

不斉反応を触媒する酵素群の分子育種 -非天然アミノ酸ケミカルライブラリー構築をめざして-

村松 久司
(高知大学 教育研究部)

研究の目的

タンパク質に組み込まれない、いわゆる非天然(非タンパク質構成)アミノ酸は医薬品などの合成中間体として有用な化合物である¹⁻⁴⁾。しかし、多くの光学活性な非天然アミノ酸は高価であるため、安価で実用的な不斉合成プロセスの開発が望まれている。本研究では、型リンゴ酸・乳酸脱水素酵素ファミリーに属する不斉合成に有用な酵素 DpkA を進化分子工学的的手法により改変し、耐熱性・基質特異性を改良することを目的とする。DpkA は α -ケト酸とメチルアミンから NADPH 依存的に *N*-メチル-L-アミノ酸を合成する反応と、NADPH 依存的に Δ^1 -ピペリدين-2-カルボン酸を不斉還元して L-ピペコリン酸に変換する反応を触媒する酵素であり、医薬品原料や農薬の合成中間体として有用なこれらの光学活性化合物の生産に利用できる^{5,6)}。本研究で作製する「改良型酵素」は、実用的で持続可能な不斉合成プロセスの実現に寄与できるものと考えている。

方法

pET21a(+) の *Nde*I-*Hind*III 部位に *Pseudomonas putida* NBRC100650 (KT2440) 由来の *dpkA* (PP3591) 遺伝子を組み込み、pDpkA を構築した。pDpkA で形質転換した *Escherichia coli* BL21(DE3) を 100 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 培地で培養し、1 mM IPTG を加えて組換え酵素の発現を誘導した。培養液を遠心分離し、集菌体を氷上で超音波破碎して得た粗酵素液を Ni-NTA カラムクロマトグラフィーに供し、C 末端に 6xHis タグが付加した DpkA を精製した。精製酵素を用いて温度、pH、NaCl 濃度、塩酸グアニジン濃度、SDS 濃度、エタノール濃度の変化に対する DpkA の安定性を調べた。次に、DpkA 変異酵素ライブラリーを構築するために、pDpkA を鋳型としたエラープローン PCR の最適条件、および変異酵素ライブラリーから耐熱化酵素を選抜する方法について検討した。

結果

DpkA の安定性

様々な条件の変化が DpkA の安定性に与える影響について図 1 に示した。温度の変化に対しては、25 においても活性は完全に維持されず、30 で 30 分間処理すると 59% まで活性が低下した。45 では、2.5 分で完全に失活した。pH の変化においては、pH 7 以上では pH が上昇するにつれて活性は減少した。NaCl 濃度を変化させた場合、生理食塩水と同等の塩濃度でも 63% まで活性が低下することがわかった。グアニジン塩酸塩濃度の変化に対する影響を調べた結果、13 mM では 24% まで活性が低下した。SDS 濃度を変化させた場合、20 mM において完全に失活した。エタノール濃度の変化においては、DpkA は 60% エタノール存在下で完全に失活した。耐熱化酵素が取得できた場合、今回

