

皮膚バリア機能を促進する D-アミノ酸の酵素合成法の開発

日本大学生産工学部教養基礎科学系

秋田 紘長

D-Alanine and D-aspartic acid are useful cosmetic ingredients because those D-amino acids have a skin barrier function. In this study, to develop an efficient system for enantioselective synthesis of D-alanine and D-aspartic acid through the amination of the 2-oxo acids, NAD (P)⁺-dependent *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from *Thermosyntropha lipolytica* (TIDAPDH) was coupled with NADPH regeneration using NAD (P)⁺-dependent glucose dehydrogenase. Using this method, pyruvic acid was converted to D-alanine with an excellent yield (>98.5%). However, this method was not suitable for the synthesis of D-aspartic acid. To obtain the enzyme available for the synthesis of D-aspartic acid, TIDAPDH was used as a reference sequence in the database screening, and *meso*-diaminopimelate dehydrogenases from *Bacillus thermozeamaiae* (BtDAPDH), *Candidatus Syntrophocurvum alkaliphilum* (CsaDAPDH) and *Novibacillus thermophilus* (NtDAPDH) were identified. Among the enzymes, BtDAPDH and CsaDAPDH showed the productivities for D-alanine and D-aspartic acid, which are higher than those of TIDAPDH.

1. 緒言

標準アミノ酸には不斉炭素が存在するため、D-アミノ酸とL-アミノ酸の光学異性体が存在する。L-アミノ酸は生体内で様々な生理機能を持つものに対し、D-アミノ酸は細胞内には存在しないと考えられてきた。しかし、近年の分析技術の発展により、ヒトを含めた高等生物の細胞内にD-アミノ酸が微量に存在し、重要な生理機能を持つことが解明され始めている。例えば、D-アラニンとD-アスパラギン酸は皮膚バリア機能を有することが解明されており、皮膚に塗布した場合、コラーゲン繊維束の形成が促進されて、保湿性が高まる¹⁾。これにより、D-アラニンとD-アスパラギン酸は2013年から化粧品の機能性成分として利用されている。

化粧品の機能性成分としてD-アミノ酸の需要が急速に高まる一方で、最も安価なD-アミノ酸であるD-アラニンが18万円/kgで販売されているように、D-アミノ酸は非常に高価なため利用は限られている。D-アミノ酸の主な合成法は、酵素合成法と化学合成法に大別される。化学合成法と比較して、酵素合成法は合成に必要なエネルギーと副産物の副生を抑えられるため、数種の方法が工業化されている。但し、既存の酵素合成法では原料 (DL-アミノ酸前駆体) の化学合成が必須であり、合成工程が複雑なため、合成コストが高い (図1)。そこで本研究では、一段

階反応 (2-オキソ酸のアミノ化) でD-アミノ酸を合成可能なNAD (P)⁺依存性 *meso*-ジアミノピメリン酸脱水素酵素 (*meso*-DAPDH) を利用して、皮膚バリア機能を促進するD-アラニンとD-アスパラギン酸を合成可能な新規酵素合成法の開発を目指した。

2. 方法

2.1. 発現ベクターの作製

合成遺伝子と発現ベクター [pET-IK (バイオダイナミクス研究所製) または pET-21a (メルク製)] を所定の制限酵素で処理し、電気泳動に供した。電気泳動後、目的鎖長のバンドを切り出し、illustra bacteria genomicPrep Mini Spin Kit (プロメガ製) を用いて精製した。DNA Ligation Kit (タカラバイオ製) を用いて精製産物をライゲーションし、得られたライゲーション産物を用いて大腸菌 DH5α を形質転換した。最終的には、形質転換体を対象としたコロニー PCR により酵素遺伝子が導入された発現ベクターを選定し、PlasmidMini Kit (FastGene 製) を用いて発現ベクターを取得した。

2.2. 酵素の発現および精製

発現ベクターを用いて大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換した。次に、形質転換体を LB 培地に加え、OD₆₀₀ が 0.6 に達するまで振盪培養した。さらに、OD₆₀₀ が 0.6 に達した培養液にイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (Wako 製) を終濃度が 1 mM になるように加え、さらに 6 時間振盪培養した。

