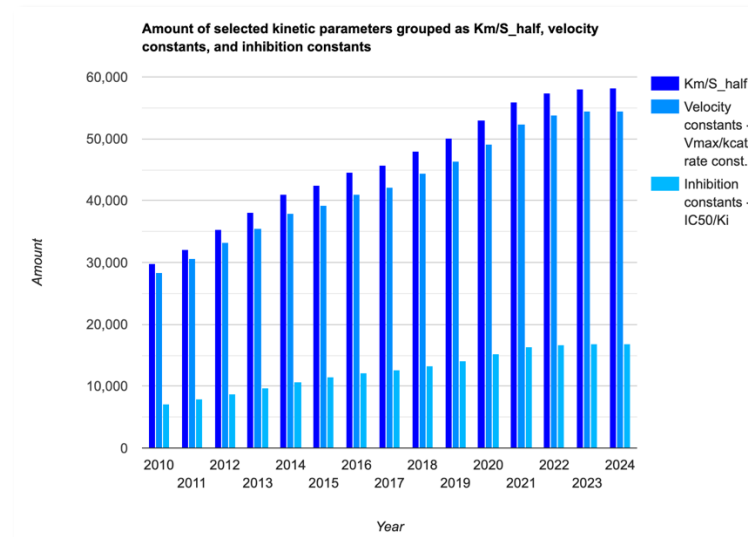
digzyme Spotlight™





STATISTICS

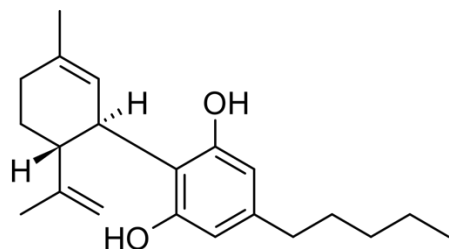
Number of visitors: **15354**
Number of experiments: **15987**
Curated: **10352**
Uncurated: **5635**
Number of mutations: **6713**
Number of proteins: **242**
Number of structures: **304**
Last data update: **2022年2月8日**



- ・ 酵素のプロパティ(活性・耐熱性・)のデータは配列ほどではないが、公共のDBがいくつか存在する
 - ・ 変異体のデータはプロパティごとに高々10000前後しか存在しない
- 酵素種もバラバラで、酵素種ごとにしてしまうと、サンプル数が機械学習には少し足りない
1. 一つの酵素種のデータを新たに取って学習させる
 2. うまく一般化することで酵素（タンパク質）として普遍的な情報を機械学習させる
 3. 理論的なアプローチで解決する



