

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14699

研究課題名(和文) 酵母による選択的D-アミノ酸誘導体分泌システムの構築と発酵生産への応用

研究課題名(英文) Specific secretory production system of D-amino acid derivatives by budding yeast and its application for their fermentation production

研究代表者

若山 守 (WAKAYAMA, MAMORU)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：70240455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：D-アミノ酸は、L-アミノ酸と比較するとマイナーなアミノ酸と言えるかもしれない。しかし、近年、D-アミノ酸が脳において重要な役割を担っていることが分かってきた。また、D-アミノ酸は抗生物質などの医薬品の材料としても重要である。本研究では、D-アミノ酸の簡便・安価な生産法の1つとして、出芽酵母によるD-アミノ酸誘導体の発酵生産法の可能性について検討し、発酵生産したD-アミノ酸誘導体からD-アミノ酸へ酵素的に変換できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：D-amino acids might be the presence of the shade in comparison with L-amino acids. Recently, however, it has been clarified that some D-amino acids play essential roles in the brain functions in mammals. In addition, therapeutic drugs such as antibiotics require D-amino acids as components. In this research project, potential fermentation production of D-amino acid derivatives has been investigated and its feasibility as one of the D-amino acid production methods has been evaluated. We showed the result that D-amino acid derivatives produced by fermentation method were enzymatically converted to D-amino acids.

研究分野：応用微生物学、酵素工学

キーワード：D-アミノ酸 出芽酵母 N-アセチル-D-アミノ酸 D-アミノアシラーゼ アミノ酸ラセマーゼ D-アミノアセチルトランスフェラーゼ 発酵生産

### 1. 研究開始当初の背景

D-アミノ酸は、非タンパク性アミノ酸であることから、細菌細胞壁のペプチドグリカン構成するアミノ酸としてD-アラニンとD-グルタミン酸が知られている程度で、長らく注目されることが無かった。しかし、近年の分析技術の発達により、微生物からヒトに至る高等生物において、記憶などの神経伝達機能や精巣でのホルモン合成に関わるなど、重要な生理機能を担っていることが明らかとなってきた。さらに、抗生物質を始めとする化学療法剤の構成成分としても重要性が増してきている。最近では、皮膚組織の保全機能に効果のあるD-アミノ酸も報告されるなど、D-アミノ酸含有の機能性食品も販売されている。こうした背景のもと、研究者はD-アミノ酸の生産法として、有機化学合成したDL-アミノ酸のアシル誘導体にD-体特異的なN-アシル-D-アミノ酸ヒドロラーゼを作用させることによる光学分割生産法を提唱し、基質特異性の異なる種々の酵素を見出すとともに、様々なD-アミノ酸に作用する変異酵素を多数開発してきた。しかし、現在、本酵素を用いた方法により一部のD-アミノ酸は合成されているものの、材料となるDL-アミノ酸およびその誘導体を有機化学合成する必要があり、現在L-アミノ酸生産の主流となっている「生物の代謝機能を利用したL-アミノ酸の生産」に比べてかなりのコスト高となっている。現在のL-アミノ酸の生産法に匹敵する「生物の代謝機能を利用した新たなD-アミノ酸生産法の開発」が望まれている。しかし、D-アミノ酸は非タンパク性アミノ酸であることから、細胞壁成分であるD-アラニンのような例外を除き、生物の代謝機能を利用した生産の報告はない。

### 2. 研究の目的

D-アミノ酸は、近年、次々に新規な生理作用が明らかにされて来ており、化学療法剤の成分や食品への添加剤としても利用されるなど、その重要度が増している。しかしながら、D-アミノ酸は非タンパク性アミノ酸であることから発酵生産は困難と認識されており、その生産は有機化学合成法に依存している。出芽酵母は、取り込んだD-アミノ酸をN-アセチル-D-アミノ酸へ変換した後、菌体外への分泌(排出)する能力を持つ。本研究では、代謝工学的手法を用いて、酵母に菌体内でのD-アミノ酸生産能を付与することにより、酵母によるN-アセチル-D-アミノ酸の選択的分泌生産系の構築に挑戦する。D-アミノ酸は、N-アセチル-D-アミノ酸から酵素反応により容易に生成するので、「有機化学合成に依存しないD-アミノ酸の生産法」の構築が期待できる。

### 3. 研究の方法

<平成27年度>

各種アミノ酸ラセマーゼ遺伝子とD-アミノ酸アセチルトランスフェラーゼ遺伝子高発現組換え酵母の構築とN-アセチル-D-アミノ酸の分泌生成

(1)各種アミノ酸ラセマーゼ遺伝子とD-アミノ酸アセチルトランスフェラーゼ遺伝子による出芽酵母 *S. cerevisiae* の形質転換体の作成

*P. putida* 由来低基質特異性アミノ酸ラセマーゼ遺伝子または乳酸菌 *L.*

*mesenteroides* 由来アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸に特異的なラセマーゼ遺伝子と *S. cerevisiae* 由来D-アミノ酸アセチルトランスフェラーゼ遺伝子を

