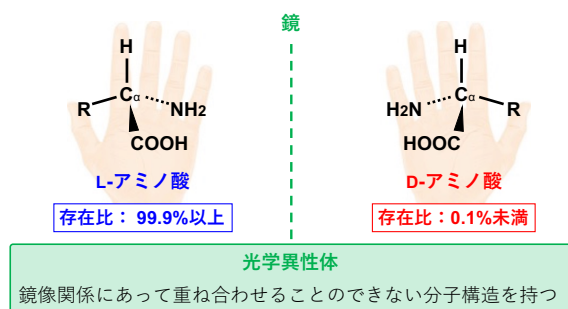


D-アミノ酸酵素合成法への応用を目的とした *Candidatus Syntrophocurvum alkaaliphilum* 由来 *meso*-ジアミノピメリン酸脱水素酵素の機能解析

日大生産工（学部）○長谷川 亮,
日大生産工 小森谷 友絵, 秋田 紘長

1. 緒言

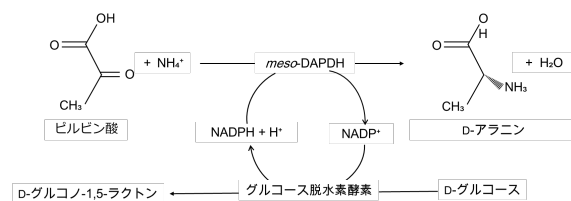
グリシンを除く標準アミノ酸には不斉炭素が存在するため、D-アミノ酸とL-アミノ酸の2種類の光化学異性体が存在する（図1）。



L-アミノ酸は、生物の代謝産物やタンパク質の構成成分として機能する。従って、自然界に存在するアミノ酸のうち、L-アミノ酸が99.9%以上の存在比を締めていると考えられている。また、L-アミノ酸は飼料や食品をはじめ、多様な用途を持つため、既に市場が形成されている。2010年以前は、高等生物の細胞からL-アミノ酸のみが検出されていたため、「L-アミノ酸は生体内で様々な生理機能を持つが、D-アミノ酸は生体内に存在しない」と考えられていた。一方、2010年以降の分析技術の発展を受けて、D-アミノ酸が生体内に微量に存在し、重要な生理機能を担っていることが解明され始めている。それに伴い、現在では、製薬等の医薬品やサプリメント等のヘルスケア製品の一部に、D-アミノ酸が利用され始め、その市場は日本を含むアジア諸国を中心に増大している。

D-アミノ酸の合成法は、化学合成法と酵素合成法の二種類に大別できるが、合成に必要なエネルギーと副生成物の副生を抑えることができるため、酵素合成法が産業利用されている。但し、既存の酵素合成法は、複数種の酵素を利用した反応工程から構成されているため、合成コストが高く（最も安価なD-アラニンの販売価格：18万円/kg）、産業利用が制限されている。これらの課題を鑑みて、本研究では、

D-アミノ酸の安価な供給を可能にするため、合成工程を簡略化した新規酵素合成法の開発に取り組んでいる（図2）。そこで本発表では、新規酵素のコア技術であり、D-アミノ酸を一段階反応（2-オキソ酸のアミノ化）で合成できる *meso*-ジアミノピメリン酸脱水素酵素（*meso*-DAPDH）の酵素化学的性質について報告する。



2. 実験方法

2.1 発現ベクターの作製

先行研究では、D-アミノ酸を一段階反応で合成可能な NAD(P)⁺依存性 *meso*-DAPDH を二種類取得している¹⁾。本研究では、より安定性の高い *meso*-DAPDH を取得するため、取得した酵素のアミノ酸配列を参照配列に利用してデータベース上で広範に探索し、*Candidatus Syntrophocurvum alkaaliphilum* 由来 *meso*-DAPDH を選定した。

人工合成した *Candidatus S. alkaaliphilum* 由来酵素を発現ベクター pET-16b に挿入し、pET-16b/*meso*-DAPDH を取得した。

2.2 酵素の精製

組換え大腸菌 BL21 (DE3) と pET-16b/*meso*-DAPDH を利用し、既報¹⁾に倣って精製酵素を調製した。

2.3 酵素の活性測定

酵素活性は、*meso*-ジアミノピメリン酸の酸化的脱アミノによって生じる吸光度の増加、または 2-オキソ酸の還元的アミノ化によって生じる吸光度の減少に基づいて測定した。

酸化的脱アミノ化反応は、200 mM 緩衝液 (pH 10.5)、10 mM *meso*-ジアミノピメリン酸、

Characterization of *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from *Candidatus Syntrophocurvum alkaaliphilum* for enzymatic synthesis of D-amino acids

Ryo HASEGAWA, Tomoe KOMORIYA, Hironaga AKITA

1.25 mM NADP⁺, 精製酵素を含む反応溶液 (1 mL)を用いて測定した。一方, 還元的アミノ化反応は, 200 mM 緩衝液 (pH 9.0), 200 mM NH₄Cl, 5 mM 2-オキシ酸, 0.1 mM NADPH, 精製酵素を含む反応溶液 (1 mL)を用いて測定した。酵素活性は, 分光光度計 UV-1800 (島津製)を用いて, 反応温度 50℃で測定した。

