

NADP-依存性 D-アミノ酸脱水素酵素の機能改変

Structure-based engineering of NADP-dependent D-amino acid dehydrogenase

櫻庭春彦¹, 米田一成², 大島敏久³

¹香川大学農学部応用生物科学科

〒761-0795 香川県木田郡三木町池戸 2393

²東海大学農学部 バイオサイエンス学科

〒862-8652 熊本県熊本市東区渡鹿 9-1-1

³大阪工業大学工学部生命工学科

〒535-8585 大阪市旭区大宮 5-16-1

Haruhiko SAKURABA^{1,*}, Kazunari Yoneda² and Toshihisa OHSHIMA³

¹ Department of Applied Biological Science, Faculty of Agriculture, Kagawa University, 2393

Ikenobe, Miki-cho, Kita-gun, Kagawa, 761-0795, Japan

² Department of Bioscience, School of Agriculture, Tokai University, Kumamoto, 862-8652, Japan

³ Department of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering, Osaka Institute of Technology, 5-16-1 Ohmiya, Asahi-ku, Osaka, 535-8585, Japan

1 はじめに

meso-ジアミノピメリン酸脱水素酵素 (DAPDH) は, *meso*-ジアミノピメリン酸 (*meso*-DAP) の D-アミノ酸センター不斉炭素の脱アミノ反応を触媒する自然界で唯一の酵素として知られている。従ってその逆反応が利用できれば, 甘味料や抗生剤などの原料物質として注目される D-アミノ酸を一段階で簡便に不斉合成することが可能となる (図 1)。ところが一般に DAPDH は基質特異性が高く, *meso*-DAP のみに特異的に作用するため, その応用展開が阻まれてきた。大島らは, 好熱菌 *Ureibacillus thermosphaericus* に NADP 依存性 DAPDH を見出し, これに 5ヶ所の変異を加えて耐熱性 D-アミノ酸脱水素酵素 (DAADH) を作製した。この変異酵素は, 本来の基質である *meso*-DAP には活性を示さず, 新たに D-リジン, D-アルギニン, D-ロイシンなどの脱アミノ活性を示した。また 4-メチル-2-オキソ吉草酸を基質として, D-ロイシンの合成に利用できることが判明した。

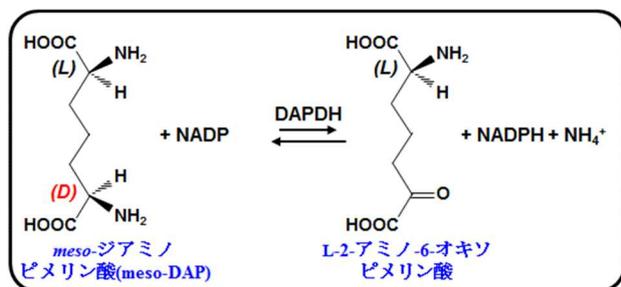


図 1 : DAADH を利用した D-アミノ酸の一段階合成

我々は, *U. thermosphaericus* DAPDH の結晶構造解析に成功し, DAADH にみられた基質特異性の大

幅な変換の要因を明らかにした[1]。一方この DAADH は, 糖尿病治療薬などの原料として有用な D-フェニルアラニンに対して反応性を示さなかった。最近我々は, 基質 *meso*-DAP の近傍に存在すると予想されるアミノ酸残基に変異を導入し, 変異体 D94A および Y224F を得た。D94A は基質特異性を大きく変え, D-フェニルアラニンに対する活性が親酵素と比べて約 50 倍上昇した。また D-メチオニン, D-ロイシン, D-イソロイシンに対する活性も上昇していた。一方, Y224F はすべての基質に対して活性が低下した (図 2) [2]。

