The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

立体選択的アミノ酸アミド加水分解酵素の探索と光学活性アミノ酸類の合成への利用

米田 英伸*・浅野 泰久

光学活性アミノ酸は医薬品などのファインケミカルの合成原料として利用価値の高い化合物であり，バイオプロセスによる効率的な合成方法の開発が必要とされている．そのひとつとして，ラセミ体アミノ酸アミドに立体選択的なアミド加水分解酵素を作用させ，光学活性アミノ酸を合成する方法がある.[1] 筆者らは酵素法による光学活性アミノ酸類の合成法の開発を目的として，自然界より立体選択的なアミノ酸アミド加水分解酵素を生産する微生物の探索を行ってきた．本稿においては，その過程で発見した5種類の新規な加水分解酵素の特徴と光学活性アミノ酸類の合成への応用について紹介したい．

D-立体選択的アミノ酸アミド加水分解酵素

D-アミノ酸は医薬，農薬，食品添加物などの合成中間体として有用であり，その効率的な合成法の開発が必要とされている．L-アミノ酸は発酵法または酵素法で合成できるのに対し，D-アミノ酸は酵素法で合成することになる．D-アミノ酸の酵素的合成法にはヒダントイン誘導体にD-ヒダントイナーゼを作用させる方法，*N*-アシルD-アミノ酸にD-立体選択的アシラーゼを作用させる方法，α-ケト酸にD-アミノ酸アミノ基転移酵素などを作用させる方法などがある．我々は対応するアルデヒドとシアン化水素およびアンモニアを原料として，アミノニトリルを経て安価に合成可能なラセミ体アミノ酸アミドにD-立体選択的アミド加水分解酵素を作用させる方法の開発を試みた.[2]

酵素の発見とその特徴　地球上の生物の体のタンパク質はすべてL-アミノ酸から構成されているとはいえ，微生物の細胞壁ペプチドグリカンやペプチド系抗生物質等にはD-アミノ酸も少なからず含まれており，その分解代謝系酵素の存在が予想された．微生物を主な対象とするスクリーニングによりD-立体選択的アミダーゼおよびペプチダーゼ生産菌の探索を行い，以下に述べる3種類のD-立体選択的加水分解酵素を発見した．すなわち，D-アラニンアミドを単一窒素源とした集積培養により土壌細菌 *Ochrobactrum anthropi* C1-38株を単離した．本菌株はアラニンのように側鎖が立体的にかさの小さいアミノ酸のアミド，エステルおよびそれらをN-末端にもつペプチドをD-立体選択的に加水分解する新規酵素，D-アミノペプチダーゼを生産した.[3] 一方，D-バリンアミドを主な窒素源とした長期にわたる馴養培養により分離した *O. anthropi* SV3株が生産する酵素はフェニルアラニンやチロシンなどのかさ高い側鎖をもつアミノ酸のアミドをD-立体選択的に加水分解した．上記D-アミノペプチダーゼと異なり，ペプチド基質にはまったく作用しないことから，D-アミノ酸アミダーゼと呼ぶべき酵素であった.[4] さらに，D-フェニルアラニンからなるテトラペプチド，$(D\text{-}Phe)_4$ を含む培地で集積培養を行い，水に不溶性の $(D\text{-}Phe)_4$ の分解によるハロー形成を指標として *Bacillus cereus* DF4-B株を選択した．本菌株が培養液中に分泌するアルカリD-ペプチダーゼはアルカリ側に反応の最適pHを持ち，D-フェニルアラニンなどのかさ高い側鎖を持つD-アミノ酸を含むペプチドのN-末端から2番目のアミノ酸のD-体を認識して，ジペプチド単位で切り出す活性を有するエンドペプチダーゼであった.[5]

我々が発見したこれら3種類のD-立体選択的加水分解酵素をコードする遺伝子解析の結果，そ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カルボキシペプチダーゼDDやβ-ラクタム抗生物質の耐性に関わるβ-ラクタマーゼと相同性を示し，ペニシリン認識酵素ファミリーに属すると考えられた.[6,7] 実際，D-アミノペプチダーゼはβ-ラクタム化合物により酵素活性が阻害され，一方，アルカリD-ペプチダーゼはアンピシリンやペニシリンGに対してβ-ラクタマーゼ活性をも有していた．さらに，D-アミノペプチダーゼに関しては，X-線結晶構造解析も進み，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ている.[8]