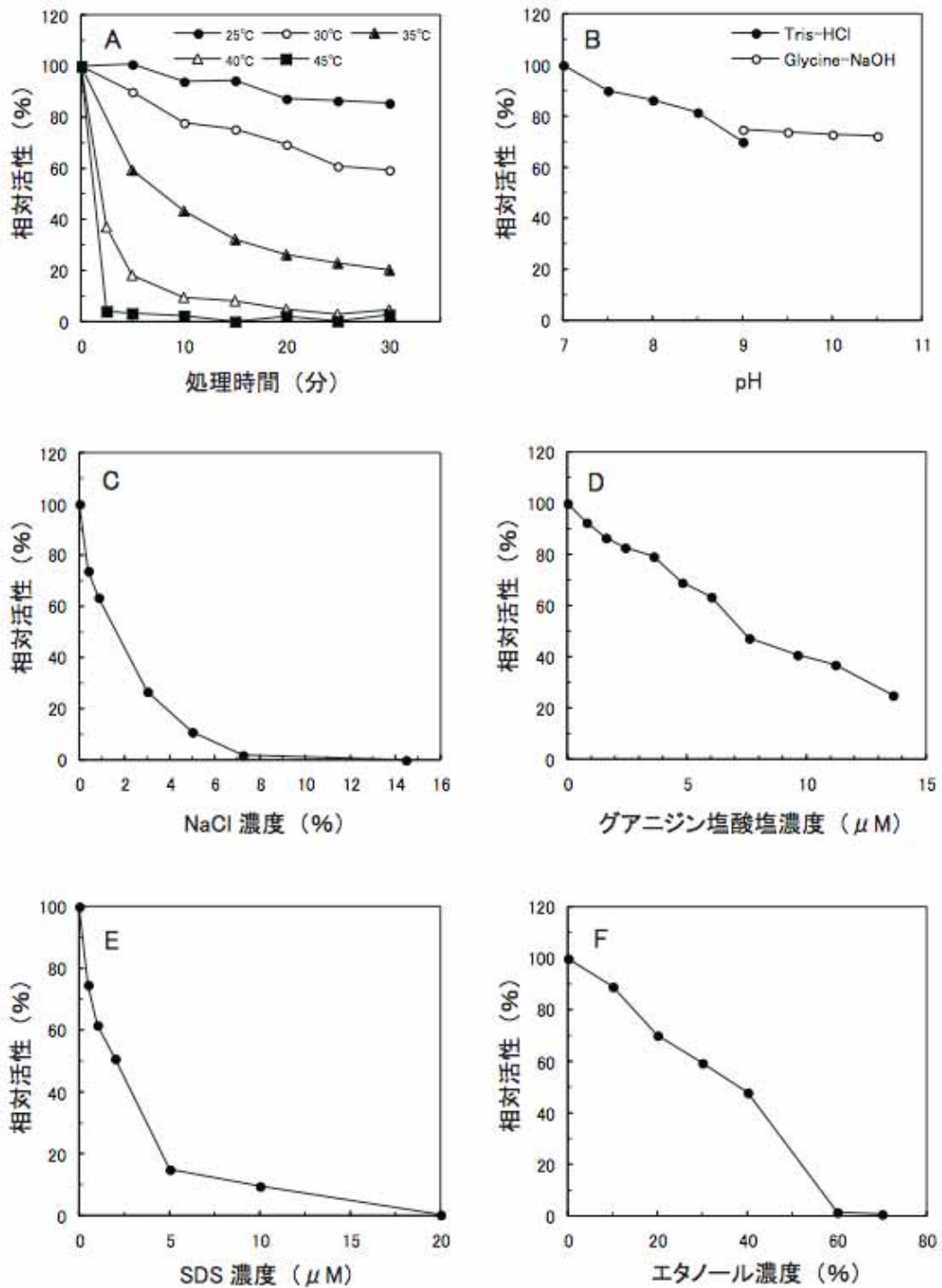


図1 DpkAの安定性

(A) 温度の変化による影響、(B) pH の変化による影響(氷上で30分間インキュベート)、(C) NaCl 濃度の変化による影響、(D) グアニジウム塩酸塩濃度の変化による影響(氷上で10分間インキュベート)、(E) SDS 濃度の影響(氷上で10分間インキュベート)、(F) エタノール濃度による影響(氷上で10分間インキュベート)。

調べた条件下における酵素活性を測定し、野生型酵素と比較する予定である。

エラープローン PCR の最適条件の検討と変異酵素ライブラリーからの耐熱化酵素の選抜条件

pDpkA をエラープローン PCR のテンプレートとして使用した。1 xPCR 緩衝液、0.25 mM dGTP、0.25 mM dCTP、0.25 mM dTTP、4 mM dATP、33.5 pmol プライマー、3.4 ng 鋳型 DNA、4.2 U Taq ポリメラーゼを含む 100 μ l の反応液を調製し、94 で 1 分間、55 で 1 分間、72 で 1 分間のサイクルを 10 回繰り返した。その後、25 nmol の dATP を加えて、さらに、94 で 1 分間、55 で 1 分間、72 で 1 分間のサイクルを 25 回繰り返した。増幅した DNA 断片を pET21a(+) に連結して、*E. coli* BL21(DE3) を形質転換した。形質転換体からプラスミドを抽出して、挿入断片の配列を解析すると、1 から 6 カ所に塩基置換が見られた。この PCR 条件を以降の実験に用いることにした。