遠心分離により培養菌体を回収後、マルチビーズを用いて破碎した。菌体破碎液を遠心分離し、得られた上清を粗酵素液とした。熱処理 (50℃、30 分間) 後の粗酵素液を遠心分離し、得られた上清を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) で平衡化した DEAE-TOYOPEARL カラムクロマトグラ



Development of an enzymatic synthesis method for D-amino acids that promote skin barrier function

Hironaga Akita

Department of Liberal Arts and Basic Science, Nihon University

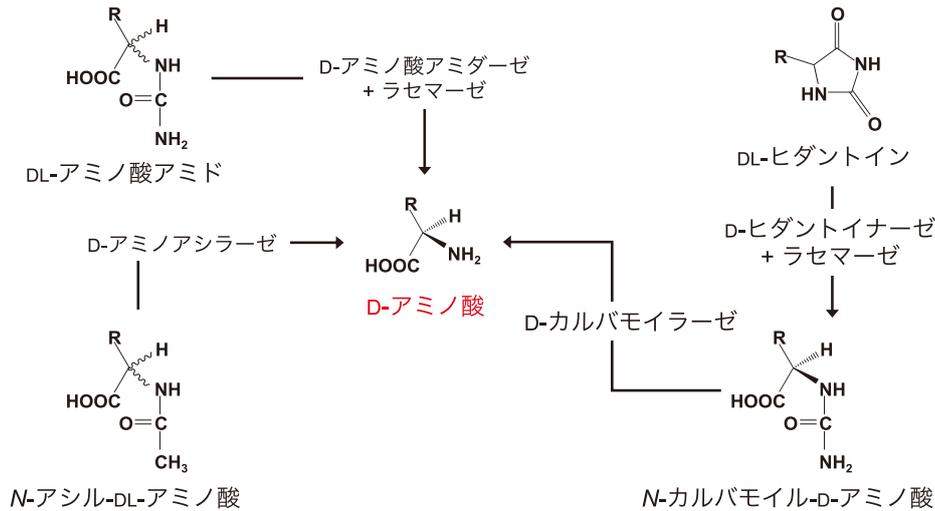


図1 既存のD-アミノ酸酵素合成法

フィー（東ソー製）に供した。その後、カラムベット容量の3倍量の同緩衝液で洗浄後、NaClを含む同緩衝液を用いて、直線濃度勾配法（0-0.5M）により活性画分を溶出した。さらに、Ni-NTA アフィニティカラムクロマトグラフィー（GEヘルスケア製）を用いて、先行研究³⁾と同様の方法で活性画分を取得し、10mMリン酸緩衝液（pH7.2）を用いて一晚透析した。最終的に、Amicon Ultra（メルク製）を用いて透析液を濃縮し、得られた濃縮液を精製酵素として以降の実験に利用した。

2.3. D-アミノ酸の酵素合成

D-アミノ酸の酵素合成は、攪拌子を含むバイアル瓶（容量：10mL）を用いて実施した。反応溶液 [100mM グリシン-KOH (pH9.0)、100mM 塩化アンモニウム (pH9.0)、70mM グルコース、20mM 2-オキソ酸、0.5mM NADP⁺] に精製したTIDAPDHと補酵素のカップリング反応担うNAD(P)⁺依存性グルコース脱水素酵素 (GDH)²⁾を加え、緩やかに攪拌しながら50℃で保温した。D-アミノ酸濃度は、先行研究²⁾と同様の方法で測定した。

2.4. D-アミノ酸合成活性の測定

D-アミノ酸の合成活性は、紫外可視分光光度計UV1800（島津製作所製）を用いて、2-オキソ酸のアミノ化による吸光度（Δ340）の減少量から算出した。反応溶液 [200mM グリシン-KOH (pH9.0)、200mM 塩化アンモニウム (pH9.0)、5mM 2-オキソ酸、精製酵素] を光路長1cmの石英セルに加えて50℃で3分間保温後、NADPHを終濃度が0.1mMになるように添加し、ΔA340を測定した。NADPHのミリモル吸光係数は、6.22mM⁻¹・cm⁻¹とした。

