Award Accounts

第6回 D-アミノ酸学会奨励賞

耐熱性 NADP⁺依存性 D-アミノ酸脱水素酵素の 創製と応用

秋田 紘長

国立研究開発法人 産業技術総合研究所 機能化学研究部門

1.はじめに

タンパク質を構成するアミノ酸には、グリシ ンを除き不斉炭素が存在するため、D-アミノ酸 と L-アミノ酸の 2 種類の鏡像異性体が存在する。 L-アミノ酸は、タンパク質やペプチドの構成要 素として含まれるなど、生体内で様々な役割を 担っている。一方で、D-アミノ酸は、D-アラニ ン残基と D-グルタミン酸残基が微生物の細胞壁 中¹⁾に含まれる以外は生物の細胞内には存在せ ず、あまり重要な生理機能を持たないと長年考 えられてきた。しかし、近年の分析技術の飛躍 的発展を受けて生体内における D-アミノ酸の解 析が進み、ヒトを含む哺乳類や水生動物などの 高等生物の細胞内から D-アミノ酸が検出されて いる。さらに、D-セリンによる脳内 M-メチル-D-アスパラギン酸型グルタミン酸受容体へのコア ゴニスト作用²⁾や D-アスパラギン酸による精巣 内での男性ホルモンの調節作用³⁾など、遊離 D-アミノ酸がヒト体内で特異的な生理機能を担っ ていることが解明されている。また、ヒト以外 の高等生物に対する生理機能として、D-イソロ イシンの添加による菌類成長促進作用 4)や、D-ロイシン等の添加によるバイオフィルムの分解 促進作用⁵⁾も報告されている。それに伴い現在 では、製薬や抗生剤などの医薬品、化粧品や機 能性食品などのヘルスケア製品などの生産に D-アミノ酸が有効利用され始めている。このよう

な背景を受けて、D-アミノ酸の需要は今後、日本を含めたアジア諸国を中心に増大することが 試算されている⁶⁾。

有用物質生産の供給源として D-アミノ酸の必 要性が高まる一方で、合成法は限られている。 D-アラニン以外の D-アミノ酸は発酵生産できな いため⁷⁾、D-アミノ酸の主な合成法は、酵素合 成法と化学合成法に大別される。特に酵素合成 法は化学合成法と比べて、合成に必要なエネル ギーと副生成物の生成が抑えられるため、現在 までにいくつかの方法が工業化されている。例 えば、D-ヒダントイナーゼ (EC 3.5.2.2)とD-カ ルバモイラーゼ (EC 3.5.1.77)を用いた方法に より、年間数千トンの D-フェニルグリシンが合 成され^{8,9}、細菌感染症の治療に用いられる半合 成抗生物質アモキシシリンの中間原料として利 用されている。また、N-アシル-DL-アミノ酸を D-アミノアシラーゼ (EC 3.5.1.81) で分解し、D-アミノ酸を回収する方法も広く産業利用されて いる ⁹。さらに、アルドラーゼを利用して、ホ ルムアルデヒドとグリシンから D-セリンを合成 する方法も国内企業で利用されている¹⁰。これ らに加えて、 2006 年には、常温菌 Corynebacterium glutamicum 由来の meso-ジア ミノピメリン酸脱水素酵素 (EC 1.4.1.16; meso-DAPDH)からタンパク質工学的に創製された D-ア ミノ酸脱水素酵素 (D-AADH)を利用する合成法が 報告された¹¹⁾。この方法で用いられた meso-



図1 meso-DAPDHの触媒する反応と非酵素的環化反応

meso-DAPDH が触媒する反応は、細胞内では可逆的に進行する。試験管中では、L-2-アミノ-6-オキソピメ リン酸が、非酵素的に環化するため逆反応は進行しない。

DAPDHは、分子内にD型とL型の二つのアミノ酸 部位を持つ meso-ジアミノピメリン酸のD型アミ ノ酸部位をNADP⁺依存的に脱アミノ反応して、オ キソ酸を生成する (図1)。meso-DAPDH は基質特 異性が非常に高く、基質の利用は meso-ジアミ ノピメリン酸(アミノ化反応の場合は、L-2-ア ミノ-6-オキソピメリン酸)のみに限られる。-方で、新たに創製された D-AADH の基質特異性は 低く、数種の D-アミノ酸の脱アミノ反応を可逆 的に触媒した。また、D-AADH を利用する合成法 では、2-オキソ酸のアミノ化反応により一段階 反応で D-アミノ酸を合成できる点で、従来の D-アミノ酸の酵素合成法より簡便であった。しか し、この D-AADHは、常温菌由来の meso-DAPDH か ら創製されているため安定性が低く、産業利用 への展開は困難な状況であった。このような背 景のもと、筆者らは、安定性に優れる meso-DAPDH からタンパク質工学的に耐熱性 D-AADH を 創製し、各種 D-アミノ酸の実用的合成法の確立 を目指した。

