

Studies on creation and application of a thermostable NADP⁺ - dependent D - amino acid dehydrogenase

秋田, 紘長

<https://hdl.handle.net/2324/1441308>

出版情報：九州大学, 2013, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）



氏 名 : 秋田 紘長

論文題目 : Studies on creation and application of a thermostable NADP⁺-dependent D-amino acid dehydrogenase
(耐熱性 D-アミノ酸脱水素酵素の創製と応用に関する研究)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

従来生物に含まれるアミノ酸は L-アミノ酸のみであると考えられ、光学異性体の D-アミノ酸はあまり重要な生理機能を持たないと考えられてきた。しかし、近年の分析技術の飛躍的発展を受けて生体における D-アミノ酸の解析が進み、重要な生理的機能が明らかになってきた。それに伴い、抗生剤等の有用物質に D-アミノ酸が使用され始めている。今後は更なる生理機能の解明により、D-アミノ酸の医薬品や機能性食品などへの新規利用の拡大が予想される。D-アミノ酸の主な生産法は、化学合成法と酵素合成法に大別される。後者は、合成に必要なエネルギーと副生成物の発生が少なく、環境負荷の低い合成法として注目されている。現在までに数種の酵素合成法が工業化されているものの、これら既存の方法では D-アミノ酸前駆体の合成が不可欠とされ、酵素の安定性が低いため生産効率が悪い。2006 年には、タンパク質工学的に *meso*-ジアミノピメリン酸脱水素酵素 (DAPDH) から創製された NADP⁺依存性 D-アミノ酸脱水素酵素 (DAADH) を用いた、2-オキソ酸のアミノ化による D-アミノ酸の合成法が報告された。この合成法は一段階で D-アミノ酸を合成できる優れた方法であるが、酵素の安定性が低いため、工業化に至っていない。そこで本学位論文研究では、安定性に優れた DAADH をタンパク質工学的に創製し、それを利用した D-アミノ酸と安定同位体標識 D-アミノ酸の高効率な合成法の開発を目的とした。

好熱菌を対象に素材となる耐熱性 DAPDH をデータベース上で検索したが、見出せなかったため、微生物保存機関から入手した好熱菌、及び火山の熱水噴出物、温泉泥、堆肥などから単離した好熱菌を対象に酵素活性からの探索を行った。その結果、堆肥から単離した好熱菌 1 株に DAPDH 活性を見出し、16S rRNA 遺伝子の解析により *Ureibacillus thermophaericus* と同定、培養菌体から DAPDH の精製に成功した。精製酵素は、60°C (30 分間処理) 及び広範囲の pH 領域 (pH 4.5-11.5 で 50°C、30 分間処理) において変性失活しなかった。DAPDH 遺伝子の塩基配列を解読後、既報の DAADH 作製情報をもとに、Gln154Leu、Asp158Gly、Thr173Ile、Arg199Met、His249Asn の変異を導入して DAADH の創製を行った。変異酵素は、親酵素の DPADH 活性を示さず、新たに NADP⁺依存的 DAADH 活性を示した。さらに、親酵素では確認されない NADPH 依存的アミノ化反応による 2-オキソ酸からの D-アミノ酸の合成反応を触媒した。変異酵素は親酵素同様に高い安定性を有していた。これらの結果から耐熱性 NADP⁺依存性 DAADH の創製に成功した。

次に、耐熱性 DAADH の応用として、D-分岐鎖アミノ酸及び安定同位体標識 D-分岐鎖アミノ酸の酵素合成法と D-イソロイシン (D-Ile) の酵素定量法の開発を行った。酵素合成法では、DAADH による D-アミノ酸の合成反応、及びグルコース脱水素酵素による NADPH の再生反応、この二酵素反応から成る生産システムを構築した。システムの最適化後、高効率な D-分岐鎖アミノ酸の合成、とりわけ、¹³C と ¹⁵N で二重標識された D-ロイシンを含む 4 種の安定同位体標識 D-分岐鎖アミノ酸の高収率 (99%以上) な新規酵素合成法を確立した。酵素定量法では、DAADH による NADPH 生成反応と、水溶性テトラゾリウム塩による発色反応 (A_{438 nm}) の共役系からなる分光学的分析システムを構築した。生成反応と発色反応を段階的に行うことで、D-Ile を特異的に分析可能な酵素定量法

(0.5-15 μ M)を開発した。

最後に DAADH の基質認識機構を解明するため、DAPDH、NADP⁺/DAPDH 複合体及び NADP⁺/DAADH 複合体の X 線結晶構造解析を行い、各々の構造解析に成功した。既知の *meso*-ジアミノピメリン酸 (*meso*-DAP)/DAPDH と NADP⁺/DAADH の基質認識部位の構造比較により、DAADH が DAPDH 活性を消失した理由は、*meso*-DAP の L-型の立体配置を示すアミノ酸への相互作用の低下に起因することを見出だした。また *U. thermosphaericus* 由来の DAPDH が分子内の疎水性相互作用の増大により耐熱化されていることを明らかにした。

以上より、本研究の総括を行うと、まず好熱菌由来の耐熱性 DAPDH を発見し、変異導入して耐熱性 DAADH の創製に成功した。続いて耐熱性 DAADH を利用した D-分岐鎖アミノ酸及びその安定同位体標識体の合成法と D-Ile の微量定量法の確立を成し遂げた。これらの成果は、産業応用への布石となり、酵素工学において新局面を開拓するものと期待される。