

特集：D-アミノ酸制御システムのニューバイオロジー：  
Frontier Science in Amino Acid and Protein Research

## D-アミノ酸アミド加水分解酵素群の発見と アミノ酸アミドの光学分割への利用

浅野 泰久<sup>1</sup>, 米田 英伸<sup>1</sup>, 岡崎 誠司<sup>2</sup>, 山根 隆<sup>2</sup>

D-アラニン *N*-アルキルアミドや D-アミノ酸の酵素法による製造プロセスを開発する途上、土壌より分離した細菌が生産する新しい D-アミノ酸アミド加水分解酵素群を見出した。D-アミノペプチダーゼ (DAP, EC 3.4.11.19) および D-アミノ酸アミダーゼ (DaaA) の酵素化学的諸性質および立体構造が詳細に解析され、いずれも Ser を活性中心とする β-ラクタマーゼと類似の構造を含むことが明らかになった。それぞれの基質特異性を説明する構造上の特徴が見出された。これらの酵素を触媒として用いると D 立体選択的なアミノ酸アミドの光学分割が可能である。さらに、最近見出したアミノ酸アミドラーゼを共に用いると、アミノ酸アミドのダイナミックな光学分割による光学活性アミノ酸の合成が可能になった。

### はじめに

化学合成により容易に得られるアミノ酸アミドを基質とする酵素的光学分割法を提唱し、各種の新規なアミノ酸アミダーゼ類を開発してきた。これらの酵素は、特異な構造と機能を有することで特徴的である。これらの酵素を、アミノ酸アミドの光学分割に用い、D-アミノ酸を製造することが可能である。最近、これらのアミノ酸アミダーゼ類をアミノ酸アミドラーゼと共に用いて、さらにダイナミックな光学分割に有効に利用することが可能になった。

本稿では、D 立体選択的なアミノ酸アミド加水分解酵素等の探索とその利用、および最近解明されたこれらの酵素の構造と機能について紹介する。

### 1. D 立体選択的なアミノ酸アミダーゼの探索と 光学分割への利用

Pfizer による新しい人工甘味料として有望視されたアリテーム (L-アスパルチル D-アラニンチエタンアミド)<sup>1)</sup>の構成成分となる D-アラニン *N*-アルキルアミドの酵素的合成研究を開始する際に、以下のように考えた。アミノ酸にはそのアミノ基およびカルボキシル基に、それぞれアシル基や Boc 基等の保護基を有する化合物、あるいはエステルやアミド化された誘導体が存在する。DL 異性体を考慮すると、これらには計 4 種類の誘導体グループが存在する (図 1)。加水分解酵素を触媒として利用する速度論的光学分割反応において、*N*-アシルアミノ酸に作用する酵素として L-アミノアシラーゼおよび D-アミノアシラーゼが知られており、前者は各種 L-アミノ酸の工業的製造に用いられてきた (図 2)。D-アミノ酸アミドやエステルの加水分解反応を触媒する酵素が存在すれば、それらを有機溶媒中等の条件下で用いて目的のアミドの合成が可能になる。

<sup>1</sup>富山県立大学生物工学研究センターおよび工学部生物工学科 (〒939-0398 富山県射水市黒河 5180)

<sup>2</sup>名古屋大学大学院工学研究科生物機能工学専攻 (〒464-8603 名古屋市千種区不老町)

Discovery of D-stereoselective amino acid amidases, and their use in kinetic resolution of amino acid amides

Yasuhisa Asano<sup>1</sup>, Hidenobu Komeda<sup>1</sup>, Seiji Okazaki<sup>2</sup>, and Takashi Yamane<sup>2</sup> (Biotechnology Research Center, and Department of Biotechnology, Toyama Prefectural University, Imizu, Toyama 939-0398, Japan; <sup>2</sup>Department of Biotechnology, School of Engineering, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-8603, Japan)

