

自然界からは未発見の有用アミノ酸脱水素酵素の酵素工学的創製

櫻庭 春彦、米田 一成¹、大島 敏久²

香川大・農・応用生物学、¹東海大・農・バイオ、²大阪工大・工・生命

キーワード: meso-ジアミノピメリン酸脱水素酵素、D-アミノ酸脱水素酵素、L-フェニルアラニン脱水素酵素、L-トリプトファン脱水素酵素

研究概要

酵素は生物が生命維持のために生産する物質であり、必ずしも人工的な利用に適した性質を持つものではない。そのため、目的にかなう機能を備えた人工酵素の創製が期待されている。本研究では、酵素の構造情報を踏まえた変異により、産業に有用なD-グルタミン酸、D-フェニルアラニンおよびL-トリプトファンなどの合成に利用できる新規アミノ酸脱水素酵素を創製することを目的とした。

2種のアミノ酸脱水素酵素を対象に、基質特異性の変換を検討した。対象とする酵素はmeso-ジアミノピメリン酸脱水素酵素 (DAPDH) から作成した人工D-アミノ酸脱水素酵素 (DAADH) とL-フェニルアラニン脱水素酵素 (L-PheDH) である。両酵素は好熱菌由来で高い安定性を保持する。これらの構造情報に基づき、基質結合ポケットを形成するアミノ酸残基に変異を加え基質特異性の改変を図った。

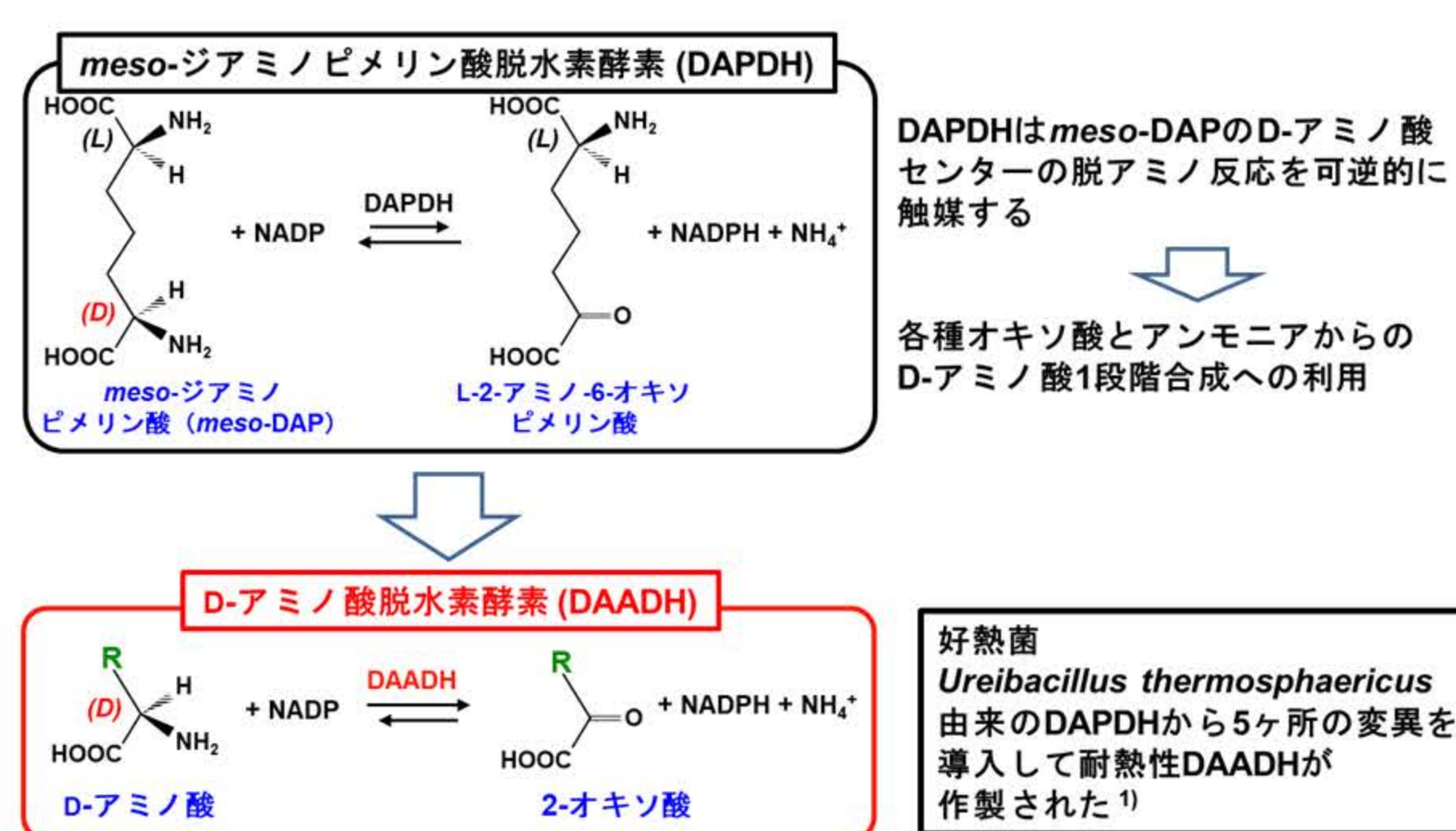
DAPDHから作成したDAADHは主にD-リジンに高い活性を示す。その基質結合に関与するAsp94をアラニンに変異させたD94Aは、親酵素と比較してD-フェニルアラニンに対する反応性が約50倍と大きく上昇した。またL-グルタミン酸脱水素酵素の構造を参考に更なる変異導入を行い、D94A/W148K/D124Sを作成したところ、D94AやDAADHに無かったD-グルタミン酸に対する反応性を獲得した。

