

## 遺伝子組換え技術によるグルタミン酸ラセマーゼの 酵素化学的研究と、有用物質の酵素的生産

中 島 伸 佳 ・ 左右田 健 次<sup>\*</sup>

### 1. はじめに

D型及びL型アミノ酸の不斉 $\alpha$ 炭素に作用してラセミ体を生成する反応を触媒するアミノ酸ラセマーゼは主として細菌に存在し、細胞壁のペプチドグリカン中の種々のD-アミノ酸の生合成などに重要な役割を果たしている。現在までに数種のアミノ酸ラセマーゼが単離精製され、基質特異性を始めとする酵素化学的諸性質や反応機構などが研究されてきたが、そのほとんどはピリドキサル5'-リン酸を補酵素としている。また、アミノ酸ラセマーゼは基質の $\alpha$ -水素の脱離と再付加という一見単純な反応を触媒するにもかかわらず、反応機構の詳細は不明のまま残されてきた。

本研究の対象であるグルタミン酸ラセマーゼ (EC 5.1.1.3) は、古くからある種の乳酸菌にその存在が知られているものの、酵素の不安定性にも起因して十分には精製されておらず、反応機構はもとより、関与する補酵素についても明らかになっていない。

本研究は乳酸菌のグルタミン酸ラセマーゼの酵素化学的性質や反応機構を解明することを主目的としている。また遺伝子組換え技術により本酵素の構造遺伝子を *Escherichia coli* にクローン化し、本酵素の生産性を増大させて簡便な酵素精製法を確立すると共に、本酵素を用いるD-グルタミン酸の微量定量法や、各種D-アミノ酸の酵素的合成法など本酵素の応用面の開発もあわせて研究した。

### 2. グルタミン酸ラセマーゼの精製と性質

#### (1) 酵素の精製

乳酸菌を中心に各種の微生物について本酵素のスクリーニングを行った結果、*Pediococcus pentosaceus* IFO 3182 に比較的高い活性を見いだした (Table I)。*P. pentosaceus* 中における本酵素の生成は、培地へのD, L-グルタミン酸の添加によりほとんど影響を受けなかった。本菌をペプトン2%, グルコース1%, 肉

エキス0.5%, 酵母エキス0.5%を含む培地 (pH 7.2) で、37°C, 18時間、静置培養し、得られた細胞を超音波破碎して調製した無細胞抽出液から、各種のクロマトグラフィーにより、本酵素を約9,000倍に精製した。この酵素標品はディスクゲル電気泳動的に均一であった。

Table I DISTRIBUTION OF GLUTAMATE RACEMASE IN LACTIC ACID BACTERIA

Strain	Specific activity <sup>a</sup> ( $\times 10^{-3}$ units/mg)
<i>Pediococcus acidilactici</i> IFO 3076	2.7
<i>Pediococcus acidilactici</i> IFO 12218	1.8
<i>Pediococcus pentosaceus</i> IFO 3182	5.9
<i>Leuconostoc lactis</i> IFO 12455	2.4
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> IFO 3533	1.1
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> IFO 3532	1.0
<i>Lactobacillus plantarum</i> IFO 3070	2.3
<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3071	2.3
<i>Lactobacillus</i> sp. IFO 3955	3.0

<sup>a</sup> No activity was found in the following strains: *Streptococcus faecium* IFO 3181, *S. faecalis* TUA 253L, *S. lactis* IFO 12546, *S. thermophilus* IFO 13957, *Lactobacillus acidophilus* IFO 3205, *L. brevis* IFO 3345, *L. casei* subsp. *rhamnosus* IFO 3425, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* IFO 3534, *L. fructivorans* IFO 13118, *L. lactis* TUA 080L, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* IFO 3073, *L. sake* IFO 3541, *L. thermophilus* TUA 095L, and *Sporolactobacillus inulinus* IFO 13595. TUA, Tokyo University of Agriculture.

