U

生命工学科
Department of Biomedical Engineering

食品微生物学研究室　　大島　敏久　カテゴリー

ライフサイエンス

人工耐熱性D-アミノ酸脱水素酵素の創製とそのバイオテクノロジーへの応用

INTRODUCTION

No.1

生体におけるD-アミノ酸

L-アミノ酸　D-アミノ酸　左手　右手

食品中のD-アミノ酸と食品機能の改善
多くのD-アミノ酸はL-アミノ酸よりもおいしい。例　D-Ala: 砂糖の3倍、D-Phe:5倍、D-Trp:35倍甘い；エビ、カニ肉の甘さはD-Ala

様々な食品にD-アミノ酸は含まれる

D-アミノ酸は生物学的に重要な機能を持つ
1. 記憶や学習などの脳機能に関連(D-Ser)
2. 精巣内の内分泌活動の調整(D-Asp)
3. 菌類の成長促進作用(D-Ile)
4. バイオフィルムの分解促進作用(D-Leu)
5. タコ、二枚貝類の浸透圧調節機能(D-Ala)
6. 食品の呈味性：カニや甘海老の甘み(D-Ala)
7. 白内障やアルツハイマー病の原因(結合態D-Asp)
8. 皮膚の老化(結合態D-Asp)：老化との関係
9. 乳酸菌がD-アミノ酸を高濃度生産

・ペプチド医薬品、抗生剤、農薬などの合成中間体の生産
・食品の呈味性の改善、機能性強化、劣化の防止
・調味料やサプリメントとしての利用
・化粧品や日用品などへの利用

乳酸菌が多くのD-アミノ酸を生産することを発見：
・幸田口拓太、大森勇門、大島 敏久 (2015) 乳酸菌とD-アミノ酸生産、化学と生物, 53 (1), 18-25.（別刷が机上にあり）

D-アミノ酸強化食品
・補酵素研究会D-アラニン添加による日本語の旨味性必得
・生フルーツ酵母「ピュアミセット」(関西大学)
・熱塩のススメのやっぱるんゼリー（興生堂）
・こく味調味料(寒させた食品に感じるまろやかさ)
* T. Oikawa(2013) Amino acids 44, 489

D-アミノ酸の酵素生産法

D-アミノ酸の機能解明の進展に伴い応用開発が進展：市場拡大

増大するグローバルマーケット

新規生産法の開発が必要

D-アミノ酸の主な酵素生産法
(発酵法の適応が困難)

酵素生産法

我々開発法

・D-AMINO ACID $ Global Strategic Business Report, MCP-7644, Global Industry Analysts (2014)

耐熱性meso-ジアミノピメリン酸脱水素酵素(meso-DAPDH)の発見

No. 3

meso-Diaminopimelate　L-2-Amino-6-oxopimelate　meso-DAPDH　NADP+H　NADP

L-Tetrahydrodipicolinate

耐熱性 meso-DAPDHのスクリーニング
1) meso-DAPDH: 研究開始時Novibacillus2010年ごろでは常温菌Bacillus や Corynebacterium 属菌でのみ存在
2) 我々は堆肥からの好熱菌1株(60℃生育)に酵素を発見
3) 好熱・好気性菌を16S rRNA の配列相同性分析から同定 (Deposit strain No. NBRC108682)
4) DAPDHを均一に精製：高い耐熱性(30分処理で60℃まで安定)、広範囲のpHで安定
5) サブユニット構造：ホモ2量体(分子量 40 kDa×2)
6) 基質：meso-diaminopimelate, 補酵素：NADPに特異的
7) 遺伝子の大腸菌でのクローニングと塩基配列、アミノ酸配列の決定(326-アミノ酸残基)

アミノ酸配列の相同性: 46 %

変異導入アミノ酸 5残基
Gln154
Asp158
Thr173
Arg199
His249

U. thermosphaericus (好熱菌上列, 全長: 326残基)とC. glutamicum (常温菌、下列, 全長: 320残基)。基質認識に関与する両酵素で保存されている5つのアミノ酸残基(変異導入アミノ酸残基)。

meso-ジアミノピメリン酸脱水素酵素の基質のL-アミノ酸認識に関与するアミノ酸残基の変異

(- - - -): イオン結合または水素結合

5アミノ酸に変異導入

基質のmeso-DPA
L-アミノ酸センター
D-アミノ酸センター
Thr173Ile
His249Asn
Arg199Met
Asp158Gly
Gln154Leu