L-トリプトファン脱水素酵素 (L-TrpDH) はラン藻などに存在するが、不安定で利用が困難である。我々が見出した耐熱性L-フェニルアラニン脱水素酵素 (L-PheDH) との構造比較において、L-PheDHで基質の側鎖周辺に存在するLeu50およびLeu313がL-TrpDHではメチオニンに置換されていた。L-PheDHのL50M/L313M変異酵素を作成したところ、L-トリプトファンに対する反応性が上昇した。

結果・考察

① 先行研究: 耐熱性NADP依存性D-アミノ酸脱水素酵素の作製

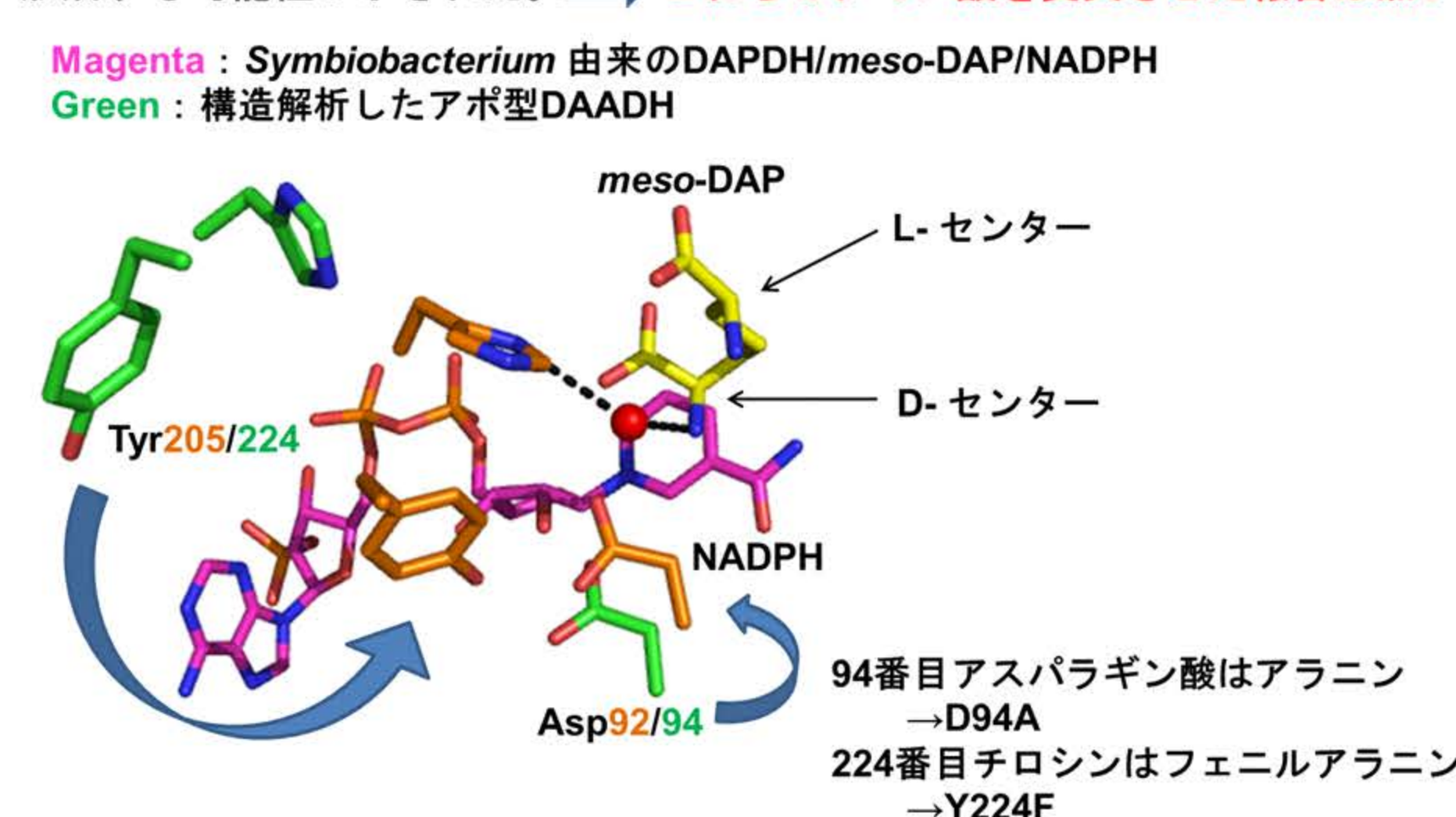
D-アミノ酸: 医薬品、化粧品などへの利用⇒多様なD-アミノ酸の簡便な生産法の開発が求められる