2.耐熱性 NADP⁺依存性 D-アミノ酸 脱水素酵素の創製

ー般的に、高温環境で生育している好熱菌由 来のタンパク質は、常温菌由来のタンパク質に 比べてより安定性が高く、長期保存が可能なこ とから、酵素の産業的利用において大きな利点 を示す^{12,13)}。そこで筆者らは、好熱菌由来の *meso*-DAPDH を素材に利用して、安定性に優れる D-AADHの創製を目指した。

meso-DAPDH は、ある種の微生物内で L-アスパ ラギン酸からの L-リジン生合成経路で機能し、 中間代謝物であるL-2-アミノ-6-オキソピメリン 酸から meso-ジアミノピメリン酸への合成を担 っている¹⁴⁾。1970年代以降、Bacillus sphaericus¹⁵⁾や C. glutamicum¹⁶⁾をはじめ、数種 の細菌¹⁷⁾から*meso*-DAPDHが発見され、酵素化学 的特徴が明らかにされている。これまでに、L-リジン生合成経路は、アセチラーゼ経路、スク シニラーゼ経路、脱水素酵素経路の三つの異な る生合成経路が提唱されているが¹⁴⁾、後者の脱 水素酵素経路を持つ微生物種は少なく、一部の 細菌に限られている。そのため、筆者らが研究 を開始した 2010 年当初、高い安定性が期待でき る好熱菌由来の meso-DAPDH の報告例はなく、デ ータベースで得られる好熱菌のゲノム情報から も本酵素の遺伝子ホモログを見出だせなかった。 そこで、古くから利用される手法であるが、製 品評価技術基盤機構や DSMZ などの国内外の微生 物保存機関から入手した好熱菌とともに、火山

の熱水噴出物、温泉泥、堆肥などの自然界に存 在する高温環境土壌から単離した 100 種を超え る好熱菌を対象に、meso-DAPDH 活性の広範なス クリーニングを実施した。その結果、福岡県宗 像市でサンプリングした堆肥から分離した好熱 菌 1 株の粗酵素液中に NADP⁺依存的に meso-ジア ミノピメリン酸の脱アミノ反応を触媒する meso-DAPDH 活性を見出した¹⁸⁾。この分離株の培 養条件を最適化した後に、培養菌体からゲノム DNA を抽出し、これを鋳型として 16S rRNA 遺伝 子を増幅した。次に、増幅された 16S rRNA 遺伝 子の系統解析から、分離株を Ureibacillus thermosphaer icus と同定した¹⁸⁾。

U. thermosphaer icus の培養細胞の破砕液か ら各種クロマトグラフィーにて高純度に精製し た meso-DAPDH は、60°C (30 分間処理)および pH 5.0-11.0 (50°C で 30 分間処理)の条件下でも変 性失活せず、既知の常温菌由来の酵素と比較し て期待通りの高い安定性を示した¹⁸⁾。その一方 で、本酵素は、常温菌由来の酵素と同様に、 meso-ジアミノピメリン酸と NADP⁺に高い特異性 を示した¹⁸⁾。

U. thermosphaericus 由来の meso-DAPDH 遺伝 子の塩基配列は、サザンハイブリダイゼーショ ン法によって明確に解読できなかったため、タ カラバイオ社製 TaKaRa LA PCR[™] in vitro Cloning Kit を利用して解読した¹⁹⁾。次に、U. thermosphaericus と C. glutamicum 由来の両酵 素のアミノ酸配列を利用してシーケンスアライ メントを作成し、配列の比較解析を行った。そ の結果、両者の配列相同性は 46%であったが、 C. glutamicum 由来の meso-DAPDH に含まれる基 質認識に関与するアミノ酸残基が、U. thermosphaer icus 由来の酵素にも同様に保存さ れていた¹⁸⁾。そこで、既報の D-AADH 創製に関す る情報を基に、U. thermosphaericus 由来の meso-DAPDH に対して、GIn154Leu、Asp158Gly、 Thr173Ile、Arg199Met、His249Asnの5種類の変 異を導入して、D-AADH への基質特異性の変換を 行った。

調製した変異酵素が D-AADH 活性を有するか確認するため、組換え大腸菌から精製した変異酵

素を未変性 PAGE に処し、活性染色で D-AADH 活 性の検出を行った。その結果、変異酵素は親酵 素の基質である meso-ジアミノピメリン酸に対 する活性を完全に消失し、新たに D-イソロイシ ンに対する酸化的脱アミノ反応を示した (図 2)。 また、本変異酵素は、NADP⁺依存的に数種の D-ア ミノ酸の脱アミノ反応を触媒し、この基質特異 性は常温菌由来の D-AADH とは異なった(表 1)。 さらに、本変異酵素は、親酵素では検出できな い NADPH 依存的な 2-オキソ酸のアミノ化による D-アミノ酸の合成反応を触媒した (表 1)。また、 変異導入による酵素の安定性低下は確認されず、 本変異酵素は、親酵素と同様の優れた安定性を 示した²⁰⁾。これらのことから、筆者らは、初め て耐熱性 D-AADH の創製に成功した。



図 2 未変性 PAGE 後の活性染色法による D-AADH 活性の確認

D-イソロイシン (左試験管)と meso-ジアミノ ピメリン酸 (右試験管)を基質に用いた場合の活 性染色結果を示した。また、マーカーにはブロ モフェノールブルー色素を用いた。