反応中間体として想定される D-アミノアシル-酵素複合体が加水分解されれば、D-アミノ酸が生成する。すなわち、保護基をかけない安価なラセミ体のアラニンアミドやエステルに、アミンを作用させて D-アラニン N-アルキルアミドを D 立体選択的に合成できると考えた。しかしながら、そのような酵素は知られていなかった<sup>2,3)</sup>。そこで、D-アミノ酸アミドの選択的な加水分解反応を触媒する酵素のスクリーニングに着手した。D-アミノ酸アミドを窒素源として生育する微生物を自然界から集積培養法や馴養培養法を用いて多数分離し、さらに保存菌株からも検索した。候補株からそのつと酵素を精製し、立体選択性を確認する二次スクリーニングを経て、数種の微生物株候補株を選択した。その結果、土壌から分離した細菌 *Ochrobactrum anthropi* C1-38 株および SV3 株を得ることに成功した。

D-アミノ酸は医薬品や農薬原料の合成原料としても注目されており、D-アミノ酸の効率的な生産方法が望まれている。D-アミノ酸アミダーゼが存在すれば、上記の目的以外にもアミノ酸アミドを不斉加水分解して D-アミノ酸を与える、新しい酵素的合成法にも発展させることが可能である。この合成では、アミノアシラーゼを用いるアシルアミノ酸の光学分割よりも短いステップで D-アミノ酸に到達できることになり、産業的にメリットがある (図 2)。

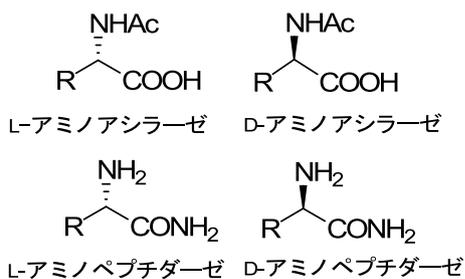


図 1 アミノ酸誘導体に作用する 4 種類の加水分解酵素群

## 2. D 立体選択的ペプチダーゼおよびアミダーゼの性質

自然界から D 立体選択的ペプチダーゼおよびアミダーゼ生産微生物の探索を行い、目的の微生物を分離した。それらは、3 種類の新しい酵素を生産した (表 1)。まず、D-アラニンアミド (D-Ala-NH<sub>2</sub>) を単一窒素源として分離した *Ochrobactrum anthropi* C1-38 は D-アミノ酸を含むペプチドや D-アラニン等のアミノ酸のアミドを D 立体選択的に作用する加水分解酵素、D-アミノペプチダーゼ (DAP, EC 3.4.11.19) を生産する<sup>4,5)</sup>。DAP は、遊離のアミノ基を認識して、D-アミノ酸を N 末端に有するペプチドやアミノ酸アミドの加水分解反応を触媒する。一方、D-バリンアミドを窒素源として数ヶ月の馴養培養の結果分離した *O. anthropi* SV3 は、フェニルアラニンやチロシン等のかさ高い側鎖をもつアミノ酸のアミドの D 立体選択的な加水分解酵素を生産した<sup>6)</sup>。本酵素は、DAP のようなペプチダーゼ活性は示さず、D-アミノ酸アミダーゼ (DaaA) と呼べる酵素である。さらに、D-フェニルアラニンの四量体 (D-Phe)<sub>4</sub> を合成し、その分解菌 *B. cereus* DF4-B を分離した。その培養上清に分泌されるアルカリ D-ペプチダーゼ (ADP) はフェニルアラニン等を含むペプチドの N 末端から 2 番目の D 体を認識するエンドペプチダーゼであった<sup>7)</sup>。

## 3. D-アミノペプチダーゼ (DAP) の構造

表 1 に示す 3 種類の D 立体選択的加水分解酵素の一次構造は、いずれも細菌細胞壁のペプチドグリカン生合成に関与する DD-カルボキシペプチダーゼや β-ラクタム抗生物質の加水分解を触媒する β-ラクタマーゼと相同性を示し、Ser を活性中心とするペニシリン認識酵素ファミリーに属する。