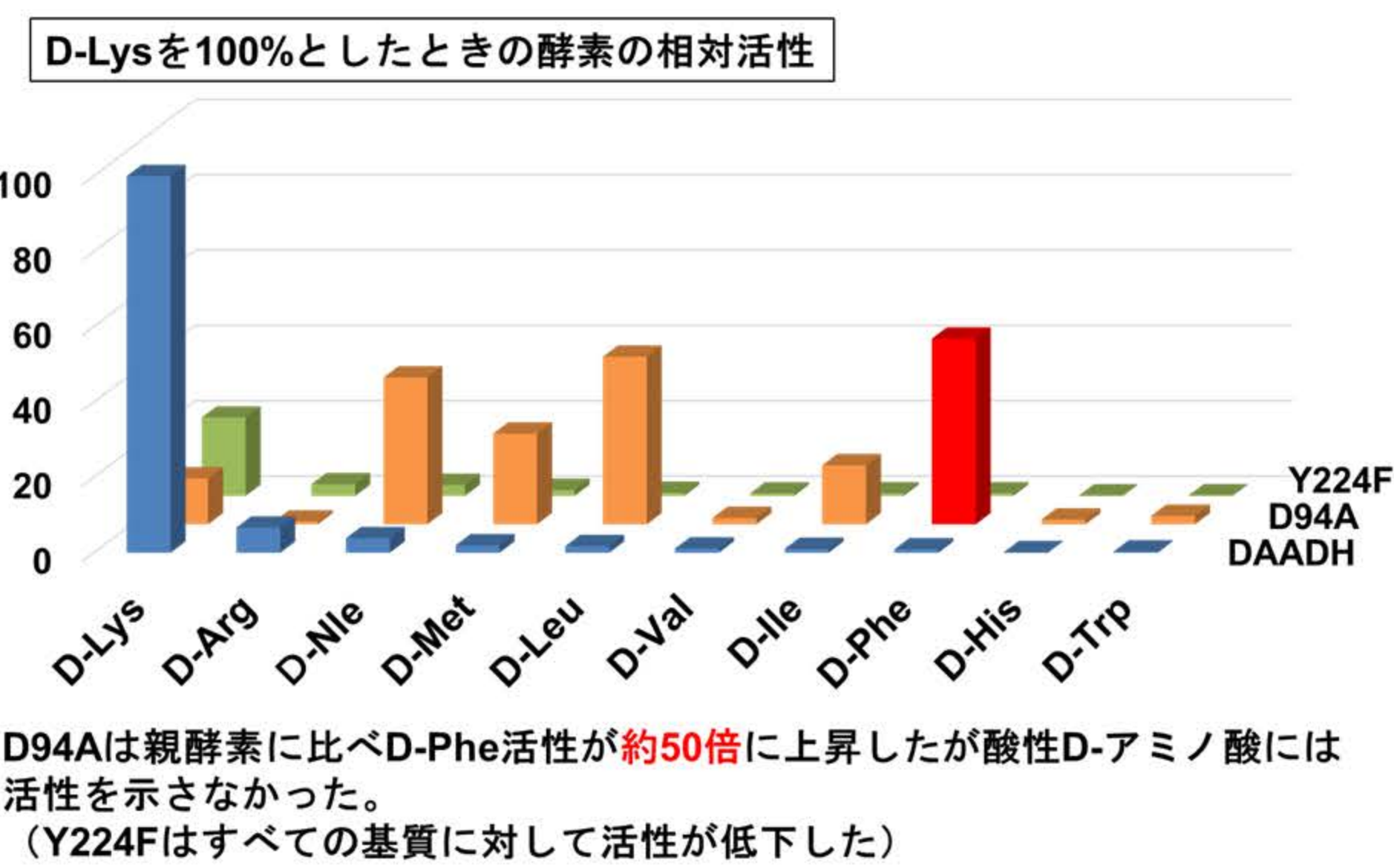
1) Akita et al., *Biotechnol. Lett.*, 2012, 34, 1693-1702

② DAADHの構造(アポ型)