タンパク質濃度は、Protein Assay kit (Bio Rad製) を用いて、Bradford法により測定した。

3. 結果および考察

3.1. D-アラニンとD-アスパラギン酸の酵素合成

本研究の鍵となる *meso*-DAPDHは、補酵素を利用して、基質である *meso*-ジアミノピメリン酸のD-アミノ酸部位の脱アミノ反応を可逆的に触媒する自然界唯一の酵素である（図2）。但し、既報の酵素の補酵素・基質特異性は高く、その利用はNADP⁺と *meso*-ジアミノピメリン酸（アミノ化反応ではNADPHとL-2-アミノ-6-オキソピメリン酸）に限られていた。但し、*Thermosyntropha lipolytica* 由来

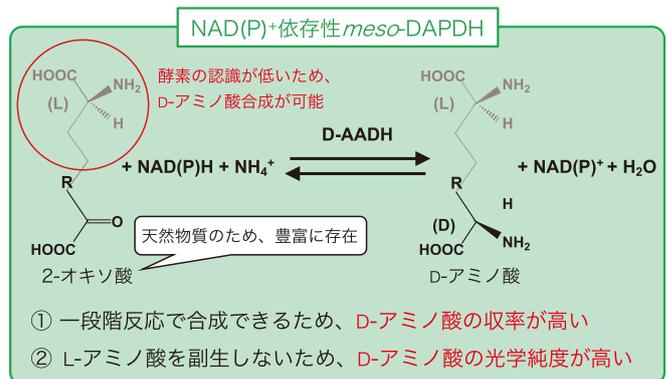
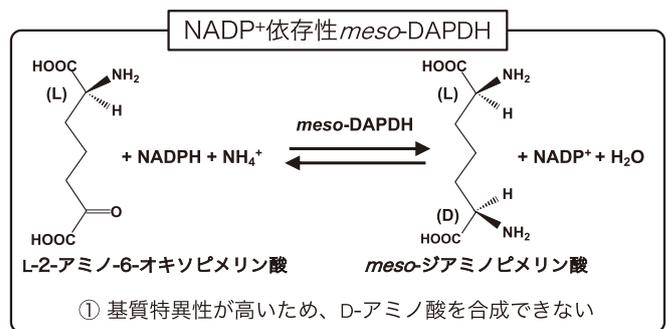