次に、得られた変異酵素ライブラリーから耐熱化酵素を選抜する方法を検討した。pDpkA を保持する *E. coli* BL21(DE3) の粗酵素液を 30、45、50 で 30 分間インキュベートして、マイクロプレートリーダーを用いて *N*-メチル-L-アミノ酸脱水素酵素活性を測定した結果、30 と 45 でインキュベートした場合には活性を検出できたが、50 では活性を検出できず、DpkA は失活したと考えられた。そこで、変異酵素ライブラリーを 45 と 50 でインキュベートした後の残存活性を野生型酵素と比較することで耐熱化酵素の選抜をすることにした。

今後は、確立した上記の条件で耐熱化酵素の取得を目指す予定である。また、既知の DpkA は NADPH を良い補酵素とする。そこで、NADH を補酵素として、高い活性を示す DpkA の取得も目指す予定である。

結論

本研究により、*P. putida* NBRC100650 由来の DpkA の安定性に関する知見が得られた。また、エラープローン PCR の最適条件が決定したことで変異酵素ライブラリーの取得が可能になるとともに、変異酵素ライブラリーの中から耐熱化 DpkA を選抜する方法についても設定できた。今後は、本研究で確立した条件で変異酵素ライブラリーを作製し、この中から、耐熱化酵素、および補酵素特異性が NADPH から NADH に変わった「改良型酵素」を見出し、得られた酵素を用いて、医薬品原料として有用な *N*-メチル-L-アミノ酸や L-ピペコリン酸の合成を試みる予定である。耐熱化酵素を用いた物質生産系は従来より長時間反応が可能になることが予想され、菌体量あたりの有用物質生産量を向上できると考えている。

文献

- 1) Rinehart K.L. Jr., Gloer J.B., Cook J.C. Jr., Mizens S.A., Scahill T.A. Structures of the didemnins, antiviral and cytotoxic depsipeptides from a Caribbean tunicate. *J. Am. Chem. Soc.* **103**: 1857–1859 (1981).
- 2) Pettit G.R., Kamano Y., Herald C.L., Fujii Y., Kizu H., Boyd M.R., Boettner F.E., Doubek D.L., Schmidt J.M., Chapuis J.-C., Michel C. Isolation of dolastatins 10–15 from the marine

- mollusc *Dolabella auricularia*. *Tetrahedron* **49**: 9151-9170 (1993).
- 3) Tanaka H., Kuroda A., Marusawa H., Hatanaka H., Kino T., Goto T., Hashimoto M. Taga T. Structure of FK506: a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces*. *J. Am. Chem. Soc.* **109**: 5031-5033 (1987).
 - 4) Germann U.A., Shlyakhter D., Mason V.S., Zelle R.E., Duffy J.P., Galullo V., Armistead D.M., Saunders J.O., Boger J., Harding M.W. Cellular and biochemical characterization of VX-710 as a chemosensitizer: reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance *in vitro*. *Anticancer Drugs* **8**: 125-140 (1997).
 - 5) Muramatsu H, Mihara H, Kakutani R, Yasuda M, Ueda M, Kurihara T, Esaki N. The putative malate/lactate dehydrogenase from *Pseudomonas putida* is an NADPH-dependent Δ^1 -piperidine-2-carboxylate/ Δ^1 -pyrroline-2-carboxylate reductase involved in the catabolism of D-lysine and D-proline. *J. Biol. Chem.* **280**: 5329-5335 (2005).
 - 6) Mihara H, Muramatsu H, Kakutani R, Yasuda M, Ueda M, Kurihara T, Esaki N. *N*-methyl-L-amino acid dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. A novel member of an unusual NAD(P)-dependent oxidoreductase superfamily. *FEBS J.* **272**: 1117-1123 (2005).