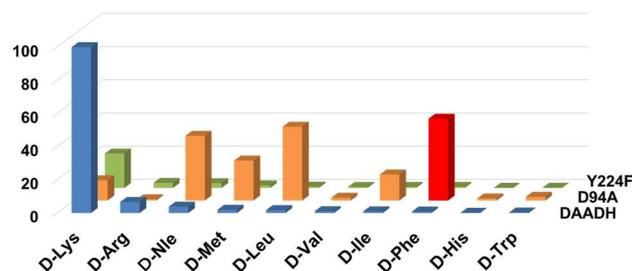


図 2 : DAADH の D-リジンに対する活性を 100% としたときの各基質に対する相対活性

D94A の構造解析の結果, 基質結合ポケットの疎水性の増大とポケット部位の拡大により, かさ高い側鎖を持つ疎水性 D-アミノ酸に対する反応性が上昇したと考えられた。しかし DAADH および D94A は, 酸性アミノ酸には全く反応性を示さない。酸性アミノ酸のなかで特に D-グルタミン酸は, 皮膚のバリア機能回復に利用できることが知られている。本研究

では D94A にさらに変異を加え、D-グルタミン酸に対して反応性を示す変異酵素の作成を試みた。

2 実験

Clostridium symbiosum 由来 L-グルタミン酸脱水酵素 (基質結合型: 1bgv) の活性中心では、L-グルタミン酸の側鎖のカルボキシル基が Lys89 及び Ser380 の側鎖と相互作用している (図3左)。この構造に基づき、D94A にさらに変異を加え、Trp148 をリジンに変異させた D94A-W148K, さらに Asp124 をセリンに変異させた D94A-W148K-D124S を作成した。

3 結果および考察

D94A/Y224F 不活性型変異体に NADPH と 2-オキソ-6-アミノカプロン酸 (リジンのケト酸) が結合した構造が得られたので、これに基づき活性中心に 2-オキソグルタル酸 (グルタミン酸のケト酸) をモデリングした。その結果、2-オキソグルタル酸のカルボキシル基と相互作用する位置、すなわち Trp148 と Asp124 の部位に、それぞれリジンとセリンを配置できる可能性が示された (図3右)。

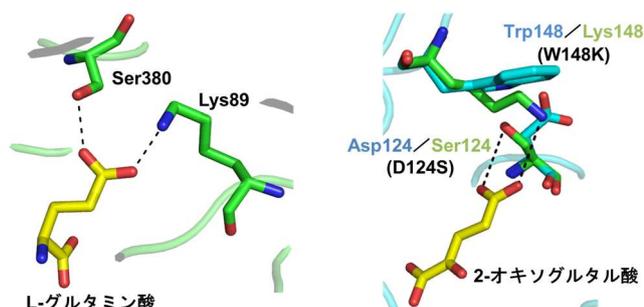


図3: (左) *C. symbiosum* 由来 L-グルタミン酸脱水酵素, (右) 2-オキソグルタル酸をモデリングした変異酵素

D94A, D94A-W148K, D94A-W148K-D124S それぞれの祖酵素抽出液を熱処理し (55°C, 30 分間), 遠心上清の活性測定を行った。その結果, D94A-W148K と D94A-W148K-D124S には D-グルタミン酸に対する活性が確認された (表1)。特に, D94A-W148K-D124S は D94A-W148K に比べ 2 倍近くの活性を示した。また, D94A-W148K-D124S は D94A に比べて 2 倍以上の高い D-フェニルアラニン酸化活性が認められた。

今後は, D94A-W148K-D124S 変異体, NADP, 基質 (D-グルタミン酸または 2-オキソグルタル酸) の複合体の構造解析を行い, 基質のカルボキシル基と Lys148 および Ser124 の側鎖との相互作用を確認する必要がある。またその構造情報に基づき, さらに D-グルタミン酸に対する反応性を高めた変異酵素の作成をめざす。

表 1: 変異酵素の各基質に対する活性

	D-グルタミン酸	D-フェニルアラニン	D-チロシン
D94A	Not detectable	2.29	0.43
D94A-W148K	0.006	0.51	0.21
D94A-W148K-D124S	0.012	5.34	0.52

比活性 (μmol/min/mg)

謝辞

本研究におけるデータ収集は PF スタッフのご援助によりなされたものです。ここに感謝致します。

参考文献

- [1] H. Akita *et al.*, *Acta Crystallogr.* **D71**, 1136 (2015).
- [2] J. Hayashi *et al.*, *Appl. Env. Microbiol.* **83**, e00491-17 (2017).

* sakuraba.haruhiko@kagawa-u.ac.jp