図2 *meso*-DAPDHの触媒反応

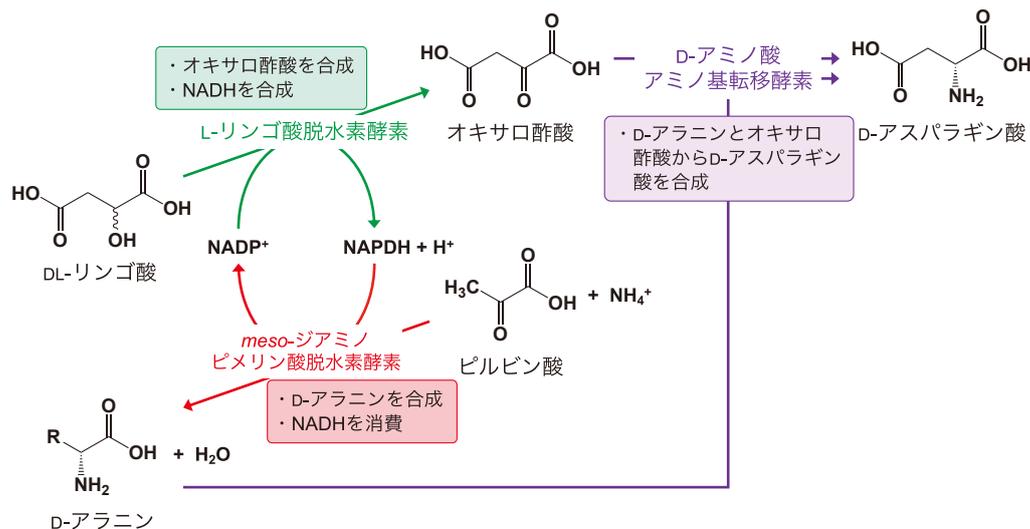


図3 申請当初のD-アミノ酸酵素合成法

meso-DAPDH (TIDAPDH) を含む一部の酵素は、 NADP^+ と NAD^+ の両補酵素を利用可能な NAD(P)^+ 依存性酵素である。また、一段階反応 (2-オキソ酸のアミノ化) でD-アラニンとD-アスパラギン酸を合成できる。そこで本研究では、TIDAPDHを酵素合成法に利用した。本研究を申請した当初、TIDAPDHと NADP^+ 依存性L-リンゴ酸脱水素酵素、D-アミノ酸アミノ基転移酵素 (D-アスパラギン酸合成時のみ) を利用して、D-アラニンとD-アスパラギン酸を合成可能な酵素合成法を開発することを計画としていた (図3)。本法を開発するため、酵素量比や反応温度・pH、補酵素濃度等を検討したが、D-アラニンとD-アスパラギン酸を合成することができなかった。そこで、D-アミノ酸合成法の抜本的な見直しを図り、補酵素の再生を担う NADP^+ 依存性GDH利用した酵素合成法の開発に切り替えた²⁾。

ピルビン酸を基質に利用した場合、36時間後のD-アラニン濃度は19.7mMに達し、対原料収率は98.5%以上だった (図4)。D-アラニンを合成可能な酵素として、アラニンラセマーゼが知られているが、本酵素はL-アラニンからD-アラニンの変換反応を可逆的に触媒し、合成後にはおよそ等量のD-アラニンとL-アラニンが得られる。そのため、本酵素を酵素合成法に利用した場合、D-アラニンの光学純度が低くなる。一方、TIDAPDHは、D-アラニンを合成する際に、L-アラニンを副生しない。また高い対原料収率で合成可能なことから、産業利用上の可能性を有する。

一方、オキサロ酢酸を基質に利用した場合、D-アスパラギン酸濃度は1mM以下となった。現時点でD-アスパラギン酸が合成できなかった理由は不明だが、TIDAPDHやカップリング反応に利用した NAD(P)^+ 依存性GDHが、D-アスパラギン酸やオキサロ酢酸により阻害を受けた可

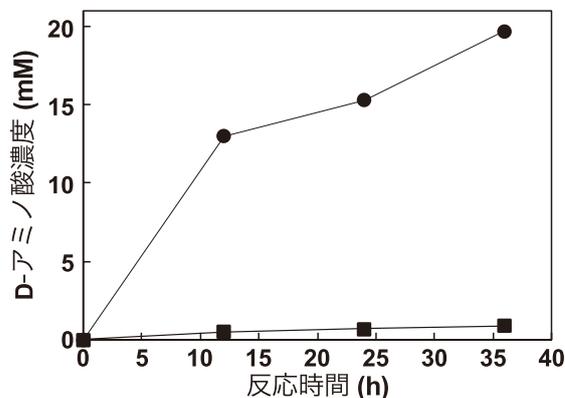


図4 D-アラニン (●)とD-アスパラギン酸 (■) 合成の経時変化

能性がある。

3.2. 新規 *meso*-DAPDHのスクリーニング

上述のとおり、TIDAPDHを利用した場合、D-アスパラギン酸の合成量は著しく低下した。そこで、D-アスパラギン酸の合成に利用可能な酵素を新たに取得するため、アミノ酸配列に基づいたスクリーニングを実施した。

Gaoらによると、*meso*-DAPDHは、構造的特徴と基質特異性に基づいて、2つの主要なクラスターに分類できる⁴⁾。タイプIの*meso*-DAPDHは二量体構造を有し、*meso*-ジアミノピルビン酸に対して高い特異性を示す。例えば、好熱性細菌 *Ureibacillus thermosphaericus* 由来 *meso*-DAPDH (UtDAPDH) はタイプIの酵素に分類され、可逆的な*meso*-ジアミノピルビン酸の脱アミノ反応を触媒するが、D-アミノ酸は基質として利用できない⁵⁾。