D-アミノ酸類合成への応用　上記3種類のD-立体選択的加水分解酵素のうち，アミノ酸アミダーゼ活性を有するD-アミノペプチダーゼとD-アミノ酸アミダーゼはラセミ体アミノ酸アミドからのD-アミノ酸の選択的合成に利用可能である．それぞれの酵素を高度に発現させた組換え大腸菌の洗浄菌体を濃縮することなく，培養液と同じ菌体濃度とし，ラセミ体アミノ酸アミドからの

*著者紹介（代表） 富山県立大学工学部生物工学研究センター（助手） 〒939-0398 富山県射水郡小杉町黒河5180
TEL. 0766-56-7500 FAX. 0766-56-2498 E-mail: hkomeda@pu-toyama.ac.jp

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

D-アミノ酸合成を検討した．なお，未反応のL-アミノ酸アミドは化学的なラセミ化により，基質として繰り返し反応に用いることができる．D-アミノペプチダーゼを用いてD-アラニンを合成する場合，本酵素はアラニンアミドに対する耐性が非常に高いため，高濃度の基質を分割フィードせず，一度に反応液に加えることができた．5 Mの基質を加えた場合でも約4.5時間という短時間で定量的なD-立体選択的加水分解が起こり，2.5 M（約220 g/*l*）のD-アラニンが生成した．同様にD-α-アミノ酪酸，D-メチオニン，D-ノルバリン，D-ノルロイシンが対応するラセミ体アミノ酸アミドから高い立体選択性で合成可能であった.[9] 一方，D-アミノ酸アミダーゼを発現させた組換え大腸菌菌体を用いて，フェニルアラニンアミドからのD-フェニルアラニンの選択的合成を検討する際には，酵素遺伝子へのランダム変異導入による進化分子工学的な酵素の改変が有効であった．野生型酵素を発現させた大腸菌菌体を1 Mのラセミ体フェニルアラニンアミドに作用させた場合，反応が途中までしか進まず，D-体の収率は60%程度にとどまった．この原因として酵素の安定性に問題があると考え，error-prone PCRによりD-アミノ酸アミダーゼ遺伝子にランダム変異を導入したライブラリーから，酵素の耐熱性を指標としてスクリーニングを行った．その結果，2残基のアミノ酸置換（K278M, E303V）により耐熱性が向上した変異酵素BFB40を得ることができた．BFB40酵素を単一に精製し，その特徴を調べたところ，興味深いことにこの変異酵素は耐熱性が5°C向上するとともに，比活性が2倍以上に上昇していた（図1-A）．そして，BFB40酵素を高度に発現させた大腸菌菌体を用いたラセミ体フェニルアラニンアミドのD-立体選択的加水分解により，ほぼ定量的なD-フェニルアラニン（光学純度99.7%ee以上）の合成が可能となった（図1-B）.[10]

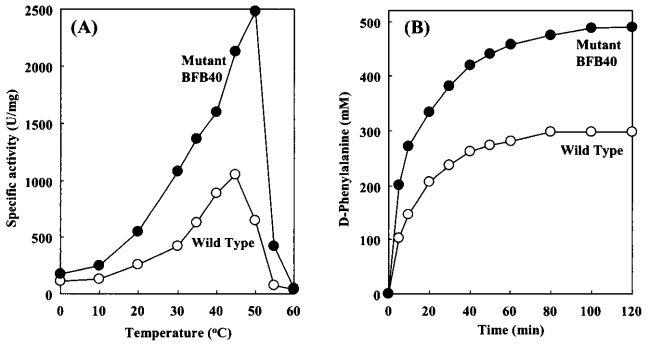


図1．野生型および変異型D-アミノ酸アミダーゼの反応最適温度（A）と両酵素を発現させた組換え大腸菌菌体によるラセミ体フェニルアラニンアミド（1 M）からのD-フェニルアラニンの選択的合成（B）

