

Studies on creation and application of a thermostable NADP⁺ - dependent D - amino acid dehydrogenase

秋田, 紘長

<https://hdl.handle.net/2324/1441308>

出版情報：九州大学, 2013, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏 名 : 秋田 紘長

論文題目 : Studies on creation and application of a thermostable NADP⁺-dependent D-amino acid dehydrogenase
(耐熱性 D-アミノ酸脱水素酵素の創製と応用に関する研究)

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

従来生物に含まれるアミノ酸は L-アミノ酸のみであると考えられ、光学異性体の D-アミノ酸はあまり重要な生理機能を持たないと考えられてきた。しかし、近年の分析技術の進歩により、生体における D-アミノ酸の存在と機能が次々に明らかになってきた。それに伴い、D-アミノ酸の医薬品や機能性食品などへの利用拡大が予想され、効率的な D-アミノ酸合成法の開発が求められている。現在までに数種の D-アミノ酸酵素合成法が確立され、産業利用されているものの、これらの方法では、用いられる酵素の安定性が低いため生産効率が悪い。その中で、NADP⁺依存性 *meso*-ジアミノピメリン酸脱水素酵素 (*meso*-DAPDH) からタンパク質工学的に創製した D-アミノ酸脱水素酵素 (DAADH) を利用する D-アミノ酸の不斉合成法は、酵素の低い安定性ゆえに未だ実用化されていない。本研究は、安定性に優れた DAADH をタンパク質工学的に創製し、その酵素を利用した D-アミノ酸と安定同位体標識 D-アミノ酸の新規合成法を開発したものである。

本論文では、まず、安定性の高い *meso*-DAPDH 生産菌の探索を行うため、微生物保存機関から入手した好熱菌に加え、火山の熱水噴出物、温泉泥、堆肥などから単離した好熱菌を対象に広く *meso*-DAPDH 活性の検索を行っている。その結果、堆肥より単離した好熱菌 *Ureibacillus thermosphaericus* に既報の *meso*-DAPDH に比し安定性が格段に高い耐熱性酵素を発見し、その酵素化学的性質を解明すると共に、本酵素をコードする遺伝子の塩基配列を決定している。

次に、既報の DAADH 変異体作製法をもとに変異酵素を創製し、それは野生型酵素がもつ DAPDH 活性を示さず、新たに DAADH 活性を示すことを明らかにしている。さらに、本変異酵素は、野生型酵素に認められない NADPH 依存的アミノ化反応による 2-オキシ酸からの D-アミノ酸の合成反応を触媒し、野生型酵素と同様に高い安定性を有することを明らかにしている。

また、耐熱性 DAADH の応用として、本酵素を用いた D-アミノ酸合成法と酵素定量法を開発を進めている。酵素合成法では、DAADH による D-アミノ酸の合成反応、及びグルコース脱水素酵素による NADPH の再生反応から成る共役反応による D-イソロイシンの生産法を確立している。さらに本法を最適化後、¹³C と ¹⁵N で二重標識された D-ロイシンを含む 4 種の安定同位体標識 D-分岐鎖アミノ酸の高収率な新規酵素合成法を確立している。一方、酵素定量法では、DAADH による NADPH 生成反応と、NADPH を介した水溶性テトラゾリウム塩の発色反応からなるシステムを構築し、本酵素定量法により、異性体存在下でも D-イソロイシン異性体のみを高感度に検出する分光分析法を開発している。

さらに、DAPDH、NADP⁺/DAPDH 複合体及び NADP⁺/DAADH 複合体の X 線結晶構造解析を行い、活性や耐熱化に関わる構造を詳細に解析している。構造解析の結果をもとに、NADP⁺/DAADH と常温菌由来の *meso*-ジアミノピメリン酸 (*meso*-DAP)/DAPDH の基質認識部位を比較し、DAADH が DAPDH 活性を消失した理由として、*meso*-DAP の L-型の立体配置を示すアミノ酸への相互作用の低下が主因であることを明らかにしている。また、構造解析から *U. thermosphaericus* 由来 DAPDH が分子内の疎水性相互作用の増大により耐熱化されている分子機構を示唆している。

以上要するに本論文は、D-アミノ酸の酵素生産法の開発とそれに伴う新たな医薬品や機能性食品開発に貢献するものであり、微生物遺伝子工学の発展に寄与する価値ある業績である。

よって本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有するものと認める。