DAP の X 線構造解析が、1.9 Å 分解能で行われている<sup>8)</sup>。

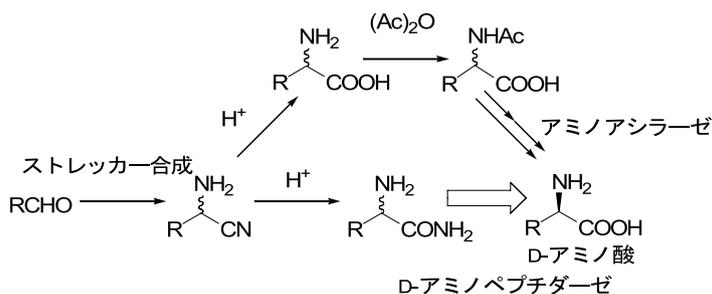


図 2 アミノ酸誘導体の合成と光学分割

表 1 我々が見出した微生物由来の新規な D-アミノ酸含有ペプチド加水分解酵素

酵 素	由 来	活性中心	用 途
D-アミノペプチダーゼ (DAP)	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	Ser	ダイナミックな光学分割, ペプチド結合の合成
アルカリ D-ペプチダーゼ (ADP)	<i>Bacillus cereus</i>	Ser	ダイナミックな光学分割
D-アミノ酸アミダーゼ (DaaA)	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	Ser	ペプチド結合の合成

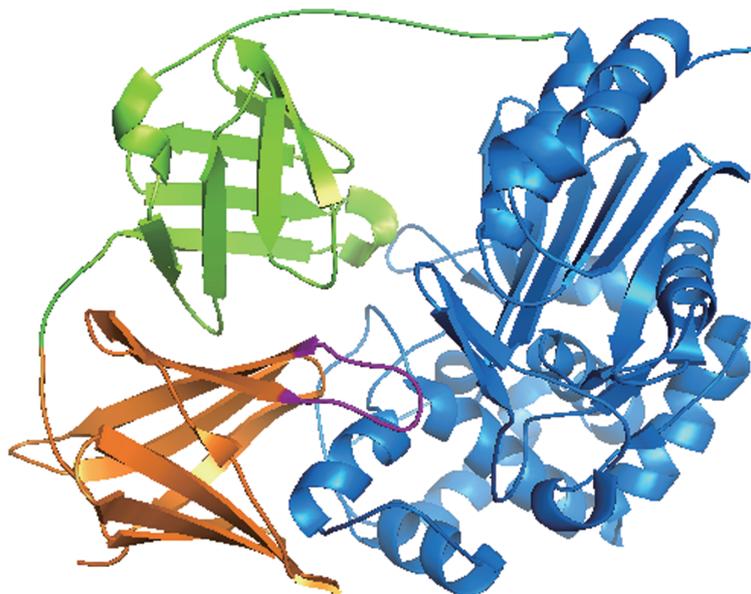


図3 DAPの全体構造  
ドメインA (青), B (緑), C (オレンジ).  $\gamma$ -ループ (残基 476-486) は紫で示す.