L-アミノ酸認識部位の破壊

D-アミノ酸脱水素酵素(D-AADH)の創製(反応式)

D-アミノ酸　2-オキソ酸

大腸菌組換え体細胞からの変異 D-AADHの精製

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)
細胞抽出液	331	36.3	0.110	100
熱処理 (50℃, 30 min)	255	33.8	0.133	93.1
Ni-キレートカラム	138	29.2	0.211	80.4

U : 1 μmol/min NADPH production　　Wet weight : 3.17 g／L-medium

SDS-PAGE(純度検定)

変異D-アミノ酸脱水素酵素の活性

酵素の耐熱性

○ 精製された変異酵素はD-Ile脱水素酵素 活性を示すが meso-DAPDH活性は示さない。耐熱性を示す：人工酵素の創製の成功

人工D-アミノ酸脱水素酵素(D-AADH)の基質特異性

6

酸化的脱アミノ反応

基質(濃度10 mM)	相対活性 (%)
meso-Diaminopimelate	0
D-Cyclohexylalanine	100 (0.33 μmol/min/mg)
D-Isoleucine	63 ± 1.7
D-2-Aminooctanoate	59 ± 0.1
D-Lysine	57 ± 1.1
D-Cyclopentylalanine	56 ± 0.6
D-2-Aminoheptanoate	47 ± 2.0
D-Norleucine	25 ± 0.3
D-Leucine	24 ± 0.2
D-Norvaline	9 ± 0.7
D-Ornithine	9 ± 0.1

補酵素(1.25 mM)

	相対活性 (%)
NADP	100
NAD	0

還元的アミノ化反応

基質 (生成物)	相対活性 (%)
2-Oxooctanoate: (D-2-Aminooctanoate)	100 (4.1 μmol/min/mg)
2-Oxoheptanoate: (D-2-Aminoheptanoate)	167 ± 0.6
3-Methyl-2-oxobutyrate: (D-Valine)	121 ± 2.0
3-Methyl-2-oxovalerate: (D-Isoleucine)	118 ± 0.7
2-Oxobutyrate: (D-2-Aminobutyrate)	106 ± 0.8

主な基質のミハリス定数(Km)

基質	K_m (mM)
NADP+	0.271
D-Isoleucine	20.5
NADPH	0.0376
2-Oxo-3-methylvalerate	15.6
NH_4Cl	101

・人工D-アミノ酸脱水素酵素は、親酵素の基質であるmeso-Diaminopimelateには反応を示さず、新たにD-Cyclohexylalanine やD-Isoleucineなどに反応を示す。
・人工D-アミノ酸脱水素酵素は、親酵素は反応性を示さない2-オキソ酸に高い反応性を示す。

人工D-AADHを素子とするD-アミノ酸合成システム

NADPH regeneration system using D-AADH and S. tokodaii glucose dehydrogenase

・ D-分岐鎖アミノ酸と同位体標識アナログの合成

Mutant DAADH　NADPH + H+　NADP+　2-Oxo acid　D-BCAA　D-Glucono-1,5-lactone　D-Glucose

S. tokodaii Glucose DH

	2-Oxo acid	D-BCAA
R = -$CH_2CH(CH_3)_2$	2-Oxo-4-methylveleric acid	D-Leucine
R = -$CH(CH_3)CH_2$	2-Oxo-3-methylveleric acid	D-Isoleucine
R = -$CH(CH_3)_2$	2-Oxo-3-methylbutyric acid	D-Valine

Thermostable glucose dehydrogenase: T. Ohshima et al. 2003 , J. Mol. Catal. Enzym.23, 281-289

D-BCAAs生産のタイムコース

Conversion rate (%)　Reaction time [min]　D-Leu　D-Val　D-Ile　Yield: ~100%　Yield: ~50%

D-Ileのみ生産　D-allo-Ile: 生産無

2-Oxo-3-methylvalerate (3S, 3R mixture)　D-Isoleucine (2R, 3R)

安定同位体標識D-BCAAsの生産: 最初の安定同位体標識D-アミノ酸合成に成功
D-[^{15}N]Leucine、D-[^{15}N]Isoleucine、D-[^{15}N]Valine、D-[1-^{13}C]Leucine、D-[1-^{13}C, ^{15}N]Leucine
Akita, Suzuki, Doi, Ohshima, Appl. Microbiol. Biotechnol. 98,1135-43.