3.耐熱性 NADP⁺依存性 D-アミノ酸 脱水素酵素の応用

筆者らは、安定性に優れ、数種類の D-アミノ酸の 2-オキソ酸への可逆的な脱アミノ反応を 触媒する耐熱性 D-AADH を新たに創製した。そこ

表 1 D-AADH の脱アミノ反応とアミノ化反応におけ る基質特異性

*酵素活性は、0.33 µmol/min/mg。

**酵素活性は、4.1 µmol/min/mg。

脱アミノ反応			
D-アミノ酸	相対活性 (%)		
D-シクロヘキシルアラニン	100*		
D-イソロイシン	65 ± 0.8		
D-2-アミノオクタン酸	61 ± 1.0		
D-リジン	59 ± 0.4		
D-シクロフェニルアラニン	58 ± 1.2		
D-2-アミノヘプタン酸	49 ± 1.4		
D-ノルロイシン	26 ± 0.1		
D-ロイシン	25 ± 0.6		
D-ノルバリン	9 ± 0.6		
D-オルニチン	9 ± 0.2		
D-バリン	4 ± 0.1		
D-メチオニン	3 ± 0.7		
D-4-フルオロフェニルアラニン	2 ± 1.1		
D-4-クロロフェニルアラニン	2 ± 0.8		
D-フェニルアラニン	2 ± 0.8		
D-アルギニン	2 ± 0.6		
アミノ化反応			
2-オキソ酸	相対活性 (%)		
2-オキソオクタン酸	100**		
2-オキソヘキサン酸	67 ± 0.6		
3-メチル-2-オキソ酪酸	21 ± 2.0		
3-メチル-2-オキソ吉草酸	18 ± 0.7		
2-オキソ酪酸	6 ± 0.8		

で本酵素を利用して、化学合成可能な 2-オキソ 酸から D-アミノ酸の高効率な合成法の開発を進 めた。その結果、¹³C や ¹⁵N などの安定同位体で 標識された D-分岐鎖アミノ酸の酵素合成法を確 立した。また一方で、D-AADH の基質特異性を利 用して、D-イソロイシンを特異的かつ簡便に定 量可能な分析法を確立した。本節では、それら に関連する具体的な成果を紹介する。

1) 安定同位体標識 D-分岐鎖アミノ酸の酵素合成

安定同位体標識化合物は、放射性同位体とは 異なり安全性が高く、扱いが容易である。また、 近年の質量分析装置の発展と普及により、生体 内の様々な代謝経路の解明に有効利用されてい る。特に、D-アミノ酸は生体内で重要な生理機 能を持つことが明らかになりつつあり、今後 D-アミノ酸に関連した生理機能を詳細に解明する ため、安定同位体標識 D-アミノ酸の有効利用が 期待される。その一方で、安定同位体標識 D-ア ミノ酸の酵素合成法は知られていなかったので、 筆者らは、耐熱性 D-AADH を利用した安定同位体 標識 D-分岐鎖アミノ酸の酵素合成法の開発を進 めた²²⁾。

D-AADH の反応を利用して、2-オキソ酸から D-分岐鎖アミノ酸を効率良く合成するには、補酵 素 NADPH の再生が重要となる。そこで、本酵素 合成法では、D-AADH による D-分岐鎖アミノ酸の 合成反応と、グルコース脱水素酵素 (EC 1.1.1.47; GDH) による NADPH の再生反応の二共 役酵素反応からなる合成システムを用いた

(図 3A)。D-AADH による D-アミノ酸合成の最適 pH は アルカリ側にあるため、NADPH の再生反応も同 様のアルカリ条件下で行う必要がある。また、 D-アミノ酸の合成とともに生成される NADP⁺は、 アルカリ条件 (特に高温)では非常に不安定なた め、アルカリ条件下での安定性が高い還元型の NADPH に素早く変換することが合成効率を高め るために重要である。そこで、安定性に優れ、 アルカリ条件下でグルコース酸化の最適 pH を有 する好熱好酸性アーキア Sulfolobus tokodaii 由来の GDH²¹⁾を共役酵素反応に利用した。これ により、安価なグルコースを電子供与体に利用 して、NADP⁺から NADPH の再生を可能にした。

D-アミノ酸の合成効率を高めるため、共役反応系の緩衝液の種類(pH)、反応温度、補酵素(NADP*または NADPH)濃度、2種の酵素量比などについて検討し、合成システムの最適化を図った。その結果、3-メチル2-オキソ酪酸と4-メチル-2-オキソ吉草酸から高い変換率(最大 99%)でD-バリンとD-ロイシンをそれぞれ合成できた²²⁾。ただし、3-メチル-2-オキソ吉草酸からD-イソロイシンを合成した場合、その変換率は49%となった²²⁾。これは、原料に利用した3-メチル-2-オキソ吉草酸中には、3*R*と3*S*の2種類の異性体が等量存在し、そのうち3*R*-メチル-2-オキソ吉草酸のみがD-AADHによって立体特異的アミノ化されたため、変換率が49%になったと考えられた。