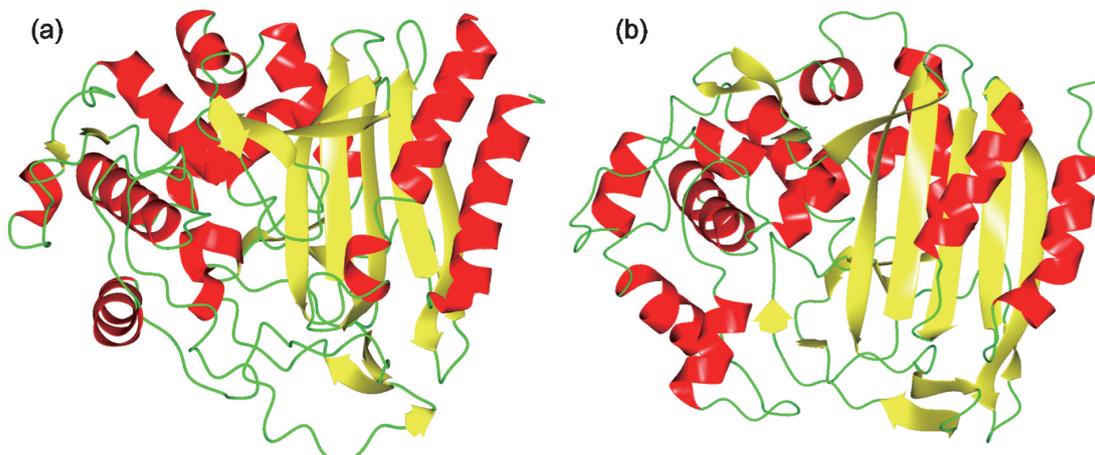


図4 DaaAの単量体(a)とDAPのドメインA(b)の全体構造の比較

本構造より, D-アミノ酸をN末端にもつ基質に対してアミノペプチダーゼ活性を示すという独特な基質特異性を決定付けているドメイン構造が解明された(図3)。すなわち, ドメインAは, セリンを活性中心とする $\beta$ -ラクタマーゼと類似の構造を有し,  $\alpha/\beta$ ドメインとヘリカルドメインからなる(残基3-331)。ドメインBは8本の逆平行 $\beta$ シートからなる $\beta$ -バレル構造をしている(残基341-418)。また, ドメインAとBは, 9個のアミノ酸ペプチド(332-340残基)で連結している。ドメインCも同様に8本の逆平行 $\beta$ シートからなる $\beta$ -バレル構造をしており(残基422-520), 3個のアミノ酸ペプチド(残基419-421)で連結している。ドメインCには $\gamma$ -ループ(476-486残基)と呼ばれるループがあり, このループ上のAsp481は, ド

メインAの活性部位( $\alpha/\beta$ ドメインとヘリカルドメインの間に存在)へ突き出している, 活性部位の一部を形成している。このAsp481が, 基質ペプチドのN末端のD-アミノ酸のアミノ窒素と相互作用することが示唆されている<sup>8)</sup>。

DAPは, 基質ペプチドのN末端側から加水分解するペプチダーゼ活性は有するが, 基質ペプチドのC末端側から加水分解するペプチダーゼ活性(CPase活性)は有さない。この活性の有無は, DAPの構造から計算された, 基質を受け入れるための空洞から説明することができる。すなわちDAPでは, 基質ペプチドのN末端残基が求核基Ser62に近づくのに十分な空洞が認められた。しかし, 基質ペプチドのC末端残基が求核基Ser62に近づくのに必要な空洞は, DAPでは $\gamma$ -ループ(476-486残基)上の残基で

ある480-483残基の立体障害のため認められなかった。実際に、 $\gamma$ -ループ上のすべての残基をGlyに変異させた変異型DAPはCPase活性を得たため、後者の考えは、実験的にも裏付けられている<sup>9)</sup>。

#### 4. D-アミノ酸アミダーゼ (DaaA) の構造

DaaAはその一次配列から、ペニシリン認識酵素群 (PRPs) に属すると考えられる。PRPsは、三つの典型的なモチーフ (SXXK, Y(S)XN, H(K, R)T(S)G, Xは任意のアミノ酸) が活性部位を形成している。これまでに構造解析されたPRPsの具体例として、 $\beta$ -ラクタマーゼに属するクラスC  $\beta$ -ラクタマーゼ<sup>10)</sup>や、ペニシリン結合酵素群 (PBPs) に属するDD-カルボキシペプチダーゼ<sup>11)</sup>が挙げられる。DaaAにおいても、PRPsに特有の三つのモチーフ、Ser-X-X-Lys, Tyr-X-Asn, His-Thr-Glyが存在する。最初のモチーフのSer60は、求核基と考えられている<sup>6)</sup>。2番目のモチーフのTyrは、クラスC  $\beta$ -ラクタマーゼやDD-カルボキシペプチダーゼでも保存されているが、ほとんどのPBPsではSerである。クラスC  $\beta$ -ラクタマーゼ<sup>12)</sup>やDD-カルボキシペプチダーゼ<sup>13)</sup>では、このTyrは脱アシル化の際の一般塩基として働くことが示唆されているので、DaaAのTyr149も同じ働きを果たすことが予想される。3番目のモチーフ (通称KTGボックス) は、PRPsにおいて活性部位の溝の反対側の壁を形成するモチーフであるが、DaaAではHis307-Leu308-Gly309が位置していた。特に、DaaAのLeu308の側鎖は、Phe282の側鎖と疎水性相互作用を形成していて、後述する基質ペプチドのN末端残基が求核基Ser60に近づくのに必要な空洞を遮断していた点で、他のPRPsと比べ独特であった。

OkazakiらによりDaaAのX線結晶構造解析も、2.1Å分解能で行われている<sup>14)</sup>。DaaAの単量体は、残基1-60と残基243-363から形成される $\alpha/\beta$ ドメイン (4本の $\alpha$ ヘリックスによりはさまれた5本の逆平行 $\beta$ シート) と、残基61-242で形成されるヘリカルドメイン (7本の $\alpha$ ヘリックスと $\Omega$ -ループ (残基207-223)) により構成されており、DAPのドメインAの構造と類似していた (図4)。