7

安定同位体標識D-分岐鎖アミノ酸生産 (D-AADH/GDH system)

Product	Substrate	m/z [M+H]+	Chemical shift (ppm)	Optical purity (%)[a]	Yield (%)
D-[^{15}N]Leucine	2-Oxo-4-methyiveleic acid, [^{15}N]NH_4Cl	133.1	47.32	>99%	99 ± 0
D-[^{15}N]Isoleucine	2-Oxo-3-methyiveleic acid, [^{15}N]NH_4Cl	133.1	39.90	>99%	49 ± 1
D-[^{15}N]Valine	2-Oxo-3-methylbutyric acid, [^{15}N]NH_4Cl	119.08	43.09	>99%	99 ± 1
D-[1-^{13}C]Leucine	[1-^{13}C]2-Oxo-4-methyiveleic acid, NH_4Cl	133.1	176.03	>99%	99 ± 1
D-[1-^{13}C, ^{15}N]Leucine	[1-^{13}C]2-Oxo-4-methyiveleic acid, [^{15}N]NH_4Cl	134.1	176.03 (^{13}C) 47.32 (^{15}N)	>99%	99 ± 1

[1-^{13}C]2-Oxo-4-methyiveleate　+ NADPH　+ [$^{15}NH_4Cl$]　DAADH　D-[1-^{13}C, ^{15}N]Leucine　S. tokodaii GDHによる再生　+ NADP

世界で最初の安定同位体標識D-アミノ酸の生産に成功：医療、食品分野や代謝工学などへの応用

D-アミノ酸脱水素酵素(His-Tag付)の結晶構造解析からの活性の改良

C末端領域の構造比較

Symbiobacterium thermophilum 由来のDAPDH[9]
1) Liu et al. ChemBioChem, 15,017-022,2014

U. thermosphaericus由来 C末にHis-Tag付きのDAPDH
比活性: 0.30 μmol/(min・mg)

タグなし: C末端Val320がHis92Arg120, 128と水素結合やイオン結合による変定 Arg128がある

C末端領域　Asp120　Val320　His92　構造比較　Arg132　Asp124　Thr327　Leu326　Arg328　His96　(His)$_6$

タグ付き酵素: C-末アミノ酸残基(Leu-Thr-Arg-(His)$_6$)の相互作用の欠失が構造のひずみをうみ、活性の低下をもたらしている？

His-Tagなしの D-AADHの機能解析と、結晶構造解析

9

人工D-アミノ酸脱水素酵素の機能改良

(タグなし、His-タグ付き, タグなしAsp94Ala)の基質特異性

基質 (10mM)	タグなし 相対活性	His-タグ付き 相対活性	Asp94Ala(タグなし) 相対活性
D-Lys	100*	2.8	12
D-Arg	6.7	0.068	0.76
D-Norleucine	3.9	0.99	39
D-Met	2.0	0.17	24
D-Leu	1.8	0.98	45
D-Val	1.1	0.13	1.7
D-Ile	1.0	1.8	16
D-Phe	0.92	0.098	49
D-Trp	0.34	-	2.3
D-His	0.16	-	1.3

*活性：タグなし酵素の基質をD-リシンとしたときの反応速度10.8 μmol/min/ mg を100%とした相対値
・タグなし酵素はタグ付き酵素の約35倍D-Lys活性が増大(酵素活性の大幅改善)
・Asp94Ala(タグなし)酵素は、タグなし酵素よりもD-Lys活性が約1/8に減少するが、D-Phe活性は約50倍増大(D-Phe、D-Leuの生産に利用可能)

10

Asp94Alaの構造から見えるPhepyrの結合モデル

Trp148　His96　Asp94Alaへの変異　Trp123　Ala94　Lys150　C4　α-C　水素結合　Phenyl pyruvate (D-Phe)　Nicotine amide　NADPH

・基質のフェニル基はTyr148とニコチンアミド環ではさまれて保持
・Lys150、Trp123、Ala94の側鎖と多くの疎水性相互作用
・親酵素のAsp94の側鎖とは異常接近した位置になる