ペプチダーゼ活性を有するD-アミノペプチダーゼやアルカリD-ペプチダーゼを用いてD-アミノ酸アルキルアミドやD-アミノ酸オリゴペプチドの合成を検討した．両酵素は酵素化学的検討および一次構造解析からいずれも活性中心にセリン残基を持つことが明らかとなっている．したがって，エステルやアミドを基質とする加水分解反応においては，酵素のセリン残基のヒドロキシル基による基質のカルボニル炭素の求核攻撃によってアシル酵素中間体が生成すると予想される．これが加水分解されればD-アミノ酸が生成するが，一方，水より求核性が高いアミノ基が攻撃すればペプチド結合が生成する．キモトリプシンやサチライシンを用いてD-アミノ酸含有ペプチドを合成した例があるが，本来がL-立体選択的な酵素を用いているため，選択性や反応速度が低いという欠点があった．そこで，まずD-アミノペプチダーゼを用いたD-アラニン-*N*-アルキルアミドの合成を検討した．水飽和の酢酸ブチルなどの有機溶媒中にウレタン系ポリマーで固定化したD-アミノペプチダーゼを触媒として加え，ラセミ体アラニンメチルエステルとアルキルアミンの縮合反応を行うと，酵素はD-アラニンアルキルアミドのみを定量的に与えた.[11] この方法はD-アミノ酸のアミノ基の保護を必要とせず，従来の化学合成法では不可能な高選択性を達成している．同じ固定化D-アミノペプチダーゼを用いてトルエン中でD-アラニンメチルエステルより57%および6%の収率でD-アラニンダイマーおよびトリマーが合成できた.[12] また，もうひとつのD-立体選択的ペプチダーゼであるアルカリD-ペプチダーゼはD-フェニルアラニンメチルエステルからのD-フェニルアラニンのダイマー，$(D\text{-}Phe)_2$およびトリマー，$(D\text{-}Phe)_3$へのポリマー化に利用可能であった．本酵素は本来$(D\text{-}Phe)_3$や$(D\text{-}Phe)_4$に最もよく作用して，$(D\text{-}Phe)_2$やモノマーに加水分解する酵素であるが，D-フェニルアラニンメチルエステルを基質とした場合，水中の反応においても$(D\text{-}Phe)_2$の生成が認められた．そこで，組換え大腸菌より単一に精製したアルカリD-ペプチダーゼを用いてポリマー化のための種々の反応条件を検討した．バッファーおよびpHを検討したところ，トリエチルアミン-HClのpH 11.5の条件で最も高い収率を与え，$(D\text{-}Phe)_2$が25%，$(D\text{-}Phe)_3$が9%の収率で合成が可能となった.[13]

立体選択的 *tert*-ブチルアミド加水分解酵素

現在までに多種多様な立体選択的アミダーゼが微生物

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

より単離され，ラセミ体アミド化合物の立体選択的加水分解による光学活性カルボン酸類合成への可能性が示されている．我々が発見した上記のD-立体選択的アミノ酸アミド加水分解酵素の他にもL-アミノ酸合成に応用できるL-立体選択的アミノ酸アミダーゼや光学活性な2-フェニルプロピオン酸類の合成に応用可能な*S*-選択的アミダーゼおよび*R*-選択的アミダーゼなどの報告例がある．このようにさまざまな基質特異性をもったアミダーゼが多数報告されているが，いずれも単純なアミドを加水分解するものばかりであり，*tert*-ブチルアミドのように立体的にかさ高い離脱基を持つアミド化合物に作用するアミダーゼの報告はなかった．したがって，このような基質を効率よくしかも立体選択的に加水分解する酵素は従来知られていない新規なアミダーゼである可能性があり，アミダーゼの応用範囲をより複雑な化合物の合成へと拡張することにもつながると考えられる．光学活性なピペラジン-2-カルボン酸やその*tert*-ブチルアミド誘導体が医薬品の合成中間体として有用であったことから，筆者らはピペラジン-2-*tert*-ブチルカルボキサミドの分解性を指標としたスクリーニングを行い，互いに立体選択性が異なる2種類のアミダーゼをいずれも*Pseudomonas*属細菌に見いだした（図2）．