対照的に、タイプIIの*meso*-DAPDHは六量体構造を有し、低い基質特異性を示す。例えば、酵素合成に利用したTIDAPDHはタイプIIの酵素に分類され、*meso*-ジアミノピルビン酸以外に、種々のD-アミノ酸に対し

```

UtDAPDH  -----MSKIRIGIVGYGNLGRGVEAAIQNPDMELVAVFTRRDPKTVAVKSNVKVLHVD
BtDAPDH  MSEIRTERPIRVAIIGYGNIGQYALQAVEEAPDMELAGVVRQSSLEKPLPRELHGVSVV
CsaDAPDH -----MSKTKVAIVGYGNIGKFAVDINEAPDMELVGVVRASSLSQPKPSELADIPVV
NtDAPDH  -----MKNVHKIAVVGYNIGKYAVQALNRAPDMELAGVVR-ARSARDVPPELAGVPIA
          :::::*****:*: . *::: *****..* . *          :: : :

UtDAPDH  DAQSYKDEIDVMILCGGSATDLPEQGPYFAQYFNTIDSFDTHARIPDYFDAVNAAAEQSG
BtDAPDH  SDVSALGQVDVAVLCTPTRETPAIKELLARGIHTIDSFDIHQEIQVRHELDEVARAHQ
CsaDAPDH ASIKELPDVKIALLLCTPTRSVPEYASEILSLGINTVDSYDIHGDLADMKIDLDKIAKQHK
NtDAPDH  TSIDELEGVEAAILATPTRTTPEYASDILSKGIHTVDSYDIHGELADVRRKLDDIAKRHG
          . :. :* . :          :: :*:**:* * : : :*: *.

UtDAPDH  KVAIISVGWDPGLFSLNRLLEVVLPVGNTYTFWGKGVSQGHSDAIRRIQGVKNAVQYTI
BtDAPDH  AVAILAAGWDPGTDSMIRSILEFMAPYGITYTNFGPGMSMGHSAVKAIEGVKDALSITI
CsaDAPDH SVAVISAGWDPGTDAMLRCIFEMAPKGITYTNFGPGMSMGHSAVRSKDGIKNALSMTI
NtDAPDH  SVAIVSAGWDPGTDSMIRSMLEFMAPGGVYTNFGPGMSMGHSAVKAIDGVKDALSMTI
          **:::..***** : : * : * : * * ** :* *:* *** *:: :*:**:*.. **

UtDAPDH  PIDEAVNRVRSGENPELSTREKHARECFVLEEGADPAKVEHEIKTMPNYFDEYDTTVHF
BtDAPDH  PIGTGL-----HRRMVYVELEEGADFATVKERILQDPYFVHDETHVLQV
CsaDAPDH PLGTSV-----HRRMVYVELEEGASFDKVEESIKTDSYFAKDETHVIQV
NtDAPDH  PLGTGV-----HRRMVYVECEAGADFETVKEKVLADPYFVNDETHVIQV
          *:. .:          * * :* * ** . *.:. : . : .: .:..

UtDAPDH  ISEEELKQNHSGMPHGGFVIRSGKSDEGHKQIIEFSLNLESNPMFTSSALVAYARAAYRL
BtDAPDH  DDVKQLIDRG----HGVRMERKGVSGQTQNQLFTYEMRIN-NPALTSQVMIASARAAMRQ
CsaDAPDH DDVDNLVDMG----HGVSMERKGVSGITQNQLLKFDMRIN-NPALTAQVMVSSARASLNQ
NtDAPDH  DDVQQLVDVG----HGVSMERKGVSGATHNQLFNFEMRIN-NPALTSQVLVAAARATFKQ
          . :.* :          ** : *.* * . :*::: :.:.:.: ** :*:..:.: :*: :

UtDAPDH  SQNGDKGAKTVFDIPFGLLSPKSPEDLRKELL
BtDAPDH  ----KPGAYTMIEIPIIDFLYGDRDELIRRLV
CsaDAPDH ----QPGAYTMIEIPIIDFMHGDKDKIIRDLV
NtDAPDH  ----QPGAYTMIEVPIIDFMYGDREELIKRLV
          . ** *:::~* : : . :. : : * :
    
```

図5 *meso*-DAPDHのアライメント
 UtDAPDHの二量体形成ドメインに含まれるアミノ酸残基を赤字で示した。

表1 補酵素にNADPHを利用した場合のD-アミノ酸合成活性の比較

基質	D-アミノ酸	TiDAPDH ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	BtDAPDH ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	CsaDAPDH ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)
ピルビン酸	D-アラニン	5.33	10.6	8.46
オキサロ酢酸	D-アスパラギン酸	5.70	13.5	12.2