次に、安定同位体¹³Cで標識された 2-オキソ



図3 耐熱性 D-AADH を利用した酵素合成法と酵素定量法

(A) D-AADH を利用した D-分岐鎖アミノ酸の合成のための酵素共役系。

(B) D-AADH を利用した D-イソロイシンの分光学的酵素分析法。

酸と¹⁵N で標識された塩化アンモニウム (NH₄CI) をそれぞれ用いて、安定同位体標識 D-分岐鎖ア ミノ酸の合成を行った²²⁾。その結果、NH₄CIの代 わりに[¹⁵N]NH₄CI を用いた合成では、D-[¹⁵N]イソ ロイシン、D-[¹⁵N]ロイシン、D-[¹⁵N]バリンの合 成にそれぞれ成功した。また、[1-13C]4-メチル -2-オキソ吉草酸を基質とし、NH₄CI または [¹⁵N]NH₄CIを用いて合成した場合、D-[1-¹³C]ロイ シンと D-[1-¹³C, ¹⁵N] ロイシンの合成を達成でき た。なお、超高速液体クロマトグラフィーによ り合成産物中の光学純度を確認したところ、L-分岐鎖アミノ酸に相当するピークは全く認めら れなかった。また、飛行時間型質量分析により、 安定同位体標識に起因した質量電荷比の増加が 確認された。さらに、核磁気共鳴分析では、全 ての合成産物から安定同位体標識に起因した化 学シフトが確認できた。これらの結果から、耐 熱性 D-AADH を用いた安定同位体標識 D-分岐鎖ア ミノ酸の酵素合成法を確立した。本法は、¹³C ま たは¹⁵Nの安定同位体で標識した D-分岐鎖アミノ 酸の最初の選択的な合成法であり、スケールア ップによる工業レベルでの合成が望まれる。

2) D-イソロイシンの酵素分析法の構築

これまでに、数種の D-アミノ酸の酵素分析法 が報告されている。例えば、超好熱菌由来の色 素依存性 D-プロリン脱水素酵素²³⁾や常温菌由来 の D-アミノ酸オキシダーゼ²⁴⁾を利用した電気化 学的分析法は、分析感度に優れ、短い分析時間 で複数のサンプルの分析が可能である。その一 方で、従来から臨床分析や食品分析では、 NAD(P)⁺依存性脱水素酵素を利用した糖や L-アミ ノ酸などの分光学的分析法が多用されている。 筆者らが創製した耐熱性 D-AADH の特筆すべき性 質の一つとして、イソロイシンに対する立体特 異性が挙げられる²⁰⁾。イソロイシンは、分子内 に二つの不斉炭素が存在するため、D-イソロイ シンの他に、L-イソロイシン、D-allo-イソロイ シン、L-a/10-イソロイシンの計4種類の異性体 が存在する。耐熱性 D-AADH は、4 種類のイソロ イシンのうち、D-イソロイシンの脱アミノ反応 を特異的に触媒する。これまで、このような特 異性を示す酵素は知られていなかったため、耐 熱性 D-AADH を利用した D-イソロイシンの分光学 的分析法の開発を進めた²⁵⁾。

本酵素分析法では、①耐熱性 D-AADH による NADPH 生成反応と、②電子キャリアー (フェナ ジンメトサルフェート; PMS)と酸化還元系発色

5

試薬(水溶性テトラゾリウム塩; WST-3)を介した ホルマザン色素 [2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-フェニル-2#テトラゾリウ ム; INT]の発色反応(A438 mm)の二段階反応系(図 3B)を用いることで、µM オーダーの微量分析を 可能にした。その結果、D-イソロイシンの簡便 で分光学的な微量分析 (1.0-50 μM)が可能にな った。また本酵素分析法では、D-イソロイシン 以外の3種類のイソロイシン異性体 (100 µM)が 試料中に共存しても、影響を受けることなく D-イソロイシンの分析が可能であった。同様に、 焼酎由来のアルコールや食酢由来の有機酸が試 料中に混在した場合も、それらが分析に与える 影響はほとんど認められなかった。このような 4 種の異性体の中で D-イソロイシンのみを選択 的に定量分析できる方法はこれまでに全く知ら れていないため、今後の新たな利用が期待され る。

4.耐熱性 NADP⁺依存性 D-アミノ酸 脱水素酵素の応用

筆者らは、U. thermosphaer icus 由来の meso-DAPDH に変異導入して、耐熱性 D-AADH を創製し、 安定同位体標識 D-分岐鎖アミノ酸の合成法と D-イソロイシンの微量分析法をそれぞれ確立させ た。meso-DAPDH と D-AADH の X 線結晶構造解析に よる構造情報の取得は、酵素の機能を新たにデ ザインをする上で非常に有用な情報を与える。 そこで筆者らは、meso-DAPDH の X 線結晶構造解 析を進めた。

1) meso-DAPDH の立体構造の特徴と耐熱機構

筆者らは X 線結晶構造解析により、U. thermosphaer icus 由来の meso-DAPDHのアポ型と NADP⁺/ルトリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-ア ミノエタンスルホン酸 (TES)結合型の 2 種類に ついて、それぞれ 2.4Å および 2.07Å の分解能で 構造決定した²⁶⁾。両構造ともに結晶中で二量体 構造をとっており、ゲル濾過クロマトグラフィ 一から求めた分子質量とサブユニットの分子質 量の比から決定した酵素の会合状態と一致した (図 4A)。その単量体構造に着目すると、本酵素 は、ジヌクレオチド結合ドメイン、二量体形成 ドメイン、C 末端ドメインの三つのドメインか ら形成されていた (図 4B)。また本酵素の主鎖 のフォールディングは、これまでに構造が報告 されていた C. glutamicum 由来の meso-DAPDH²⁷⁾ と、近年新たに構造が報告された好熱菌 Symbiobacterium thermophilum 由来の meso-DAPDH²⁸⁾の両者と類似していた。一方で、本酵素 のサブユニット構造は、同じく二量体構造を持 つ C. glutamicum の酵素とは類似していたが、 六量体構造 (上記酵素に似た二量体構造が三つ 重なっている)を持つ S. thermophilumの酵素と は大きく異なっていた。