生成物であるD-PheとDaaAの複合体の構造も2.4Å分解能で報告されている。6分子中5分子 (A-E) で、生成物D-Pheの電子密度がDaaAの活性部位に認められた。この複合体構造から、生成物D-Pheの認識機構が提案されている。D-Pheの側鎖のフェニル基は、Ala59, Phe113, Glu114, Trp215, Phe234, Ala239, Ala242, Gly243, Ile311により形成される疎水性ポケットに位置し、かさ高い疎水性側鎖をもつアミノ酸アミドを基質として好む、DaaAの基質特異性を生み出していると考えられる。また、DaaAに高いD立体選択性を与えていると考えられるD-Pheのアミノ窒素に配位する、三つの水素結合も認められた。

DaaAのD-Phe複合体の活性部位と、DAPの活性部位を重ね合わせると、DaaAのGlu114の側鎖と、基質などを含まないDAPのAsp481の側鎖が対応していた。この結果は、Asp481やそれに対応するカルボキシル基の負電荷が、基質のN末端のアミノ窒素の正電荷を認識するというB-Gillesらの示唆<sup>8)</sup>を裏付けており、これらの酵素群における、基質ペプチドをN末端から加水分解する活性を生み出しているものと考えられる。DaaAは、基質ペプチドのN末端側から加水分解するペプチダーゼ活性と、基質ペプチドのC末端側から加水分解するペプチダーゼ活性 (CPase活性) の両方とも有さない。このペプチダーゼ活性がない理由も、基質ペプチドのN末端残基が求核基Ser60に近づくのに必要な空洞と、基質ペプチドのC末端残基が求核基Ser60に近づくのに必要な空洞のいずれもが側鎖により埋められているためと考えられる。

#### 5. 光学分割によるD-アミノ酸類合成への応用

アミダーゼ活性を有するDAPやDaaAを用いるとラセミ体アミノ酸アミドを光学分割してD-アミノ酸を選択的に合成することが可能である。DAPを高度に発現させた組換え大腸菌をアラニンアミドに作用させた時、5Mの基質から、約4.5時間で2.5M (約220g/liter) のD-アラニンが定量的に生成した。同様にD-2-アミノ酪酸、D-メチオニン、D-ノルバリン、D-ノルロイシンが合成できた。進化分子工学の手法で、耐熱性を5°C、比活性を2倍以上に上昇させた変異型DaaAを用いて、大腸菌で発現させフェニルアラニンアミドの光学分割を行い、D-フェニルアラニン (光学純度99.7%ee以上) の合成が可能になった<sup>15)</sup>。

#### 6. アミノ酸アミドのダイナミックな光学分割

ダイナミックな光学分割 (動的な光学分割) は、酵素を用いる光学分割の際に、基質のみがラセミ化を受け、光学活性体が定量的に得られる速度論的光学分割反応の一種である。上記のように一群のD-アミノ酸アミド加水分解酵素は、優れたD立体特異性を示すが、光学分割反応では理論収率50%を越えることがない。アミノ酸アミドラセミ化酵素 (ラセマーゼ) が存在すれば、アミノ酸アミドの系内ラセミ化が可能になる。アミノ酸アミド不斉加水分解酵素とアミノ酸アミドラセマーゼを組合せるだけで、いずれの立体のアミノ酸も製造可能な、新しい酵素的合成法が成立する<sup>3)</sup>。

*Achromobacter obae*<sup>16,17)</sup>由来の $\alpha$ -アミノ- $\epsilon$ -カプロラクタム (ACL) ラセマーゼ遺伝子 (435アミノ酸残基をコードし、1,305bp塩基からなる) を、合成プライマーを用いるPCR反応によって構築した<sup>18,19)</sup>。本酵素を大腸菌形質転換株より単一に精製した。L-2-アミノ酪酸アミドに対する比活性は9.5U/mgであり、これはL-ACL (100mMの基質濃