#### (2) 酵素化学的性質

本酵素の分子量はゲルろ過法により、約40,000と算出され、またSDS存在下のディスクゲル電気泳動において分子量約40,000のポリペプチドとして挙動した。

\* 京都大学化学研究所

すなわち、本酵素は単一ポリペプチド鎖からなる単量体タンパク質である。

本酵素反応の至適温度は40℃であり、至適pHは8.0付近であった。本酵素の吸収スペクトルは280 nmにのみ吸収極大を示し、蛍光スペクトル解析においても、ピリドキサル5'-リン酸やFAD由来の蛍光は観察されなかった (Fig. 1)。さらに、本酵素活性はヒドロキシルアミン、フェニールヒドラジンなどのカルボニル試薬や水素化ホウ素ナトリウム、あるいは金属キレート剤により影響を受けず、ピリドキサル5'-リン酸やFADの添加効果も認められなかった。以上の結果より、このグルタミン酸ラセマーゼはピリドキサル5'-リン酸を補酵素とする他の多くのアミノ酸ラセマーゼと異なり、補酵素に依存しないことが結論された。

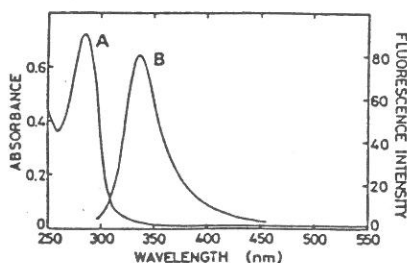


Fig. 1 Absorption and Fluorescence Spectra of Glutamate Racemase.

The absorption spectrum (A) was taken at 0.8 mg/ml of the enzyme in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) with a Union Giken SM401 recording spectrophotometer. The fluorescence emission spectrum (B) was recorded by exciting at 280 nm with a Hitachi MPF-4 spectrofluorometer.

本酵素は、グルタミン酸に対して極めて特異性が高いが、グルタミン酸の含硫アナログである合成基質ホモシステインスルフィン酸をわずかにラセミ化した。グルタミン酸に対する反応速度定数は以下の様に算出された。

K<sub>m</sub>値: D-グルタミン酸, 14 mM;

L-グルタミン酸, 10 mM.

V<sub>max</sub>値: D-グルタミン酸, 40 μモル/分・mg;

L-グルタミン酸, 30 μモル/分・mg.

また、本酵素活性は各種のSH試薬により顕著に阻害され (Table II)、ホモグルタミン酸 (L-α-アミノアジピン酸) は競合阻害剤として作用した (K<sub>i</sub> = 78 mM)。

本酵素反応における基質のα-水素転移の反応機構に関して、重水素標識した基質や重水溶媒を用いるシ

ングルターンオーバー条件下での反応生成物解析に基いて考察を加えた。その結果、基質から反応生成物へのα-水素の分子内転移が、観察され、本酵素反応は単一水素受容体機構に従って進行することが示唆された。

Table II EFFECTS OF VARIOUS THIOL-BLOCKING REAGENTS ON GLUTAMATE RACEMASE ACTIVITY

After the enzyme was incubated at 25°C for 10 min with the reagents indicated, the remaining enzyme activity was measured with D-glutamate as a substrate.

Reagent	Conc. (mM)	Remaining activity (%)
None	—	100
Iodoacetic acid	1.0	<1
Iodoacetamide	1.0	<1
p-Chloromercuribenzoate	1.0	<1
5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoate)	1.0	<1
N-Ethylmaleimide	1.0	3
2-Nitro-5-thiocyanobenzoate	1.0	<1
	0.1	<1
HgCl <sub>2</sub>	0.1	<1