酵素の特徴　*Pseudomonas* sp. MCI3434株により生産され，ラセミ体ピペラジン-2-*tert*-ブチルカルボキサミドに対して*R*-立体選択的に作用する酵素をR-アミダーゼと名付けた.[15] 本酵素は分子量が約30,000のモノマー酵素であり，チオール試薬や重金属イオン存在下で活性が完全に阻害されたことから活性中心はシステイン残基であると考えられた．その一次構造はCN結合加水分解酵素ファミリーに属するタンパク質の配列と相同性を示した．このファミリーはニトリラーゼスーパーファミリーとも呼ばれ，ニトリルを直接カルボン酸とアンモニアに分解するニトリラーゼ，短鎖アシルアミドに作用するアリファティックアミダーゼ，ピリミジン代謝に関わる*β*-ウレイドプロピオナーゼなどが属している．R-アミダーゼの基質特異性を各種の脂肪族アミド，芳香族アミド，アミノ酸アミド，ペプチド，ニトリルを用いて調べたところ，本酵素が作用する基質は表1に示す7種類のアミド化合物のみであり，特に*β*-アラニンアミドやピペラジン-2-カルボキサミド（*R*-選択的）によく作用した．また，基質となったグルタミンアミドの両異性体はカルボキサミドを分子内に2個持つが，R-アミダーゼは側鎖のアミドにのみ作用し，酵素反応生成物はいずれもグルタミン酸アミドであった．これらの基質の構造をみると，本酵素はカルボキサミドが結合した炭素を*α*-位とすると，*β*-位あるいは*γ*-位の炭素に窒素官能基が結合した基質にのみ作用する非常にユニークな基質特異性を持つことが判明した（表1）．

一方，*Pseudomonas azotoformans* IAM 1603株にピペラジン-2-*tert*-ブチルカルボキサミドを*S*-立体選択的に加水分解する酵素活性を見いだした.[16] 本酵素は分子量が約35,000のモノマー酵素であり，その一次構造は乳酸菌などでの報告例が多いプロリンイミノペプチダーゼと相同性を示した．プロリンイミノペプチダーゼとはプロリン残基をN-末端に持つペプチドに特異的に作用してN-末端プロリンを切り出す反応を触媒するエキソペプチダーゼであり，セリン残基を活性中心としてもつ．本酵素の基質特異性を調べたところ，L-プロリンアミドやその同族体の（*S*)-ピペリジン-2-カルボキサミドおよびL-アラニンアミドが良好な基質となった．ピペラジン-2-*tert*-ブチルカルボキサミドに対する活性はL-プロリンアミド

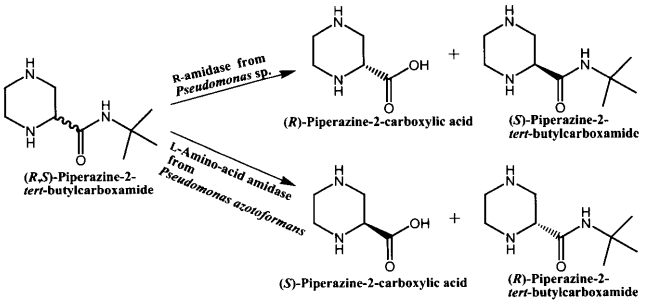
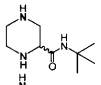
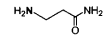
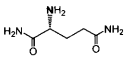
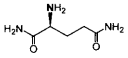


図2．R-アミダーゼおよびL-アミノ酸アミダーゼによるラセミ体ピペラジン-2-*tert*-ブチルカルボキサミドの立体選択的加水分解

表1．R-アミダーゼの基質特異性

		Relative activity (%)
(*R*,*S*)-Piperazine-2-*tert*-butylcarboxamide		9.0
(*R*,*S*)-Piperazine-2-carboxamide		100
(*R*,*S*)-Piperidine-3-carboxamide (Nipecotamide)		68.9
Piperidine-4-carboxamide (Isonipecotamide)		0.23
β-Alaninamide		108
D-Glutaminamide		27.0
L-Glutaminamide		0.35

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

の場合のわずか0.2%であった．本酵素はプロリンイミノペプチダーゼと共通の祖先タンパク質に由来すると考えられたが，L-プロリンをN-末端にもつペプチドを含む各種ペプチド基質に対しては加水分解活性を示さなかった．さらにD-アミノ酸アミドにも作用しなかったことから，本酵素はL-アミノ酸アミダーゼと呼ぶべき酵素であることが判明した．現在までにオランダDSMの研究グループが *Pseudomonas putida*，*O. anthropi*，および *Mycobacterium neoaurum* 由来のL-アミノ酸アミダーゼを用いてラセミ体アミノ酸アミドからのL-アミノ酸合成を検討しているが，[1] いずれもその一次構造は未だに報告されていない．すなわち，我々の酵素はL-アミノ酸アミダーゼとして一次構造を明らかにした最初の例といえる．