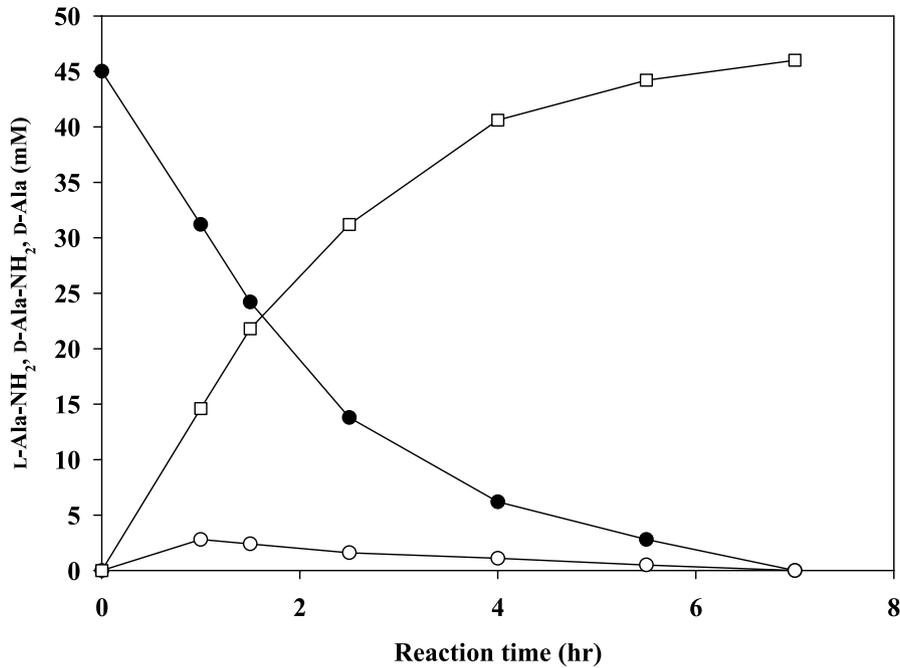


図5 L-アラニンアミドからのD-アラニンの合成  
● L-アラニンアミド；○ D-アラニンアミド；□ D-アラニン

度で350U/mg)に対するその2.7%の活性であった。アラニンアミド、スレオニンアミド、ノルバリンアミド、ノルロイシンアミド等に対する相対活性は、いずれも2.1%以下であった。 $\alpha$ -アミノ酸、アラニンを含むペプチド、アラニンメチルエステルに対するラセミ化活性は認められなかった。2-アミノ酪酸アミドとアラニンアミドラセミ化の $K_{eq}$ は、それぞれ1.0および1.0と計算され、ラセミ化反応として妥当なものであった。

$$K_{eq} = [K_{cat}/K_m]_{D\text{-isomer}} / [K_{cat}/K_m]_{L\text{-isomer}} = 1.0$$

*O. anthropi* Cl-38由来のDAPやDaaAと大腸菌で発現した*A. obae*由来のACLラセマーゼとの組合せにより、アミノ酸アミドのダイナミックな光学分割を行い、定量的に光学活性なD-アラニン等を合成した。L-アラニンアミドがラセミ化を受け、DL-アラニンアミドとなり、そのうちのD-アラニンアミドのみが、DAPにより加水分解を受け、光学活性なD-アラニンが定量的に合成できた(図5)<sup>17)</sup>。

### おわりに

酵素を用いる光学分割のメリットは、温和な条件で基質を無保護で用いることができ、さらに極めて反応の立体選択性が高いことなどである。我々は、このように一群のD-アミノ酸アミド加水分解酵素が存在することを発見し、アミダーゼ活性を示す菌株や遺伝子ライブラリーを多数保持している。特にDAP等のD-アミノ酸アミド加水分解酵素

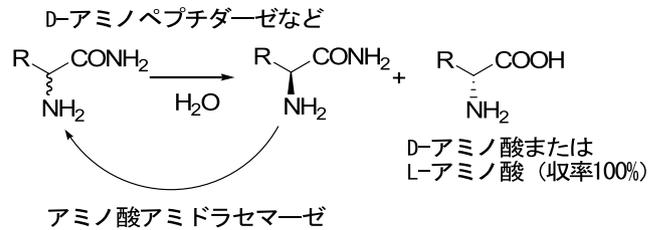


図6 アミノ酸アミドのダイナミックな光学分割

は、極めて優れたD立体選択性を示し、それだけで光学活性アミノ酸類の合成への応用が可能になるが、理論収率50%を越えることがない。アミノ酸アミド不斉加水分解酵素とACLラセマーゼを組合せるだけで、いずれの立体のアミノ酸も製造可能な、新しい酵素的合成法が成立する(図6)<sup>18)</sup>。ACLラセマーゼとL立体選択的加水分解酵素を組合せて用いれば、同様にL-アミノ酸を定量的に合成することが可能であり、安価に調製できるアミノ酸アミドからダイナミックな光学分割によって、アミノ酸の両鏡像体を定量的に合成できる<sup>20)</sup>。