具体例③ 課題



カンナビノイドの一種CBD

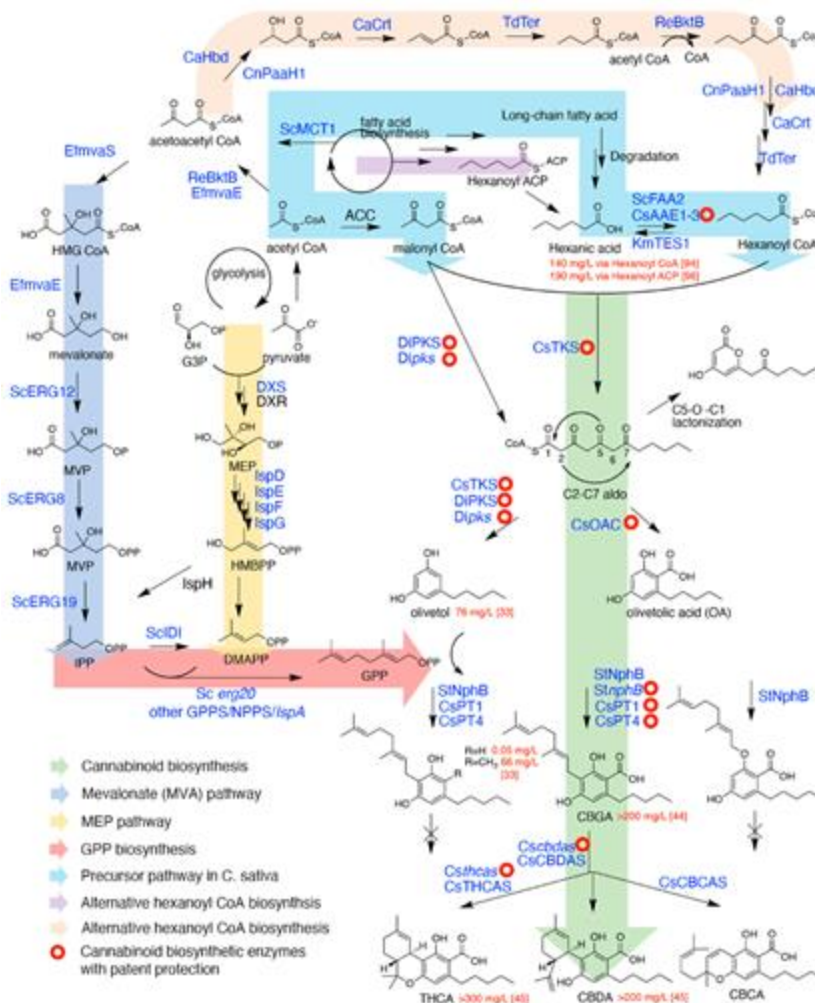


	先行研究 α	先行研究 β
宿主	酵母	大腸菌
生産性 (CBGA)	約20mg/L	検出下限 レベル

- ・大麻抽出成分であるカンナビノイド
- ・麻薬成分THC, THCHなどが混入
- ・屋内栽培のエネルギーが問題

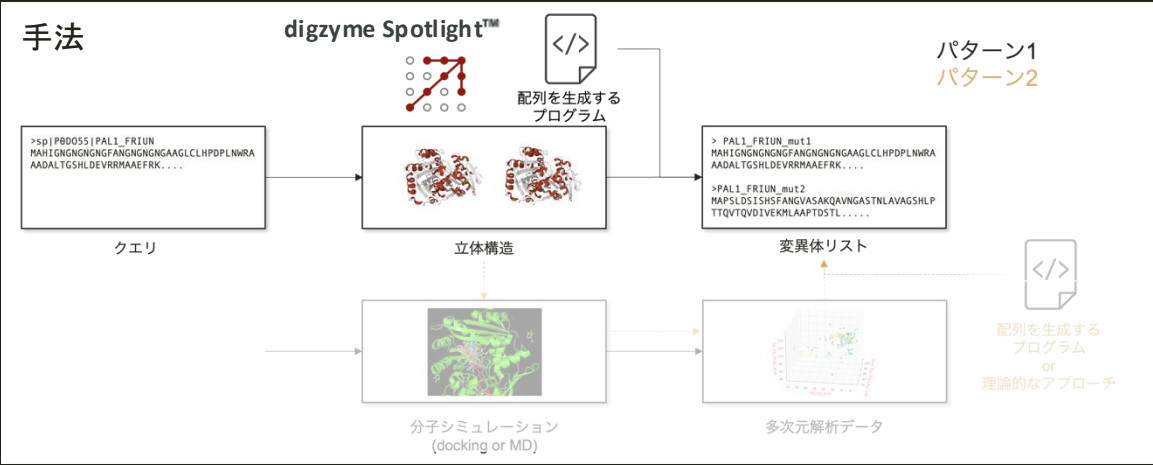
→ 精密発酵が検討されるが、低収率が課題

(CBD 価格：10万円/kg → 1g/L程度の収率が必要)

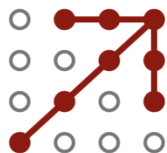


Blatt-Janmaat, Kaitlyn, and Yang Qu. "The biochemistry of phytocannabinoids and metabolic engineering of their production in heterologous systems." *International Journal of Molecular Sciences* 22.5 (2021): 2454.