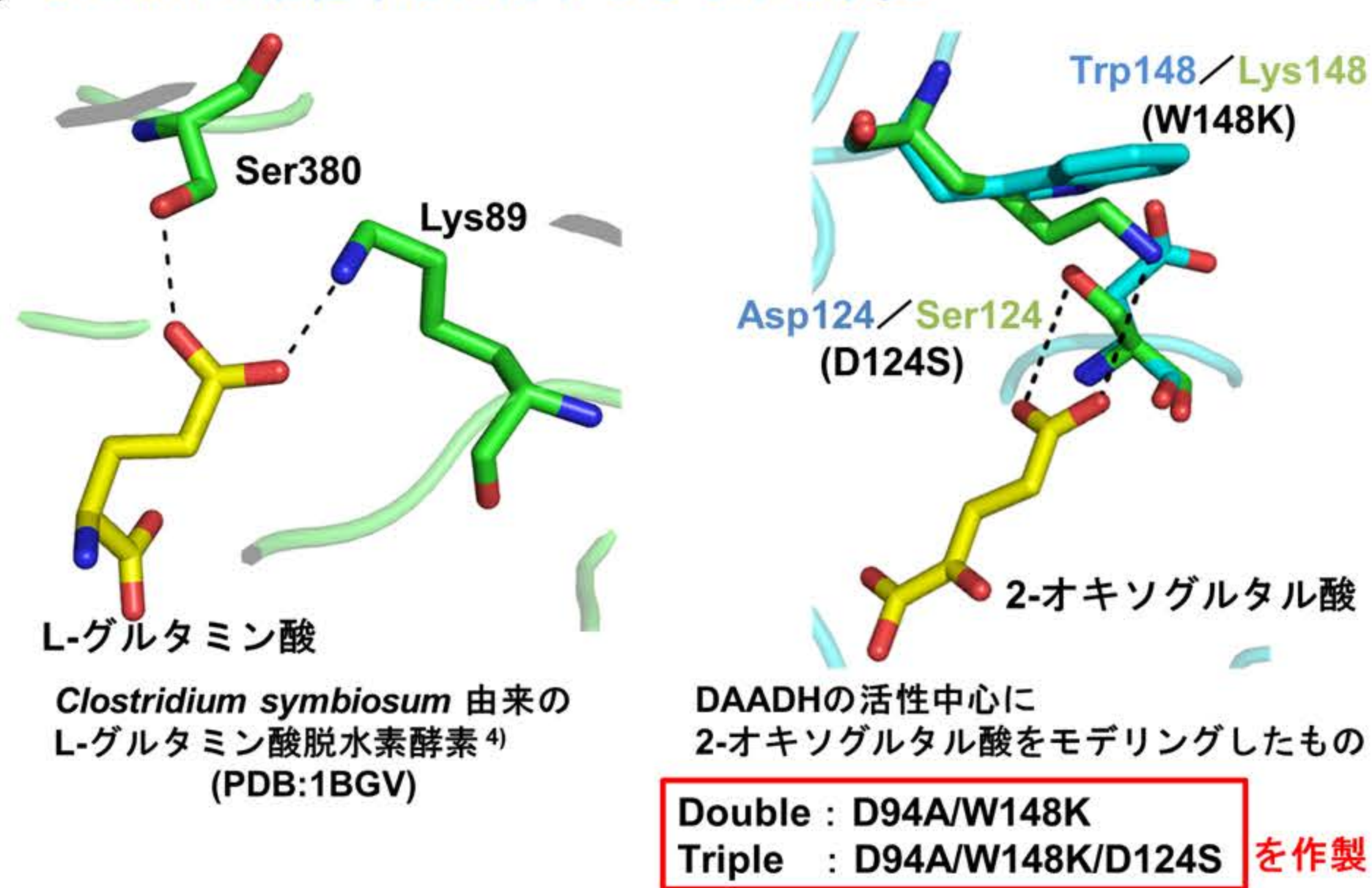
*Symbiobacterium*由来のDAPDH(三者複合体の構造)と重ね合わせるとTyr224およびAsp94がD-アミノ酸センター近傍で基質結合部位の一部を形成する可能性が示された。→これらのアミノ酸を変異させた報告は無い



③ 変異酵素の基質特異性 (脱アミノ反応)