好熱菌由来の酵素やタンパク質は、疎水性 相互作用の強化^{29,30)}、イオンペアの増加とイオ ンペアネットワークの形成³¹⁻³³⁾、タンパク質表 面における荷電性アミノ酸残基の増加とそれに 伴う極性または疎水性の表在アミノ酸残基の減 少³⁴⁾等のさまざまな要因により耐熱機構を獲得 していることが知られている。そこで筆者らは、 *U. thermosphaer i cus* 由来の*meso*-DAPDHの耐熱 機構を詳細に解析するため、*C. glutami cum と S. thermophi l um* 由来の*meso*-DAPDHの構造情報を用 いて、種々の要因を比較解析した(表 2)。

まずイオンペア数に着目すると、単量体内 部のイオンペア数は、U. thermosphaericus の meso-DAPDH の方が C. glutamicumの meso-DAPDH よりも少なく、またイオンペアネットワークは 見当たらなかった。その一方で、サブユニット 界面のイオンペア数は、前者が8ペアで、2ペ アの後者を大きく上回っていた。また疎水性相 互作用の数に着目すると、両酵素の間で顕著な 違いが認められた。*U. thermosphaericus* 由来 の酵素中には、より多くの疎水性相互作用を担 うアミノ酸残基数が確認される。特にサブユニ ット界面では、C. glutamicum 由来の酵素に比 べて3倍以上の疎水性相互作用に関連するアミ ノ酸残基が確認された。これと関連して、両酵 素の単量体および二量体の総溶媒露出面積には 大差がないのに対して、前者のサブユニット界 面の溶媒露出面積 (3200Å²)は、後者のそれ (2700Å²)より有意に大きいことが明らかとなっ た。しかしながら、タンパク質表面における荷



図4 meso-DAPDH の立体構造

- (A) meso-DAPDH の会合状態。サブユニットAとBを緑色と水色でそれぞれ示した。
- (B) meso-DAPDHのモノマー構造。

電性アミノ酸残基の占める割合や主鎖の可動性 を促すグリシン残基、主鎖の剛性を強めるプロ リン残基の総数においては、両酵素の間に大き な違いは見られなかった。これらの結果から、 *U. thermosphaer i cus* 由来の *meso*-DAPDH は、サ ブユニット界面でのイオンペア形成とともに、 単量体内とサブユニット界面における疎水性相 互作用の増大により耐熱機構を獲得しているこ とが示唆された。上述のように、*S. thermophi lum* 由来の酵素は六量体構造を持つた め、サブユニット界面の総イオンペア数(46)や 疎水性相互作用に関係するアミノ酸残基の総数 (467)は相対的に大きな数となった。また、サ ブユニット界面の総溶媒露出面積も 12,900Å² と なり、*U. thermosphaer i cus* 由来の酵素に比べ て、かなり大きかった。好熱菌由来の酵素には、 常温菌由来の酵素の会合状態とは異なり、多量 体化することで耐熱機構を獲得している例が報 告されている^{35,36)}。これらの結果から、*S. thermophi lum*由来の*meso*-DAPDHは、六量体構造 により高い耐熱性を獲得していると考えられた。 *U. thermosphaer icus と S. thermophi lum*由来の *meso*-DAPDH では、同種の酵素であっても起源が 異なるため、耐熱化の分子戦略が大きく異なる ことが明らかとなった。

2) meso-DAPDH の補酵素認識機構

上述のとおり、これまでに数種の細菌から meso-DAPDH が発見され、酵素化学的性質の解明 が成されてきた。また一部の例外を除き、既報

46.14.46	衣 Z IIIESU-DAFDIT U	情追り付取り比較	
微生物	U. thermosphaericus	C. glutamicum	S. thermophilum
(PDB エントリー)	(3wyc)	(1dap)	(3wbb)
相同性 (%)	-	46	33
R.m.s.d. (\AA^2)	-	1.8	1.4
サブユニット構造	二量体	二量体	六量体
溶媒露出面積 (Ų)			
多量体	26800	25700	66900
単量体	16700	15600	15400
サブユニット界面(Ų)			
	3200	2700	2700 (二量体)
			12900 (六量体)
イオンペアの数			
単量体	34 (サブユニット A)	50 (サブユニット A)	42 (サブユニット A, D)
	32 (サブユニット B)	53 (サブユニット B)	39 (サブユニット B, E)
			42 (サブユニット D, F)
多量体	66	103	246
サブユニット界面	8	2	13 (サブユニット A, C)
			8 (サブユニット B, E)
			13 (サブユニット D, F)
			46 (六量体)
疎水性相互作用の数			
単量体	446 (サブユニット A)	357 (サブユニット A)	358 (サブユニット A, D)
	447 (サブユニット B)	361 (サブユニット B)	368 (サブユニット B, E)
			360 (サブユニット D, F)
多量体	893	718	2172
サブユニット界面	159	49	112 (サブユニット A, C)
			116 (サブユニット B, E)
			112 (サブユニット D, F)
			467 (六量体)
表面アミノ酸残基の構成			
電荷性 (%)	48	45	47
極性 (%)	30	26	19
疎水性(%)	22	29	34
アミノ酸残基の数			
全体	326	320	229
プロリン	16	14	17
グリシン	27	25	26