pAUR123 ベクターにタンデムに乗せたプラスミドを構築し、そのプラスミドで出芽酵母 *S. cerevisiae* を形質転換した組換え酵母を作成する。

(2)形質転換体によるN-アセチル-D-アミノ酸の分泌生産の最適化と生成物分析

YPD 培地を基本培地にして、形質転換体によるN-アセチル-D-アミノ酸の分泌生産の最適な培地条件を決定する。各種金属イオン、ビタミン系添加物(CoA など)、pHなどがN-アセチル-D-アミノ酸に与える影響を調べる。また、エアレーションの影響を調べ、N-アセチル-D-アミノ酸の分泌生産に最適な通気条件を決定する。また、生成するN-アセチル-D-アミノ酸の成分分析を行い、アミノ酸ラセマーゼの種類と分泌生産されるN-アセチル-D-アミノ酸の組成との関係を明らかにする。

出芽酵母 *S. cerevisiae* のN-アセチル-D-アミノ酸輸送体タンパク質の同定

(1)ゲノム配列を基にしたアミノ酸輸送体タンパク質遺伝子破壊酵母の作出

ゲノム配列の解析から少なくとも22個のアミノ酸の輸送に関わるタンパク質遺伝子の存在が示唆されている。これら22個のアミノ酸輸送タンパク質遺伝子の破壊株を作製し、破壊株のN-アセチル-D-アミノ酸の分泌組成ならびに分泌量を比較検討することにより、これらの遺伝子のN-アセチル-D-アミノ酸分泌との関わりを明らかにする。

(2)N-アセチル-D-アミノ酸輸送体タンパク質多重遺伝子破壊酵母の作出

先の実験で得られたN-アセチル-D-アミノ酸分泌に関わる可能性が示唆されたタンパク質遺伝子の多重破壊株を構築し、N-アセチル-D-アミノ酸の分泌組成および分泌量を比較検討する。

<平成28年度>

出芽酵母 *S. cerevisiae* のN-アセチル-D-アミノ酸輸送体タンパク質の構造予測とモデル構造の構築

輸送体タンパク質は膜タンパク質であることからX-線結晶構造解析は困難である。それゆえ、モデル構造の構築とそれに基づく変異酵素の作製と機能評価が、輸送体タ

ンパク質の構造と機能の関係を調べるうえで重要となる。

(1)N-アセチル-D-アミノ酸輸送体タンパク質の構造予測とモデル構造の構築

前年度に得られた結果に基づいて、N-アセチル-D-アミノ酸の分泌に関わる可能性が強く示唆されたタンパク質の構造予測を行い、モデル構造を構築する。

(2)輸送体タンパク質の輸送基質の特異性に関わるアミノ酸残基あるいは領域の検索

他の輸送系膜タンパク質の構造と機能の知見を参考にして、輸送基質の特異性を決定するアミノ酸残基あるいは領域を予測する。

出芽酵母 *S. cerevisiae* の N-アセチル-D-アミノ酸輸送体タンパク質のモデル構造に基づく機能改変

(1)特異的な変異あるいは欠失・挿入による基質特異性変異株の作出

本研究では、輸送体タンパク質のモデル構造をもとにして輸送基質の特異性を決定するアミノ酸残基あるいは領域に特異的な変異や欠失や挿入を導入することにより、基質特異性変異輸送体タンパク質を発現した酵母を取得する。研究者らは、3次元モデル構造に基づくアミノ酸置換導入法により、N-アシル-D-アミノ酸アミドヒドロラーゼ(DAAase)の大幅な基質特異性の改変の実績を有しており、高い確度で基質特異性変異酵素を取得することが可能である。

(2)ランダム変異導入法による基質特異性変異株の作出

PCRを用いたランダム変異導入法により、輸送体タンパク質の輸送基質の特異性を決定するアミノ酸残基あるいは領域に、ランダムに非特異的な変異を導入した変異株を取得する。

<平成29年度>

出芽酵母 *S. cerevisiae* の N-アセチル-D-アミノ酸輸送体の機能改変に基づく N-アセチル-D-アミノ酸の分泌組成および分泌量の変動解析と最適化

(1)変異アミノ酸輸送体タンパク質を発現させた酵母による N-アセチル-D-アミノ酸の分泌量と組成の変動解析

輸送基質の特異性が変化したアミノ酸輸送体を発現させた酵母変異株について、N-アシル-D-アミノ酸分泌組成ならびに分泌量の経時的変動を調べ、酵母変異株ごとに分泌される N-アシル-D-アミノ酸の種類、分泌量および N-アシル-D-アミノ酸の分泌比のデータベースを作成する。

(2)変異アミノ酸輸送体タンパク質を発現させた酵母による N-アセチル-D-アミノ酸の分泌量と組成の制御と発酵生産の最適化

先に作成したデータベースに基づき、使用するアミノ酸ラセマーゼと酵母変異株の最適な組合せを予測し、より効率よく目的とする N-アセチル-D-アミノ酸を分泌することのできる発酵条件の最適化を行う。