2.4 酵素の機能解析

最適温度は, 反応温度を 30–55℃に変化して評価した。酸化的脱アミノ化反応の至適 pH は, ホウ酸緩衝液 (pH 8.0–9.0)と炭酸緩衝液 (pH 9.0–10.0)を用いて評価した。還元的アミノ化反応の至適 pH は, 酢酸緩衝液 (pH 6.0–6.5)とリン酸緩衝液 (pH 6.5–8.0)を用いて評価した。

熱安定性は, 精製酵素を各温度 (40–65℃)で 30 分間処理した後の残存活性に基づいて評価した。pH 安定性は, リン酸緩衝液 (pH 1.5–3.0, pH 6.5–8.0), ギ酸緩衝液 (pH 3.0–4.0), 酢酸緩衝液 (pH 4.0–5.5), クエン酸緩衝液 (pH 5.5–6.5), ホウ酸緩衝液 (pH 8.0–9.0)を用いてサンプルを処理し, 残存活性に基づいて評価した。

3. 実験結果および考察

Candidatus *S. alkaaliphilum* 由来 *meso*-DAPDH の粗酵素液を調製後, 熱処理 (50℃, 30 分間処理), DEAE クロマトグラフィーと Ni²⁺キレートクロマトグラフィーに処して均一に精製した。

精製酵素の脱アミノ化反応の至適 pH は 9.0, アミノ化反応の至適 pH は 6.5 となった (図 2)。精製酵素を用いて熱・pH 安定性を評価したところ, Candidatus *S. alkaaliphilum* 由来 *meso*-DAPDH は, 50℃と pH5.0–7.0 で処理した場合, 60%以上の残存活性を示した (図 2)。

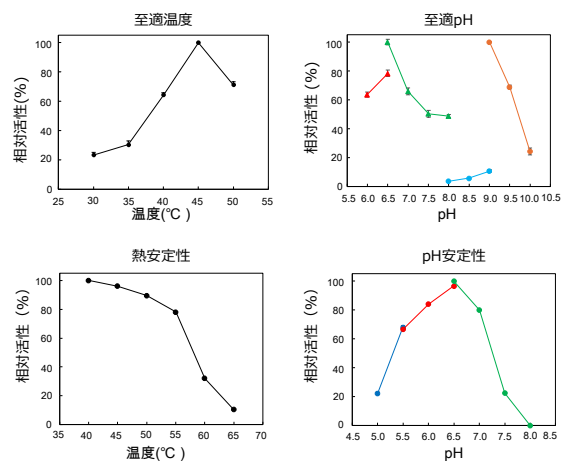


図 2 精製酵素の諸性質

次に, 精製酵素を用いて基質特異性を評価したところ, 2-オキシ酸の種類を変えることで, 8 種以上の D-アミノ酸の合成をした (表 1)。

表 1 精製酵素の基質特異性

2-オキシ酸	D-アミノ酸	比活性 (U/mg)
オキサロ酢酸	D-アスパラギン酸	0.238 ±0.929
2-オキシ酪酸	D-2-アミノ酪酸	0.206 ±0.709
ピルビン酸	D-アラニン	0.271 ±0.709
3-メチル2-オキシ吉草酸	D-イソロイシン	0.769 ±0.967
2-オキシグルタル酸	D-グルタミン酸	0.144 ±0.709
2-オキシ吉草酸	D-ノルバリン	0.0952 ±0.967
3-メチル2-アミノブタン酸	D-バリン	0.399 ±0.929
4-メチル2-アミノペンタン酸	D-ロイシン	0.376 ±0.464

Candidatus *S. alkaaliphilum* 由来 *meso*-DAPDH は, 先行研究で取得した二種類の酵素と比較して, アミノ化反応の至適 pH が低い¹⁾。新規 D-アミノ酸酵素合成法では, NADP⁺の再生を促して D-アミノ酸の合成効率を向上するため, カップリング反応にグルコース脱水素酵素を利用する (図 2)。即ち, Candidatus *S. alkaaliphilum* 由来 *meso*-DAPDH の利用により, これまでカップリング反応に利用することが困難であった酵母や乳酸菌由来のグルコース脱水素酵素 (至適 pH pH 8.0–9.0)の利用が可能になり, より広範な酵素合成法の条件検討が可能になった。

Candidatus *S. alkaaliphilum* 由来 *meso*-DAPDH は, 産業利用されている常温菌由来の酵素と比べて安定性に優れるため, 長期利用が期待できる。しかしながら, 還元的アミノ化反応の比活性が低いため, 産業利用するためには, タンパク質工学的な変異導入に基づく比活性の向上が必要である。

4. 結言

本研究では, Candidatus *S. alkaaliphilum* 由来 *meso*-DAPDH の機能解析を実施し, 新規 D-アミノ酸酵素合成法への利用可能性を見出した。今後は, 体内時計調節機能を有し, 生活習慣病や, 睡眠障害の治療・改善薬利用に期待が高まっているD-アラニンを合成ターゲットとして, 新規D-アミノ酸酵素合成法開発に着手する。

参考文献

- 1) H. Akita, Y. Nakamichi, T. Morita, A. Matsushika, “Characterization of an NAD(P)⁺-dependent *meso*-diamino pimelate dehydrogenase from *Thermosyntropha lipolytica*” BBA-Proteins Proteom. (2020) 1868:140476.