④ DAADHの活性中心に対するさらなる改変



4) Stillman T. J. et al., *J. Mol. Biol.*, 1998, 234, 1131-1139

⑤ 各種アミノ酸に対する活性

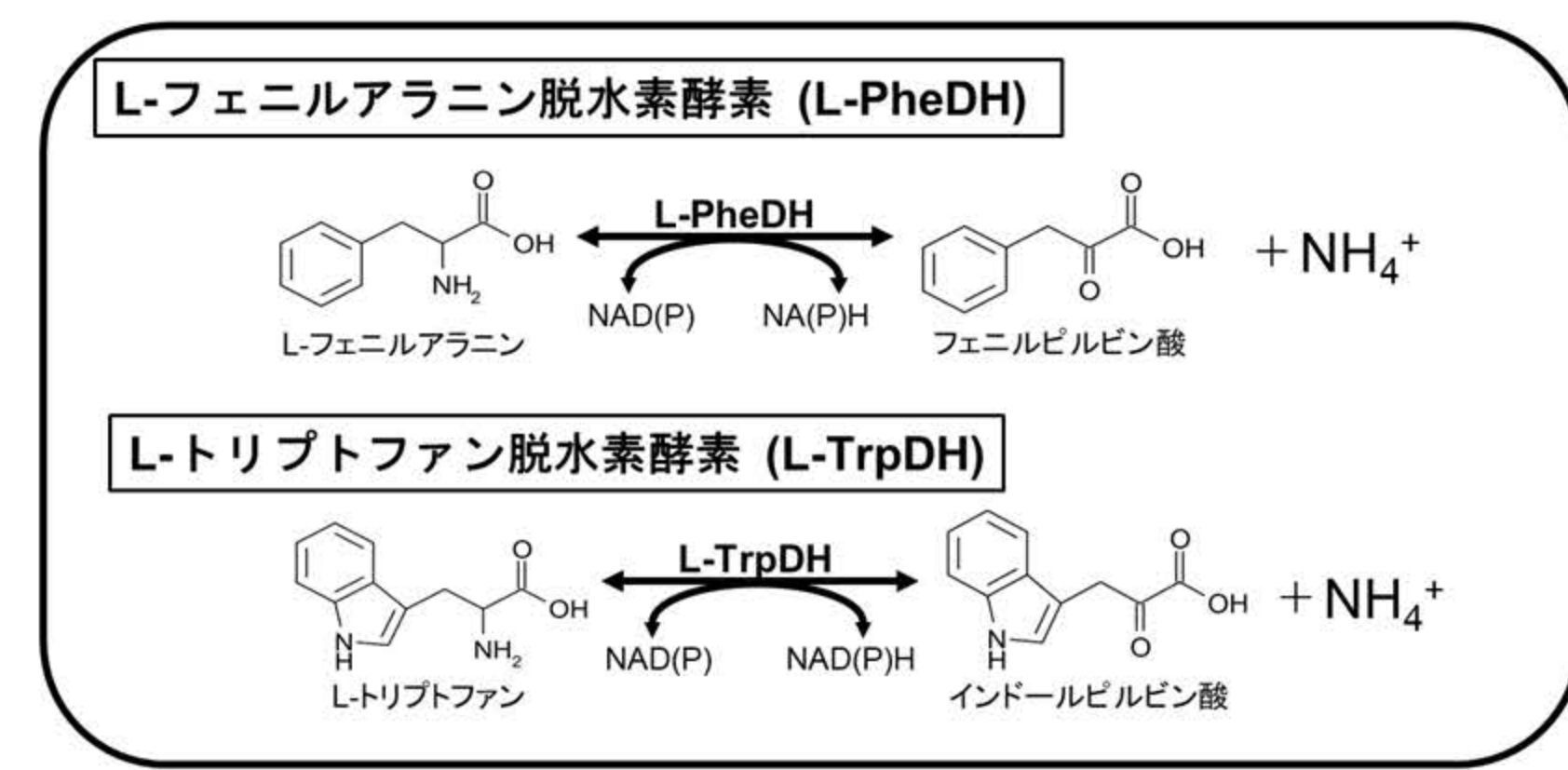
	Single	Double	Triple
D-アスパラギン酸	ND	ND	ND
D-グルタミン酸	ND	ND	0.93
D-アスパラギン	ND	ND	ND
D-グルタミン	0.04	ND	ND
D-フェニルアラニン	0.69	ND	0.63
D-チロシン	0.10	ND	0.31
D-トリプトファン	0.10	ND	0.82