素2 maso-DAPDHの構造的特徴の比較

の meso-DAPDH は全て、NADP⁺のみを補酵素とし 様に、U. thermosphaericus 由来の meso-DAPDH て利用し、NAD⁺に対する反応性は持たない。同の補酵素の利用も NADP⁺に特異的であった¹⁸⁾。



図 5 meso-DAPDH の補酵素認識部位

NADP⁺を紫色、水分子を赤色でそれぞれ示した。

NADP⁺/TES/meso-DAPDH 複合体の補酵素結合 部位に着目すると、NADP⁺の認識には 14 個のア ミノ酸残基が関与していた (図 5)²⁰⁾。特に、 NAD⁺には存在せず、NADP⁺にのみ存在するアデニ ンリボースの 2' 位のリン酸基は、Thr35 の側鎖、 Arg36の主鎖および側鎖、Arg37の側鎖と計8本 の水素結合を形成していた。その一方で、NADP⁺ のアデニン部分は溶媒中に露出しており、酵素 との間に直接の水素結合は認められなかった。 これらの結果から、U. thermosphaericus 由来 の meso-DAPDH の補酵素認識には、Thr35、Arg36、 Arg37の3つのアミノ酸残基が非常に重要な役割 を持ち、リン酸基を強固に保持することで本酵 素の高いNADP⁺特異性に寄与していることが推察 された。また、リン酸基を持たない NAD⁺は、ア デニンリボース部位が酵素内で正常に固定され ないため、反応性を示さないと考えられた。

3) meso-DAPDH への変異導入による基質特異 性の変換機構

筆者らが創製した耐熱性 D-AADH は、親酵素 の基質である meso-ジアミノピメリン酸には全 く活性を示さないが、D-シクロヘキシルアラニ ン、D-イソロイシン、D-2-アミノオクタン酸な どの数種の D-アミノ酸に対して活性を示した²⁰⁾。 そこで、変異導入による基質特異性の大幅な変 換の要因を明らかにするため、U. thermosphaer icus 由来の NADP⁺/TES/meso-DAPDH 複合体²⁶⁾の構造を解明し、既知の C. glutamicum 由来の meso-ジアミノピメリン酸 /meso-DAPDH 複合体³⁷⁾の構造との基質認識部位 を比較解析した(図 6)。

C. glutamicum 由来の meso-DAPDH では、 Gln150 と Gly151 の主鎖の N 原子および Asn270 の側鎖が meso-ジアミノピメリン酸の D-アミノ 酸センター (α-炭素)のカルボキシル基と 4 本 の水素結合を形成し、Asp90 の側鎖が D-アミノ 酸センターのアミノ基と 1 本の水素結合を形成 している。その一方で、Thr169、Arg195、 His244 の側鎖は、基質の L-アミノ酸センター (ε-炭素)のカルボキシル基と4本の水素結合を 形成するが、D-アミノ酸センターのアミノ基の



図6 meso-DAPDH の基質認識部位の構造比較

C. glutamicum 由来の *meso*-DAPDH のアミノ酸 残基を黄色と赤文字で、*U. thermosphaericus* 由 来の *meso*-DAPDH のアミノ酸残基を水色と黒文字 でそれぞれ示した。

間では水素結合の形成が確認されない。これら 6 種類の各アミノ酸残基は、 U. *thermosphaericus* 由来の *meso*-DAPDH では、 Gln154、Gly155、Asn276、Asp94、Thr173、 Arg199、His249 として完全に保存されている。 変異導入による meso-DAPDH からの D-AADH への 変換では、基質の D-アミノ酸センターと相互作 用するアミノ酸残基の中で唯一、Gln154 が Leu154 に置換されている。しかしながら、この 相互作用では、Gln154 の主鎖が基質と相互作用 するため、Gln154Leu の変異を施しても D-アミ ノ酸センター近傍への相互作用は維持される。 一方、meso-ジアミノピメリン酸のL-アミノ酸セ ンターと相互作用するアミノ酸残基では、 Thr173 と Arg199 が、Ile173 と Met199 にそれぞ れ置換されている。これらの変異導入により、 D-AADH と L-アミノ酸センターとの間に形成され る水素結合の多くが失われるため、D-AADHの meso-ジアミノピメリン酸に対する反応性が失 われたと推察された。また、Thr173Ile と Arg199Metの両変異は、L-アミノ酸センター近傍 の疎水性を高め、それに起因して、D-AADH の D-シクロヘキシルアラニン、D-イソロイシン、D-2-アミノオクタン酸など数種の疎水性 D-アミノ 酸に対する活性が向上したと考えられた。U. thermosphaericus 由来の meso-DAPDH では、 meso-ジアミノピメリン酸のD-アミノ酸センター の近傍に位置するヘリックス α8 の N 末端に存 在する Gln154 の側鎖と同じヘリックス中に存在 する Asp158 の側鎖が水素結合を形成する。D-AADH の創製では、Gln154Leu と Asp158Gly の 2 つの変異を導入したため Gln154 と Asp158 の間 で形成されていた水素結合が解消され、そのへ リックスの N 末端アミノ酸残基に相当する Leu154 や Gly155 の 可動性が 高まった ことが 示唆 された。さらに、U. thermosphaericus 由来のD-AADH に含まれる Leu154 および Gly155 は、C. glutamicum由来 meso-DAPDH における対応残基で ある Gln150 と Gly151 と同様、それら残基の主 鎖が meso-ジアミノピメリン酸の D-アミノ酸セ ンターと相互作用することが推測された。即ち、 これら変異導入によりこの部分の可動性が高ま