### 3. グルタミン酸ラセマーゼ遺伝子のクローニングと E. coli 内での発現

#### (1) 構造遺伝子のクローニング

*P. pentosaceus* の全 DNA を制限酵素 *Hind* III で部分分解して得られた DNA 断片を、ベクター pBR 322 に凍結後、*E. coli* に形質転換した。本酵素活性を有するクローン株の検索には、D-グルタミン酸を窒素源とする選択培地でのスクリーニング法と L-グルタミン酸オキシダーゼとペルオキシダーゼを用いる活性染色法を併用した。その結果、約 3,200 のプラスミド保有株から 3 株の本酵素活性を有するクローンを得た。このうち最も活性の高いクローン株はベクター由来の DNA 断片と新たに挿入された約 6 kb の *Hind* III 断片から構成されている 10.3 kb のプラスミド (pMR 221) を保持していた (Fig. 2)。

#### (2) クローン株による酵素生産と精製

本酵素の構造遺伝子を導入したプラスミドを含む *E. coli* から調製した無細胞抽出液は *P. pentosaceus* よりも 15~18 倍高い酵素活性を示した。一般に乳酸菌などの嫌気性菌は生育速度が遅く菌体収量も比較的

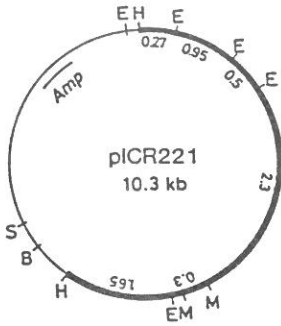


Fig. 2 Restriction Map of Plasmid pICR 221.

Table III PURIFICATION OF GLUTAMATE RACEMASE FROM *E. coli* C600-pICR 221.

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Fold
1. Cell-free extract	9,000	1,800	0.2	1
2. Butyl-Toyopearl	442	620	1.4	7
3. Cellulofine GCL-2000	91	420	4.6	23
4. TSK-DEAE 5PW	21	260	12.0	60
5. FPLC-MonoQ	7	112	16.0	80
6. TSK-Phenyl 5PW	3	78	26.0	130

低いが、*E. coli* クローン株を用いた場合、*P. pentosaceus* よりも約 150 倍高い酵素収量が得られた。本酵素はクローン菌体の全可溶性タンパク質の約 2% を占めており、クローン化によって従来よりはるかに高い収量で本酵素を得られることが示された。

プラスミド pMR 221 を保持する *E. coli* のクローン株を L-培地で約 3 時間培養し、得られた細胞を超音波で破碎後、抽出液を調製し、各種のクロマトグラフィーにより約 130 倍の倍率で本酵素を容易に精製することができた。精製酵素は電気泳動的に均一であり、その酵素化学的性質は *P. pentosaceus* より得られた精製酵素のそれと同一であった (Table III)。

#### 4. D-グルタミン酸の微量定量法の開発

本酵素とグルタミン酸デヒドロゲナーゼを共役させた反応系を開発し、D-グルタミン酸を特異的に微量定量する方法を確立した。本法の原理は D-グルタミン酸のラセミ化によって生成する L 体をグルタミン酸デヒドロゲナーゼで酸化的脱アミノ化し、生成する NADH を直接分光学的に、あるいはホルマジン色素の発色系と共役させた比色法で定量するものである (Fig. 3)。