比活性 (μmol/min/mg)
ND= not detectable

TripleはD-グルタミン酸に対して活性を示した

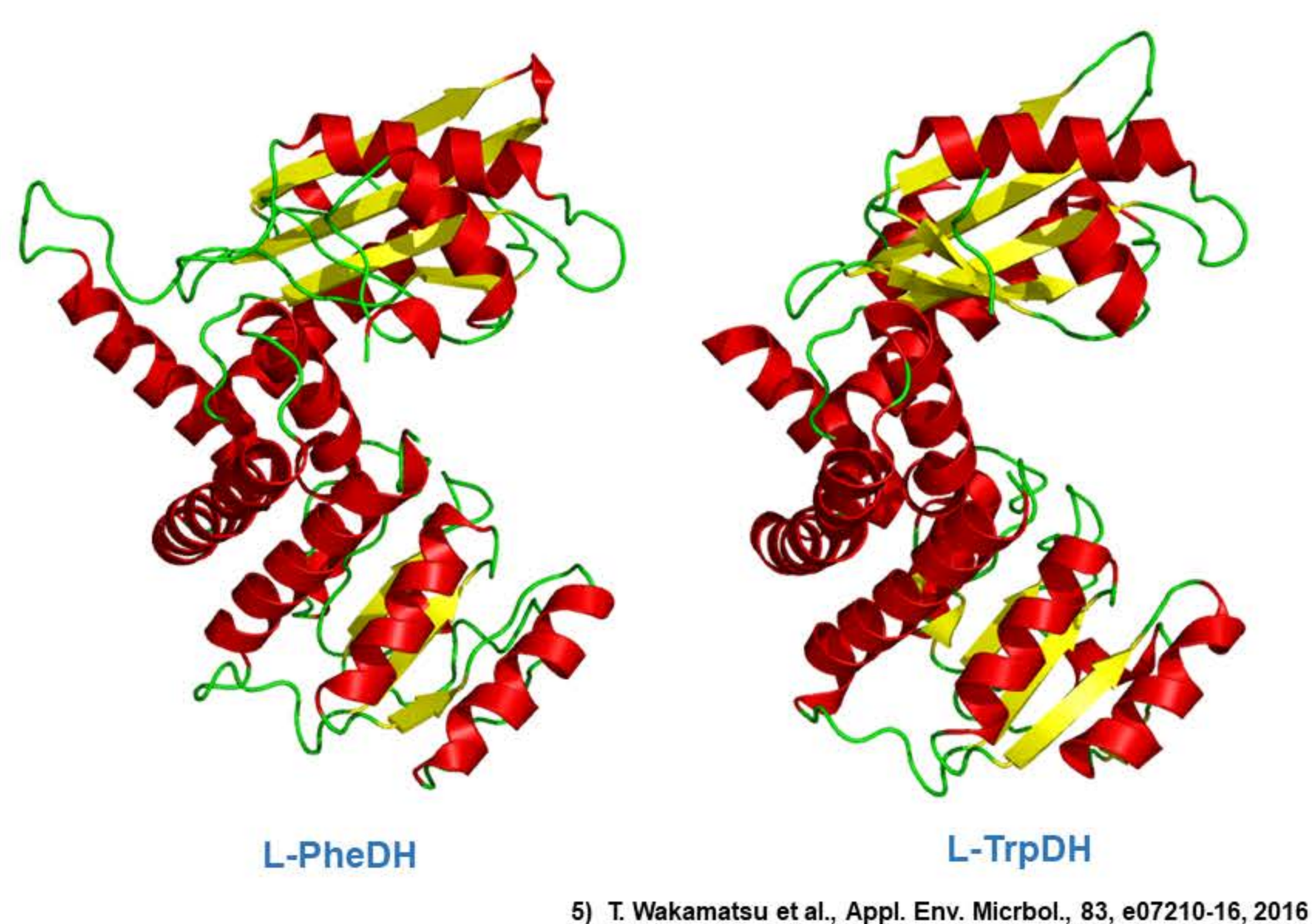
・D-チロシンとD-トリプトファンに対してはTripleで比活性の向上が見られた。

⑥ 先行研究: 好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* 由来L-PheDHはL-トリプトファンに対して、少ないながら活性を示す。