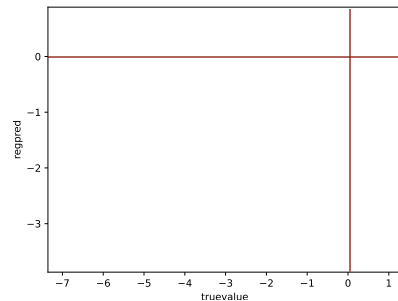
具体例③ 結果



digzyme Spotlight™



...digzymeが独自に開発した単変異のプロパティ（活性、耐熱性...）予測プログラム

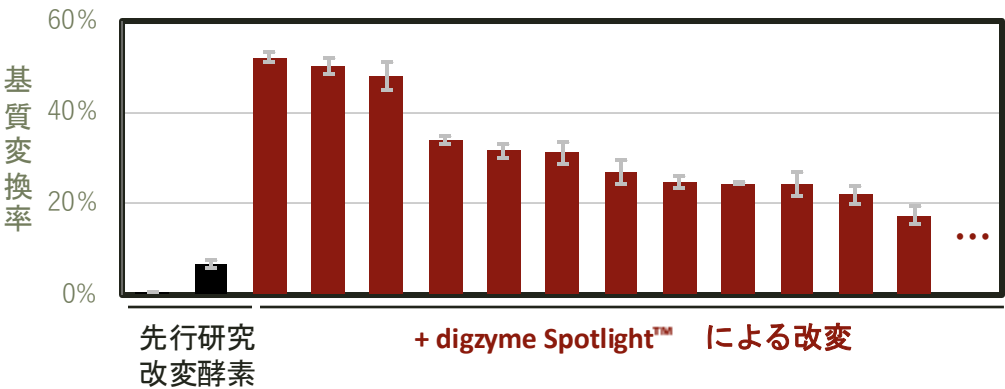


例:EC5に属する酵素の予測結果

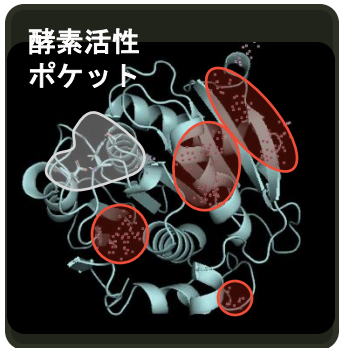
	pred down	pred up
true down	162	14
true up	22	15

結果

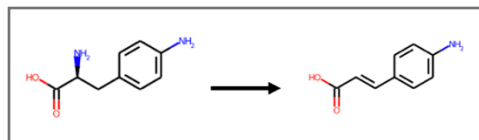
先行研究の変異体にさらに有効な変異を複数導入することに成功



- digzyme Spotlightでは、活性ポケットを避ける変異が複数提案された
- 単変異で活性上昇するものを組み合わせると、相乗的に活性が向上した
- 既存の変異はポケット周辺だったこともあり、競合しなかったと考えられる



具体例④ 課題



探索

```
>sp|P0DO55|PAL1_FRIUN
MAHIGNGNNGNGFANGNGNGGAAGLCLHPDPL
NWRAAADALTGSHLDEVRRMAAEFRK....
>sp|P11544|PALY_RHOTO
MAPSLDSISHSFANGVASAKQAVNGASTNLAVAGSHL
PTTQVTQVDIVEKMLAAPTDSL.....
```

```
>sp|P0DO55|PAL1_FRIUN
MAHIGNGNNGNGFANGNGNGGAAGLCLHPDPL
NWRAAADALTGSHLDEVRRMAAEFRK....
```

変異体作成

```
>PAL1_FRIUN_mut1
MAHIGNGNNGNGFANGNGNGGAAGLCLHPDPL
NWRAAADALTGSHLDEVRRMAAEFRK....
>PAL1_FRIUN_mut2
MAPSLDSISHSFANGVASAKQAVNGASTNLAVAGSHL
PTTQVTQVDIVEKMLAAPTDSL.....
```

熱安定性の高い酵素がほしい

理由：

- 培養中に発熱して温度が上がってしまう
- 高温で反応速度を上げたい
- 低温だと粘度が高くなってしまう



顧客 B

活性の高い酵素がほしい

理由：

- 既存品の活性が低い
- 高効率・低コストで生産したい
- 精密発酵で反応の律速になっている



顧客 A

溶媒耐性のある酵素がほしい

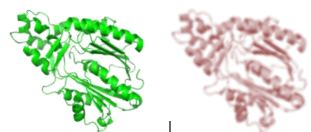
理由：

- 特殊な溶媒条件下で反応させたい
- 水を含まない有機溶媒での反応が必要



顧客 C

具体例④ 結果

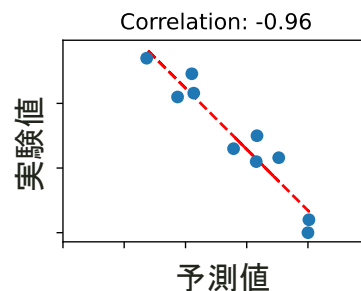


探索酵素・変異体の立体構造
(分子モデリングデータ)

...