本研究で紹介した酵素は、すべて実用を考えた研究の中で見出されたものである。これらの酵素の構造は、ペニシリン認識酵素群(PRP)に属する $\beta$ -ラクタマーゼや、ペニシリン認識酵素群(PRP)またはペニシリン結合酵素群(PBP)に属するDD-カルボキシペプチダーゼに類似し、それぞれの反応の特徴が詳細な構造解析によって明らかになった。いずれも、細菌のペプチドグリカンの生合成や分解に必要とされる酵素であると考えられる。

## 謝辞

本研究の一部は、平成18年度～19年度（独）日本学術振興会科学研究費（基盤研究（B））（課題番号：18380061）によって行われたものである。ACLラセマーゼについての研究は、DL- $\alpha$ -アミノ- $\epsilon$ -カプロラクタム（ACL）を基質とするL-リジンの製造についての東レ（株）、および左右田らの公開研究情報に基づいて可能になったものである。記して感謝する。

## 文 献

- 1) Glowaky, R.C., Hendrick, M.E., Smiles, R.E., & Torres, A. (1991) in ACS Symp. Ser. Sweeteners 450, pp. 57-67, American Chemical Society, New York.
- 2) Asano, Y. & Lübbehüsen, T.L. (2000) *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 295-306.
- 3) 浅野泰久 (2005) *ファルマシア*, **41**, 881-884.
- 4) Asano, Y., Nakazawa, A., Kato, Y., & Kondo, K. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 14233-14239.
- 5) Asano, Y., Kato, Y., Nakazawa, A., & Kondo, K. (1992) *Biochemistry*, **31**, 2316-2328.
- 6) Komeda, H. & Asano, Y. (2000) *Eur. J. Biochem.*, **267**, 2028-2036.
- 7) Asano, Y., Ito, H., Dairi, T., & Kato, Y. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 30256-30262.
- 8) B-Gilles, C., Remaut, H., Villeret, V., Prangé, T., Fanuel, L., Delmarcelle, M., Joris, B., Frère, J.M., & Beeuman, J.V. (2000) *Structure*, **8**, 971-980.
- 9) Delmarcelle, M., Boursoit, M.C., Filée, P., Baurin, S.L., Frère, J. M., & Joris, B. (2005) *Protein Sci.*, **14**, 2296-2303.
- 10) Crichlow, G.V., Kuzin, A.P., Nukaga, M., Mayama, K., Sawai, T., & Knox, J.R. (1999) *Biochemistry*, **38**, 10256-10261.
- 11) Kelly, J.A. & Kuzin, A.P. (1995) *J. Mol. Biol.*, **254**, 223-236.
- 12) Lamotte-Brasseur, J., Dubus, A., & Wade, R.C. (2000) *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, **40**, 23-28.
- 13) Silvaggi, N.R., Anderson, J.W., Brinsmade, S.R., Pratt, R.F., & Kelly, J.A. (2003) *Biochemistry*, **42**, 1199-1208.
- 14) Okazaki, S., Suzuki, A., Komeda, H., Yamaguchi, S., Asano, Y., & Yamane, T. (2007) *J. Mol. Biol.*, **368**, 79-91.
- 15) Komeda, H., Ishikawa, N., & Asano, Y. (2003) *J. Molec. Catal. B: Enzymatic*, **21**, 283-290.
- 16) Ahmed, S.A. Esaki, N., Tanaka, H., & Soda, K. (1983) *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1887-1893.
- 17) Naoko, N., Oshihara, W., & Yanai, A. (1987) in *Biochemistry of Vitamin B6*, pp. 449-452, Birkhäuser Verlag, Basel.
- 18) Asano, Y. & Yamaguchi, S. (2005) *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 7696-7697.
- 19) Asano, Y. & Yamaguchi, S. (2005) *J. Molec. Catal. B: Enzymatic*, **36**, 22-29.
- 20) Yamaguchi, S., Komeda, H., & Asano, Y. (2007) *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 5370-5373.