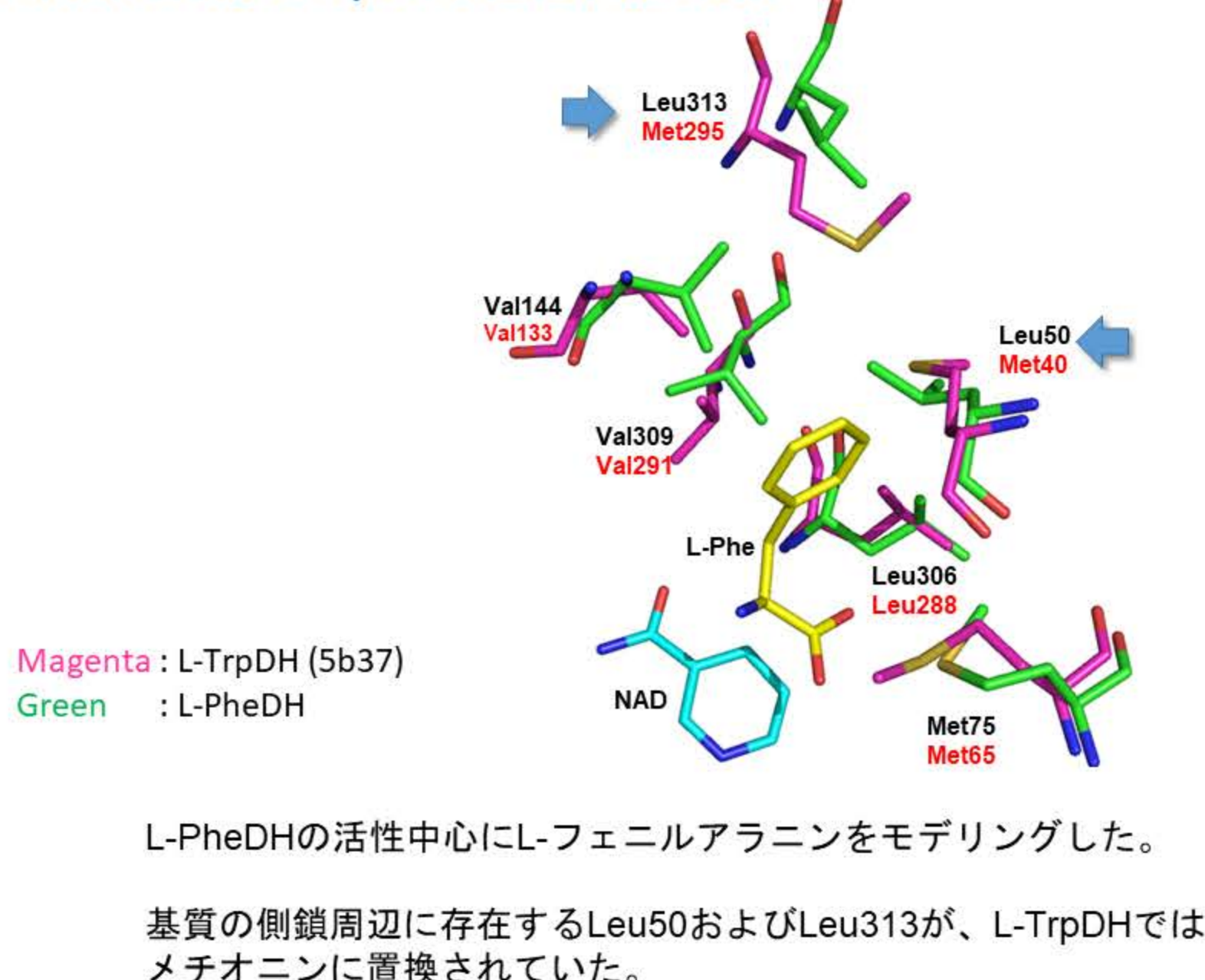


- ・L-トリプトファン脱水素酵素 (L-TrpDH)は、一部の植物やラン藻で数例報告されているが、生化学的情報は限られており、結晶構造は我々が解析したラン藻 L-TrpDHの1例のみである。
- ・常温生物のL-TrpDHは安定性が低く、その応用が困難である。

⑦ *G. kaustophilus* 由来L-PheDHおよび *Nostoc punctiforme* (ラン藻)由来L-TrpDH⁵⁾の結晶構造



⑧ L-PheDHおよびL-TrpDHの活性中心の比較



⑨ 先行研究においてHis-tagをつけた *G. kaustophilus* 由来L-PheDHは活性が低くいため、His-tagを取り除いたL-PheDHを精製し構造解析した。

L50M、L313Mの2箇所に変異を加えた。

60°C, pH10での活性測定の結果

	Tagあり酵素	Tagなし酵素	2箇所変異導入酵素
L-Phe	10.6	90.03	144.68
L-Trp	1.29	22.0	30.15

変異酵素ではL-トリプトファンに対する反応性が上昇した

D-フェニルアラニンやL-トリプトファンは医薬品などの原料として有用であり、D-グルタミン酸には皮膚のバリア機能回復効果があることが報告されている。化学合成で生産する場合、酸性D-アミノ酸ではCOOH基保護などの複雑な工程が必要であり、D-フェニルアラニンやL-トリプトファンでは複数回の再結晶を経て高い光学純度を達成している。このため、1ステップで高純度のアミノ酸生産が可能な酵素合成法の開発が求められる。今回作成した人工アミノ酸脱水素酵素に今後さらなる改良を加えることで、これら有用アミノ酸合成への利用が期待される。