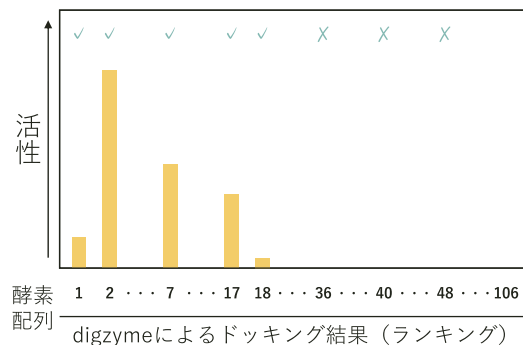


酵素の物理学的特性に
相関する*in silico*の
特徴量を計算・解析

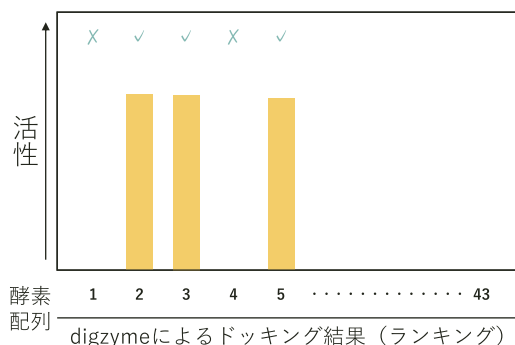


活性の予測

事例1；メチル化反応 ($R-H \rightarrow R-CH_3$)
ドッキング解析配列数: 106
→ 実験数: 8 → 活性あり: 5

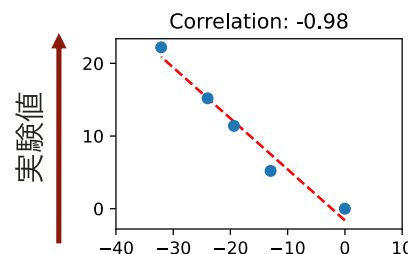


事例2；水酸化反応 ($R-H \rightarrow R-OH$)
ドッキング解析配列数: 43
→ 実験数: 5 → 活性あり: 3

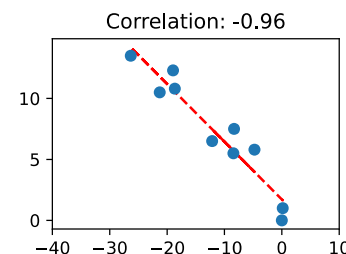


熱安定性の予測

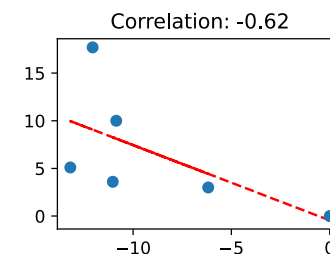
リパーゼ X



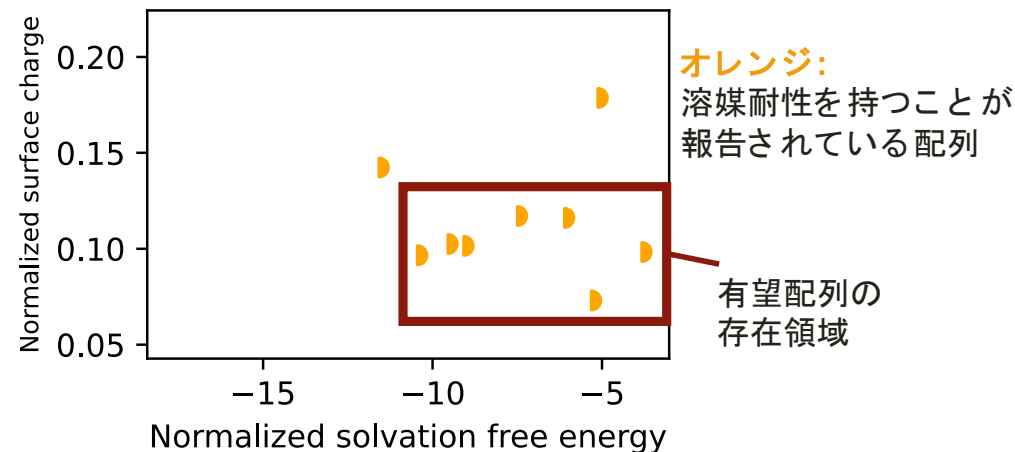
トランスフェラーゼ Y



キシリナーゼ Z



溶媒耐性の予測



digzyme Express™

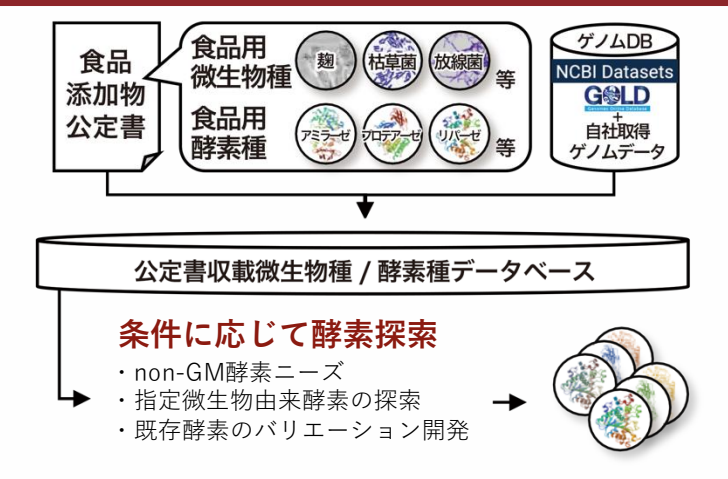


食品産業用酵素に向けたnon-GM生産株デザイン

“digzyme Express™”は、食品産業における非遺伝子組換え（non-GM）^{*1}ニーズに応えるために、食品添加物公定書^{*2}に記載のある微生物種/酵素種から目的に合致する酵素を探索、non-GM対応の生産株をデザインするプラットフォームです。