***tert*-ブチルアミドの立体選択的加水分解**　それぞれの立体選択的アミダーゼ遺伝子を導入した組換え大腸菌菌体を用いてラセミ体ピペラジン-2-*tert*-ブチルカルボキサミドからの高立体選択的な加水分解が可能であった．R-アミダーゼの場合は99.5%eeの（*R*）-ピペラジン-2-カルボン酸が，そして，L-アミノ酸アミダーゼの場合は95.0%eeの（*S*）-ピペラジン-2-カルボン酸が生成しており，従来，酵素による加水分解としては難分解とされていた *tert*-ブチルアミド基質を効率良く，しかも立体選択的に加水分解することが可能となった．一方，R-アミダーゼを発現させた大腸菌菌体を用いて単純なカルボキサミドであるラセミ体ピペラジン-2-カルボキサミドを基質として同様の反応を行ったところ，生成した（*R*）-ピペラジン-2-カルボン酸の光学純度は著しく低く，86%eeであった．[17] この光学純度の低下の原因となった（*S*）-ピペラジン-2-カルボン酸生成活性に対する大腸菌本来がもつアミド加水分解活性の寄与は小さく，むしろR-アミダーゼの立体選択性が本基質に対して低いことが原因であることが判明した．すなわち，基質の *tert*-ブチルアミド基の立体的なかさ高さがR-アミダーゼの厳密な立体選択性の重要なファクターであると考えられる．

今回紹介した立体選択的アミド加水分解酵素は微生物酵素を有用物質合成へ応用することを目的としたスクリーニングにより見いだされた新規な酵素であった．これらのいずれもユニークな特徴をもった酵素が本来微生物細胞内でどのような生理的役割を果たしているかは興味深い問題である．現在までに100種類以上もの微生物のゲノム全配列が決定されているが，その中には筆者らが発見した酵素遺伝子と高い相同性を有する配列が多数認められており，微生物界におけるその重要性を改めて予想させる．たとえば，最近決定された *Bacillus cereus* と *Bacillus anthracis* の全ゲノム配列内にはアルカリD-ペプチダーゼと80%以上の相同性を示すタンパク質をコードする遺伝子が共に複数コピー存在しており，*P. putida* や *Pseudomonas aeruginosa* のゲノム内にはR-アミダーゼと60%以上の相同性を有する配列が認められている．一方，その存在意義が明確な酵素の報告例もある．シアノバクテリアが生産する毒素のミクロシスチンはD-アミノ酸を含有する環状ペプチドであるが，*Sphingomonas* 属細菌がもつミクロシスチン分解酵素群には，筆者らが発見した3種類の酵素と同様にペニシリン認識酵素ファミリーに属するD-立体選択的加水分解酵素が含まれ，ペプチド鎖中のD-Ala-L-Leu間の加水分解に関与していることが解明されている．[18] 今後もこのような新規な立体選択的ペプチダーゼやアミダーゼが発見されることが予想され，有用物質合成への応用も期待できると考えている．

文　献

1) Collins, A. N. *et al.*: *Chirality in Industry*, Wiley (1992).
2) Asano, Y and Lübbehüsen, T. L.: *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 295 (2000).
3) Asano, Y. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **264**, 14233 (1989).
4) Asano, Y. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **162**, 470 (1989).
5) Asano, Y. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **271**, 30256 (1996).
6) Asano, Y. *et al.*: *Biochemistry*, **31**, 2316 (1992).
7) Komeda, H. and Asano, Y.: *Eur. J. Biochem.*, **267**, 2028 (2000).
8) Bompard-Gilles, C. *et al.*: *Structure*, **8**, 971 (2000).
9) Asano, Y. *et al.*: *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **110**, 206 (1991).
10) Komeda, H. *et al.*: *J. Molec. Catal. B: Enzymatic*, **21**, 283 (2003).
11) Kato, Y. *et al.*: *Tetrahedron*, **45**, 5743 (1989).
12) Kato, Y. *et al.*: *Biocatalysis*, **3**, 207 (1990).
13) Komeda, H. and Asano, Y.: *J. Molec. Catal. B: Enzymatic*, **6**, 379 (1999).
15) Komeda, H. *et al.*: *Eur. J. Biochem.*, **271**, 1580 (2004).
16) Komeda, H. *et al.*: *Eur. J. Biochem.*, **271**, 1465 (2004).
17) 米田英伸ら：日本農芸化学会大会講演要旨集，p. 111 (2003).
18) Bourne, D. G. *et al.*: *Environ. Toxicol.*, **16**, 523 (2001).

NII-Electronic Library Service