り、より広範囲な基質の認識が可能になったと 考えられた。実際に、*C.glutamicum*由来の D-AADH では、*U. thermosphaericus* の Asp158Gly に相当する変異である Asp154Gly を導入すると、 種々の D-アミノ酸を合成する活性が高められる ことが報告されている¹¹⁾。

5. おわりに

近年、D-アミノ酸が、ヒトを含めた高等生物 内で重要な生理機能を持つことが明らかになっ ている。その一方で、D-アミノ酸に関連した応 用研究はまだ始まったばかりである。今後の更 なる微量分析法の開発と相まって、D-アミノ酸 の新たな生理機能の解明があることを考慮する と、医薬品や生活用品などに新たな機能をもた らす機能性物質として D-アミノ酸の需要は益々 大きくなると予想される。それらの背景を踏ま えて、筆者らは、タンパク質工学的手法により、 安定性に優れる D-AADH を創製した。また D-AADH を利用して、□-分岐鎖アミノ酸およびその安定 同位体標識体の合成法と、D-イソロイシンの微 量分析法を開発した。さらに、meso-DAPDH の X 線結晶構造解析に成功し、酵素の耐熱化機構や 補酵素・基質認識機構を解明した。これらの知 見は、D-AADH の触媒活性を改良するなど、酵素 機能を新たにデザインする上で極めて有用であ ることが考えられる。

謝辞

筆者らの研究成果の大部分は、主に九州大学大 学院生物資源環境科学府、香川大学農学部など において、多くの方々の協力の下に行われもの です。終始ご指導いただいた大島敏久教授、櫻 庭春彦教授に感謝いたします。また、本研究の 成果は、主に日本学術振興会の科学研究費補助 金 [課題番号 13J04653 (秋田紘長)、22248010 (大島敏久)]や生研機構の委託研究により得ら れたものです。

参考文献

1. Radkov AD, Moe LA. 2014. Bacterial synthesis of D-amino acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*

98:5363-5374

- 西川 徹. 2008. 脳の内在性 D-セリンの代謝・ 機能と精神神経疾患における意義. 生化学 80:267-276
- 3. 本間 浩. 2008.哺乳類体内の遊離型 D-アスパ ラギン酸の振舞いと機能. 生化学 80:277-286
- Kawagishi H, Hamajima K, Takanami R, Nakamura T, Sato Y, Akiyama Y, Sano M, Tanaka O. 2004. Growth promotion of mycelia of the Matsutake mushroom *Tricholoma matsutake* by D-isoleucine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68:2405–2407
- Xu D, Jia R, Li Y, Gu T. 2017. Advances in the treatment of problematic industrial biofilms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33:97
- Global Industry Analysts. 2014. D-Amino acids-A global strategic business report. ed. Global Industry Analysts
- 佐藤 治代. 1999. 微生物を利用した D-アラニン, D-酒石酸の工業的製造法. *有機合成化学協会誌* 57: 323-333
- Schmid A, Hollmann F, Park JB, Bühler B. 2002. The use of enzymes in the chemical industry in Europe. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13:359–366
- Gao X, Ma Q, Zhu H. 2015. Distribution, industrial applications, and enzymatic synthesis of D-amino acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99:3341–3349
- 10. 秀崎友則,安楽城正,進藤敦徳,田脇新一郎.
 2011. 非天然アミノ酸 D-セリンの直接製造法. 酵素工学ニュース 66:12-14
- Vedha-Peters K, Gunawardana M, Rozzell JD, Novick SJ. 2006. Creation of a broad-range and highly stereoselective D-amino acid dehydrogenase for the one-step synthesis of D-amino acids. *J. Am. Chem. Soc.* 128:10923–10929
- Ohshima T, Soda K. 1990. Biochemistry and biotechnology of amino acid dehydrogenases. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 42:187–209
- 13. 赤沼 哲史,山岸 明彦. 2009. 好熱菌のタンパ ク質はなぜ熱に強いか. 生化学81:1064-

1071

- Born TL, Blanchard JS. 1999. Structure/function studies on enzymes in the diaminopimelate pathway of bacterial cell wall biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3:607–613
- Misono H, Soda K. 1980. Properties of *meso-α*, εdiaminopimelate D-dehydrogenase from *Bacillus sphaericus*. J. Biol. Chem. 255:10599–10605
- Misono H, Ogasawara M, Nagasaki S. 1986. Characterization of *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum* and its distribution in bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 50:2729–2734
- Misono H, Togawa H, Yamamoto T, Soda K. 1979. *meso-α*, ε-Diaminopimelate D-dehydrogenase: distribution and the reaction product. *J. Bacteriol*. 137:22–27
- Akita H, Fujino Y, Doi K, Ohshima T. 2011. Highly stable *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from an *Ureibacillus thermosphaericus* strain A1 isolated from a Japanese compost: purification, characterization and sequencing. AMB Express 1:43
- 秋田 紘長, 櫻庭 春彦, 大島 敏久. 2016. 耐 熱性人工 NADP⁺依存性 D-アミノ酸脱水素 酵素:創製と応用. ビタミン 90: 544-554
- Akita H, Doi K, Kawarabayasi Y, Ohshima T. 2012. Creation of a thermostable NADP⁺dependent D-amino acid dehydrogenase from Ureibacillus thermosphaericus strain A1 mesodiaminopimelate dehydrogenase by site-directed mutagenesis. Biotechnol. Lett. 34:1693–1699; erratum to this report can be found in Biotechnol. Lett. 34:1701–1702
- Ohshima T., Ito Y, Sakuraba H, Goda S, Kawarabayasi Y. 2003. The Sulfolobus tokodaii gene ST1704 codes highly thermostable glucose dehydrogenase. J. Mol. Catal. B Enzym. 23:281– 289
- Akita H, Suzuki H, Doi K, Ohshima T. 2014.
 Efficient synthesis of D-branched chain amino acids and their labeled compounds with stable