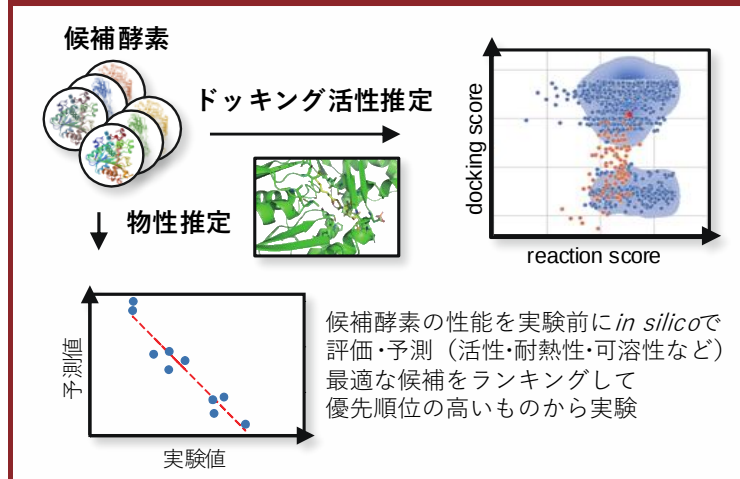
【特徴1】

独自の公定書収載微生物種/酵素種データベースからの探索



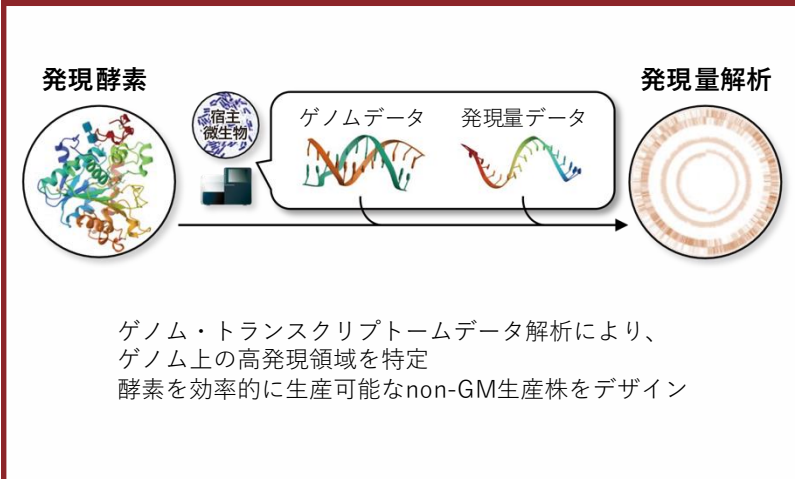
【特徴2】

digzyme Moonlight™ による *in silico* 酵素評価



【特徴3】

ゲノム/トランスクリプトームデータを用いて non-GM 生産株をデザイン



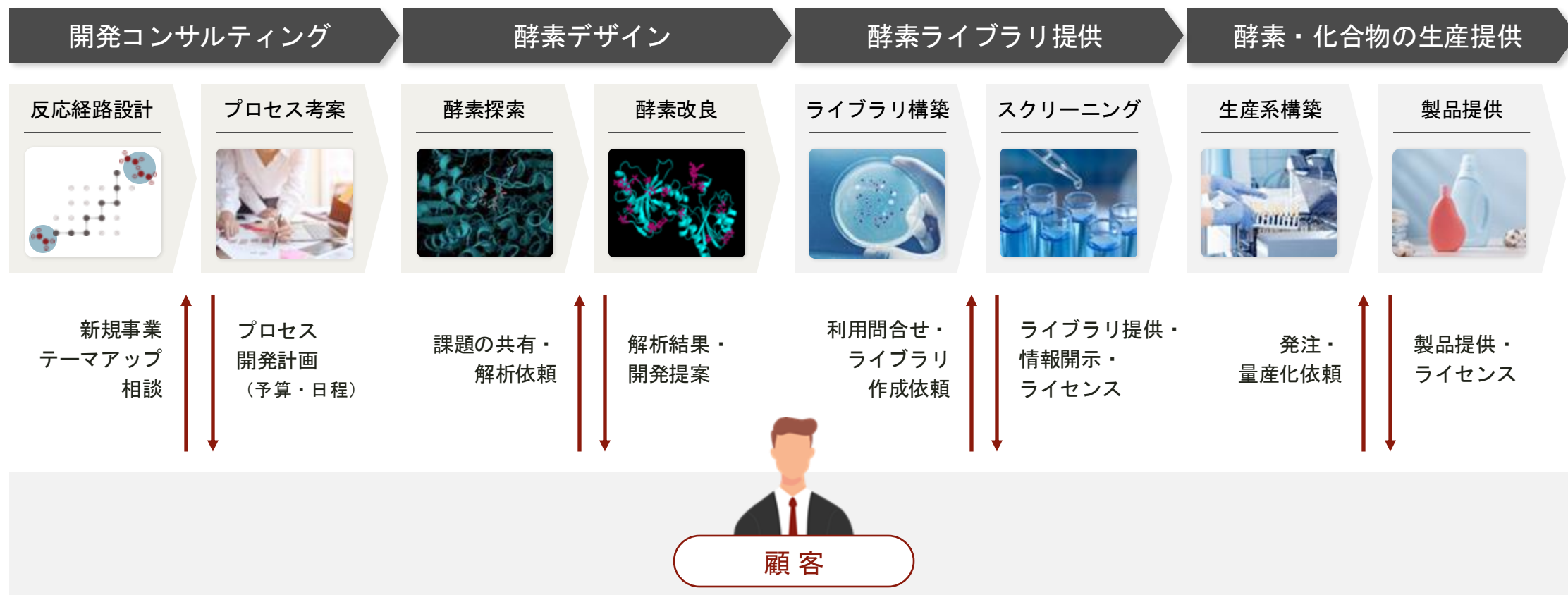
- ・ 日本の食品衛生法において、組換えDNA技術に該当しない手法（セルフクロニング、ナチュラルオカレンス）を用いて、生産株作成を実施
- ・ 食品添加物公定書に収載の微生物種/酵素種に関するデータベースから探索
- ・ digzyme Moonlight™ プラットフォームの *in silico* 評価による効率的なスクリーニング
- ・ 生産株のゲノム・トランスクリプトームデータから、ゲノム上の高発現領域を特定し、酵素を効率的に生産可能な non-GM 生産株をデザイン

*1 食品衛生法上の遺伝子組換え酵素に該当しないこと（セルフクロニング、ナチュラルオカレンス）

*2 第10版食品添加物公定書 (<https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/001208056.pdf>)

事業化に向けたシームレスな開発プラットフォームを構築

ユーザーの業態に合わせて柔軟なサービス提供が可能



ビジネスモデル