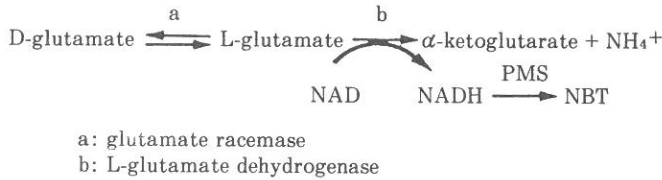


Fig. 3 Determination of D-Glutamate

#### 5. D-アミノ酸の酵素的合成法の開発

本酵素と D-アミノ酸トランスアミナーゼを共役させ、各種の  $\alpha$ -ケト酸とギ酸アンモニウムを原料とし

て、D-アミノ酸を立体特異的に高収率で合成する酵素的方法を開発した (Fig. 4)。

本反応系では D-アミノ酸トランスアミナーゼによ

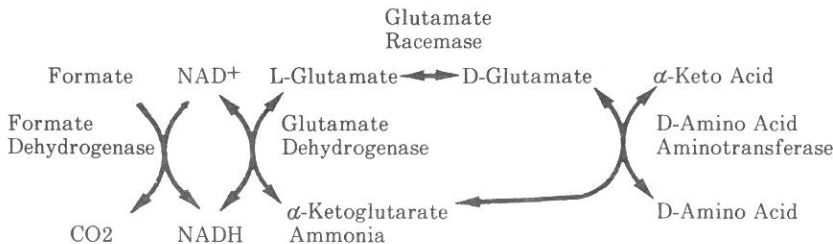


Fig. 4 Synthesis of Various D-Amino acids

りD-グルタミン酸の $\alpha$ -アミノ基を種々の $\alpha$ -ケト酸に転移させてD-アミノ酸を合成する。アミノ基供与体であるD-グルタミン酸を再生させるためにグルタミン酸ラセマーゼとグルタミン酸及びギ酸両デヒドロゲナーゼを用いることを特徴としている。 $\alpha$ -ケトイソ吉草酸を原料とした場合、光学純度ほぼ100%のD-バリンを約50 mg/ml (対ケト酸収率90%以上)合成できた。アラニン、ロイシン、 $\alpha$ -アミノ酪酸、アスパラギン酸及びメチオニンのD-異性体も各々相当する $\alpha$ -ケト酸から、本共役系を用いることにより、ほぼ同収率で合成できた (Table IV)。

Table IV PRODUCTION OF VARIOUS D-AMINO ACIDS

D-Amino acids	Molar yield (%)
D-Valine	100
D-Alanine	100
D- $\alpha$ -Aminobutyrate	100
D-Aspartate	100
D-Leucine	84
D-Methionine	80
D-Serine	50
D-Histidine	36
D-Phenylalanine	28
D-Tyrosine	13

Various  $\alpha$ -keto acids (100  $\mu$ mol) were incubated at 37°C for 10 h under the conditions optimized for the D-valine production. Amino acids produced were determined by amino acid analysis.

### 6. 立体特異的重水素化NAD(P)<sup>2</sup>Hの合成法の開発

本酵素反応によるグルタミン酸のラセミ化を重水中でおこなうことにより重水より重水素(<sup>2</sup>H)を、基質の $\alpha$ -位に導入した〔 $\alpha$ -<sup>2</sup>H〕-体を原料として、グルタミン酸脱水素酵素共役反応系を用いて、NAD(P)<sup>+</sup>より〔4S-<sup>2</sup>H〕-NAD(P)Hを酵素的に合成した。グルタミン酸より生じた $\alpha$ -ケトグルタル酸は、ハイポタウリンアミノトランスフェラーゼ反応を利用してL-グルタミン酸に再生した。現在用いられている立体特異的標識NAD(P)<sup>2</sup>Hの合成法に比べ、本酵素法は、高価な重水素化基質を用いることなく、容易に、かつ短時間に、数十 $\mu$ molオーダーの立体特異的重水素化ビリジンスクレオチド補酵素の大量合成を可能にした (Fig. 5)。