➢ 基質結合ポケットの拡張
➢ 基質側鎖周辺の疎水性の増加

D-Phe、D-Leu、D-Met、D-Ile、D-Tyr、D-Trp等に対する反応性が増大した要因の一つ

本研究の要約:
1. 耐熱性の meso-DAPDHを堆肥から分離した好熱菌から発見
2. 遺伝子の塩基配列の決定からアミノ酸配列を決定
3. 耐熱性 meso-DAPDHの基質認識部位に5カ所変異導入して耐熱性人工D-AADHの創製に成功
4. 人工D-AADHとD-GDHの共役系を用いるD-アミノ酸→段階生産用バイオリアクターの開発に成功(特に安定同位体^{13}C, ^{15}Nの標識D-アミノ酸の生産に初めて成功:NMR分析への利用)
5. 立体構造解析情報を基に、D-AADHの基質認識に関わる変異導入により、活性の大幅増強に成功
6. 基質認識部位のAsp94Ala変異導入による新規特性を持つD-AADHの創製に成功
7. 今後の課題：工業レベルでのD-アミノ酸生産への本バイオリアクターの展開
8. 研究成果の詳細は 牧田拓太、幸田恵子、大島敏久(2016) 日本ビタミン学会 90, 544-554, 及びH. Akita, J. Hayashi, H. Sakuraba, T. Ohshima (2018) Front. Microbiol., 2018, 9: 1760. をご覧下さい。（机上に準備）

11

ACKNOWLEDGMENTS

主な共同研究者
1. 牧田 拓太（産業技術総合研究所微生物工学研究部門バイオ資源グループ、研究員）
2. 幸田 恵子（立命館大学生命科学部生物工学系、教授）
3. 土居 克実（九州大学大学院農学研究院、教授）
4. 鈴木 宏治（鳥取大学大学院工学研究科、准教授）
5. 林 誠司（立命館大学生命科学部生物工学系 准教）

研究助成：・生研センター　イノベーション創出基礎研究推進事業・日本学術振興会　科学研究費基盤研究A
・大阪工業大学ブランディング2018年度事業

酵素のこれからの産業利用は

酵素の新規機能のデザインと機能アップ
構造と機能解析 ➡ 酵素遺伝子の編集
天然酵素から人工酵素へ

関連発表論文・総説・教科書など

1. H. Akita H, Y. Fujino , K. Doi, T. Ohshima (2011) AMB Express,1(1):43.
2. H. Akita, K. Doi, Y. Kawarabayasi, T. Ohshima (2012) Biotechnol. Lett. 34,1693-1699.
3. H. Akita, H. Suzuki, K. Doi, T. Ohshima (2014) Appl. Microbiol. Biotechnol. 98:1135-1143
4. H. Akita, Y. Imaizumi, H. Suzuki, K. Doi, T. Ohshima (2014) Biotechnol. Lett. 36, 2245-2248.
5. H. Akita, T. Seto, T. Ohshima, H. Sakuraba (2015) Acta Crystallogr. D , 71, 1136-1146.
6. 牧田拓太、大島敏久、幸田恵子(2015) 生化学 87, 582-590（解説）
7. 牧田拓太、幸田恵子、大島敏久(2016) 日本ビタミン学会 90, 544-554（ミニレビュー）
8. J. Hayashi, T. Seto, H. Akita, M. Watanabe, T. Hoshino, K. Yoneda, , T. Ohshima, H. Sakuraba (2017) Appl. Environ. Microbiol. 83(11) e-00491-17, doi: 10.1128/AEM.00491-17.
9. H. Akita, J. Hayashi, H. Sakuraba, T. Ohshima (2018) Front. Microbiol., 2018; 9: 1760. Doi: 10.3389/fmicb.2018.01760(解説)
10. 幸田口拓太、大森勇門、大島敏久 (2015) 化学と生物, 53 (1), 18-25.(解説)
11. 他川、大島、幸川、三原、吉原(2018) 『ヒンドウ』タンパク質工学 開設社, pp.1-210. ISBN978-4-06-153899-3
12. 小林清平、大島敏久(2018)『第3編、第1章4 D-アミノ酸』、食品機能性成分の吸収・代謝機構、CMC出版(東京)、吉沢隆夫編、2018年4月27日、 改訂版、pp.74-79.
13. 大島敏久、日本生物工学会第70回大会（2018年9月7日関西大学で開催）においてオーガイナイザーとしてシンポジウム「機能と構造デザインによる有用酵素の開発と応用展開」を開催した。

E-mail: oshihisa.oshima@oit.ac.jp