#### 4. 研究成果

D-アミノ酸は、近年、その生理作用が注目され、化学療法剤や食品添加剤としてもその重要度が増している。しかし、D-アミノ酸は非タンパク性アミノ酸であることから発酵生産は困難であり、その生産は有機化学合成法に依存している。本研究では、取り込んだ D-アミノ酸を N-アセチル-D-アミノ酸へ変換した後、菌体外への分泌(排出)する酵母の特徴的な性質に着目し、酵母による N-アセチル-D-アミノ酸の選択的分泌生産系の構築、および、生成した N-アセチル-D-アミノ酸からの酵素反応による D-アミノ酸への変換系の構築を目的とした。

初年度は、*Pseudomonas putida* 由来低基質特異性アミノ酸ラセマーゼ遺伝子、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来 D-アミノ酸-N-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子ならびに *Alcaligenes xylosoxydans* A-6 由来 D-アミノアシラーゼ遺伝子の大腸菌 Rosetta gami B・pET ベクター宿主ベクター系での高発現系の構築を行い、各酵素活性を標準活性測定条件下において求めた。アミノ酸ラセマーゼ活性、D-アミノ酸アセチルトランスフェラーゼ活性および D-アミノアシラーゼ活性を測定した。無細胞抽出液における比活性はそれぞれ 4.61 U/mg、 $1.16 \times 10^{-2}$  U/mg および 32.1 U/mg であった。次年度は、アミノ酸ラセマーゼと D-アミノ酸アセチルトランスフェラーゼが共役することにより L-アミノ酸から N-アセチル-D-アミノ酸の生成を確認するため、*in vitro* の系において L-メチオニンを出発物質とする N-アセチル-D-メチオニンの合成反応の検討を行った。その結果、0.5 mM L-メチオニンから 0.451 mM の N-アセチル-D-メチオニンの生成が確認され、収率は 90.1% であった。この結果から、アミノ酸ラセマーゼと D-アミノ酸-N-アセチルトランスフェラーゼを共役させることで、酵素反応上は高収率で L-アミノ酸から N-アセチル-D-アミノ酸を生産する可能性が示された。さらに *in vivo* 系で同様な共役系が機能することを確かめるため、まず、酵母内でのアミノ酸ラセマーゼ遺伝子の発現系の構築を行った。酵母発現用プラスミド pMAR426 を作製した。作製した pMAR426 で酵母 *S. cerevisiae* BY4742 株を形質転換後、YPD 培地を用いて培養した。集めた菌体をビーズ破碎し、遠心分離後の上清のアミノ酸ラセマーゼ活性を測定したところ、 $8.4 \times 10^{-3}$  U/mg であった。このアミノ酸ラセマーゼ発現酵母を用い、N-アセチル-D-メチオニン発酵生産の検討を行った。100mM L-メチオニンを含む培地で振とう培養を行った結果、48 時間後に最大 0.025 mM の N-アセチル-D-メチオニンを培地中に発酵生産した。アミノ酸ラセマーゼ活性が低いことならびに野生型酵母での D-アミノ酸アセチルトランス

フェラーゼ活性が低いことから、アミノ酸ラセマーゼ生産系の改良ならびに酵母でのD-アミノ酸アセチルトランスフェラーゼ生産系の構築を行ったところ、アミノ酸ラセマーゼ活性は改良したpGAR426プラスミドを用いることで活性を約490倍(4.13 U/mg)に、D-アミノ酸アセチルトランスフェラーゼ活性は野生型酵母の約20倍(0.117 U/mg)に向上させることに成功した。これらの両プラスミドで形質転換されたBY4742株を用いて培地条件の最適化の検討も含め、N-アセチル-D-アミノ酸分泌量の変動解析を行った結果、培地中に10mM L-メチオニンを添加した場合に、0.65mMのN-アセチル-D-メチオニンの生産が確認された。この結果、L-アミノ酸からN-アセチル-D-アミノ酸の広い意味での酵母を利用した発酵生産の可能性が示された。今後は、今回検討したD-メチオニンとD-アラニン以外のD-アミノ酸のN-アセチル誘導体の発酵生産について検討するとともに、発酵生産に関わる酵素の基質特異性の改変ならびに、今回は当初計画通りに進めることができなかったが、N-アセチル-D-アミノ酸の分泌機構に関する取り組みについても、引き続きN-アセチル-D-アミノ酸輸送体タンパク質の同定を中心に行い、より効率的なD-アミノ酸のN-アセチル誘導体の発酵生産に発展させていく。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 3件)

1) 中本 侃、若山 守「機能性食品添加剤への利用に向けた新規D-アミノ酸誘導体生産方法の開発」第71回日本栄養・食糧学会大会、2017年

2) 中本 侃、梅川碧里、林 順司、若山 守「出芽酵母を利用したD-アミノ酸誘導体生産系の構築」第69回日本生物工学会大会、2017年

3) Akira Nakamoto, Midori Umekawa, Junji Hayashi, Mamoru Wakayama「Construction of D-amino acid derivative production system using *Saccharomyces cerevisiae*」New Zealand Microbiological Society Conference 2017

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

若山 守 (WAKAYAMA MAMORU)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：70240455