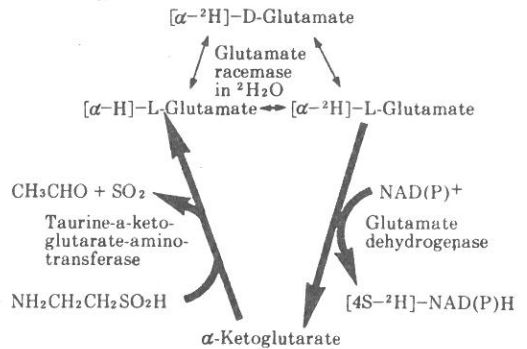


Fig. 5 Synthesis of [4S-<sup>2</sup>H]-NAD(P)H

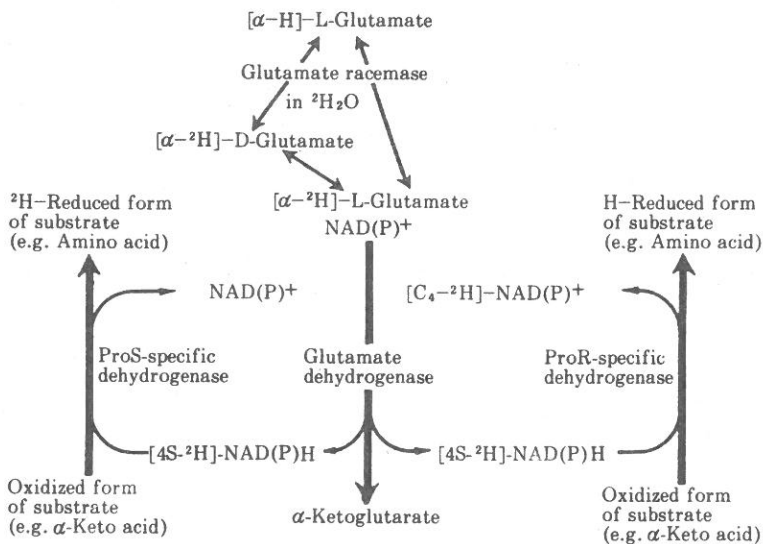


Fig. 6 In Situ Determination of Stereospecificity of Dehydrogenases

### 7. 脱水素酵素の補酵素NAD(P)<sup>+</sup>に対する水素転移の立体特異性の解析法の開発

脱水素酵素の補酵素NAD(P)HのC<sub>4</sub>-水素転移に対する立体特異性は、反応機構や分子進化の面で重要である。本酵素を用いて合成した〔 $\alpha$ -<sup>2</sup>H〕-DL-グルタミン酸を基質として、NAD(P)<sup>+</sup>に対する立体特異性(H<sub>s</sub>又はH<sub>r</sub>転移)の未知なる脱水素酵素とグルタミン酸脱水素酵素を共役的に反応させることによ

り生成したNAD(P)<sup>+</sup>への重水素の取りこみを直接、NMR チューブ中で解析する。本法によれば、従来のように立体特異性の未知なる脱水素酵素反応により生じたNAD(P)<sup>2</sup>Hなどを単離後解析する必要もなく、立体特異的重水素化、又はトリチウム化NAD(P)Hを基質として用いることもなく、容易に、直接的に、水素脱離の立体特異性を解析することが可能であった (Fig. 6)。

## 8. おわりに

アミノ酸ラセマーゼ及びエピメラーゼは長い間PLP酵素と考えられてきたが、本酵素のように補酵素を含まない酵素が次々証明されてきている。これらの酵素に金属イオンが補欠分子族として含まれている例もない。補酵素非依存性のこれらの酵素のラセミ化機構の解明は緒についたばかりであるし、PLP依存性酵素との触媒機構などの比較も補酵素の作用機構の解明に鍵を与えるものといえよう。また、これらの酵素のタンパク質構造の比較研究も分子進化の面から重要な問題である。

D-アミノ酸が動植物に広く存在する事実から、微生物以外のアミノ酸ラセマーゼ、エピメラーゼが存在する可能性やそれらの性質の解明も待たれるところである。ラセミ化はある意味ではアミノ酸の生体反応中、最も簡単にして基本的な反応である。それだけにこの酵素の反応機構の解明は、各種有用物質の酵素的生産など応用面の広がりとともに大きな進展が期待される。

現在、本酵素の構造遺伝子の塩基配列の解析、並びに精製酵素タンパク質の一次構造の解析などに始まるタンパク質の高次構造と、酵素の触媒機能に関する研究が進められている。

本研究は、山陽放送学術文化財団、第25回学術研究助成金(昭和63年度)の贈呈を受けた。本研究の今後の進展は、本研究助成に依存するところが多大である。

近く、同財団、研究レポート(第33号)に、本研究結果を報告する予定である。

本研究を遂行するにあたり、数々の御指導と御援助を賜りました、岡山県立短期大学学長、新見嘉兵衛先生に深く感謝いたします。

平成元年 1 月 21 日 受付

平成元年 3 月 16 日 受理