isotopes using D-amino acid dehydrogenase. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98:1135–1143

- Tani Y, Itoyama Y, Nishi K, Wada C, Shoda Y, Satomura T, Sakuraba H, Ohshima T, Hayashi Y, Yabutani T, Motonaka J. 2009. An amperometric D-amino acid biosensor prepared with a thermostable D-proline dehydrogenase and a carbon nanotube-ionic liquid gel. *Anal. Sci.* 25:919–923
- Johansson E, Marko-Varga G, Gorton L. 1993. Study of a reagent- and mediator-less biosensor for D-amino acids based on co-immobilized Damino acid oxidase and peroxidase in carbon paste electrodes. J. Bomater. Appl. 8:146–173
- Akita H, Imaizumi Y, Suzuki H, Doi K, Ohshima T. 2014. Spectrophotometric assay of Disoleucine using an artificially created D-amino acid dehydrogenase. *Biotechnol. Lett.* 36:2245– 2248
- Akita H, Seto T, Ohshima T, Sakuraba H. 2015. Structural insight into the thermostable NADP⁺dependent *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from *Ureibacillus thermosphaericus*. Acta Cryst. D 71:1136–1146
- Scapin G, Reddy SG, Blanchard JS. 1996. Threedimensional structure of *meso*-diaminopimelic acid dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*. *Biochemistry* 35:13540–13551
- Liu W, Li Z, Huang CH, Guo RT, Zhao L, Zhang D, Chen X, Wu Q, Zhu D. 2014. Structural and mutational studies on the unusual substrate specificity of *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from *Symbiobacterium thermophilum. Chembiochem.* 15:217–222
- Bhuiya MW, Sakuraba H, Ohshima T, Imagawa T, Katunuma N, Tsuge H. 2005. The first crystal structure of hyperthermostable NAD-dependent glutamate dehydrogenase from *Pyrobaculum islandicum*. J. Mol. Biol. 345:325–337
- Vieille C, Zeikus GJ. 2001. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol.*

Biol. Rev. 65:1–43

- Hennig M, Darimont B, Sterner R, Kirschner K, Jansonius JN. 1995. 2.0 Å structure of indole-3glycerol phosphate synthase from the hyperthermophile *Sulfolobus solfataricus*: possible determinants of protein stability. *Structure* 3:1295–1306
- 32. Yip KS, Stillman TJ, Britton KL, Artymiuk PJ, Baker PJ, Sedelnikova SE, Engel PC, Pasquo A, Chiaraluce R, Consalvi V et al. 1995. The structure of *Pyrococcus furiosus* glutamate dehydrogenase reveals a key role for ion-pair networks in maintaining enzyme stability at extreme temperatures. *Structure* 3:1147–1158
- Karshikoff A, Ladenstein R. 2001. Ion pairs and the thermotolerance of proteins from hyperthermophiles: a "traffic rule" for hot roads. *Trends Biochem. Sci.* 26:550–556
- Fukuchi S, Nishikawa K. 2001. Protein surface amino acid compositions distinctively differ between thermophilic and mesophilic bacteria. J. Mol. Biol. 309:835–843
- Maeda N, Kanai T, Atomi H., Imanaka T. 2002. The unique pentagonal structure of an archaeal Rubisco is essential for its high thermostability. *J. Biol. Chem.* 277:31656–31662
- 36. Sakuraba H, Tsuge H, Shimoya I, Kawakami R, Goda S, Kawarabayasi Y, Katunuma N, Ago H, Miyano M, Ohshima T. 2003. The first crystal structure of archaeal aldolase. Unique tetrameric structure of 2-deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase from the hyperthermophilic archaea *Aeropyrum pernix*. J. Biol. Chem. 278:10799– 10806
- Scapin G, Cirilli M, Reddy SG, Gao Y, Vederas JC, Blanchard JS. 1998. Substrate and inhibitor binding sites in *Corynebacterium glutamicum* diaminopimelate dehydrogenase. *Biochemistry* 37:3278–3285



秋田 紘長(あきた ひろなが)

略歴

- 2004-2008 千葉工業大学工学部生命環境科学科
- 2009 千葉工業大学工学部生命環境科学科 研究生
- 2009-2011 九州大学大学院生物資源環境科学府 遺伝子資源工学
- 2011-2014 九州大学大学院生物資源環境科学府 生命機能科学 博士(農学)
- 2013 日本学術振興会 特別研究員(DC2)
- 2014-現在 国立研究開発法人産業技術総合研究 所研究員