でも活性を示す³⁾。また、2-オキソ酸を基質に利用した場合、D-アラニンやD-アスパラギン酸等の数種のD-アミノ酸の合成を触媒する。そこで、TIDAPDHを参照配列に用いてデータベース上で広範なスクリーニングを実施し、TIDAPDHと相同性があり、UtDAPDHの二量体形成ドメインに含まれるアミノ酸残基が保存していない、*Bacillus thermozeamaize* (BtDAPDH) と *Candidatus Syntrophocurvum alkaliphilum* (CsaDAPDH)、*Novibacillus thermophilus* (NtDAPDH) 由来の *meso*-DAPDHを選定した(図5)。

3.3. 新規 *meso*-DAPDHのD-アミノ酸合成活性

各種 *meso*-DAPDHを精製後、D-アミノ酸合成活性を測定した(表1)。アミノ酸配列に基づいて考えた場合、NtDAPDHは六量体構造を有すると推察できることから、基質特異性が低く、D-アミノ酸合成活性を示すことが期待された。しかしながら、NtDAPDHは *meso*-ジアミノピメリン酸の脱アミノ反応を示したが、D-アミノ酸合成活性は示さなかった。一方、BtDAPDHとCsaDAPDHの両酵素はD-アミノ酸合成活性を示し、TIDAPDHに比べて、D-アラニンとD-アスパラギン酸の合成活性が1.58倍以上高かった。

D-アラニンとD-アスパラギン酸の合成活性に優れることに加え、BtDAPDHとCsaDAPDHの有する安定性は産業利用する際の利点になる。BtDAPDHとCsaDAPDHは、精製時の熱処理で変性失活しなかったことから、既存のD-アミノ酸酵素合成法で利用されている常温菌由来の酵素と比べて高い安定性を持つと推察できる。即ち、両酵素を常温で利用した場合、長期利用が可能なることから、酵素の調製回数を削減でき、それにより合成コストを低下できる可能性がある。今後、BtDAPDHとCsaDAPDHが、D-アラニンとD-アスパラギン酸の酵素合成に利用できるか、継続して検討する。

4. 総括

本研究では、TIDAPDHとGDHを利用した酵素合成により、98.5%以上の高い対原料収率でD-アラニンの合成

に成功した。本研究成果を基盤に、ピルビン酸よりも安価な原料への転換や合成効率の最適化を図ることで、将来的な社会実装に繋がる可能性がある。一方、D-アスパラギン酸の酵素合成には、利用する酵素の選定等、多くの課題が残されている。今後、本研究で新たに取得したBtDAPDHとCsaDAPDHが、D-アスパラギン酸の酵素合成に利用可能か更なる検討が必要である。

謝辞

本研究の遂行にあたり、多大なるご支援を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より御礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) Du S, Sung YS, Wey M, Wang Y, Alatrash N, Berthod A, MacDonnell FM, Armstrong DW. Roles of N-methyl-D-aspartate receptors and D-amino acids in cancer cell viability. *Mol. Biol. Rep.*, 47, 6749-6758 (2020)
- 2) Akita H, Suzuki H, Doi K, Ohshima T. Efficient synthesis of D-branched-chain amino acids and their labeled compounds with stable isotopes using D-amino acid dehydrogenase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 1135-1143 (2014)
- 3) Akita H, Nakamichi Y, Morita T, Matsushika A. Characterization of an NAD(P)⁺-dependent *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from *Thermosyntropha lipolytica*. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* 1868, 140476 (2020)
- 4) Gao X, Zhang Z, Zhang Y, Li Y, Zhu H, Wang S, Li C. A newly determined member of the *meso*-diaminopimelate dehydrogenase family with a broad substrate spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, e00476-17 (2017)
- 5) Akita H, Fujino Y, Doi K, Ohshima T. Highly stable *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from an *Ureibacillus thermosphaericus* strain A1 isolated from a Japanese compost: purification, characterization and sequencing. *AMB Express* 1, 43 (2011)