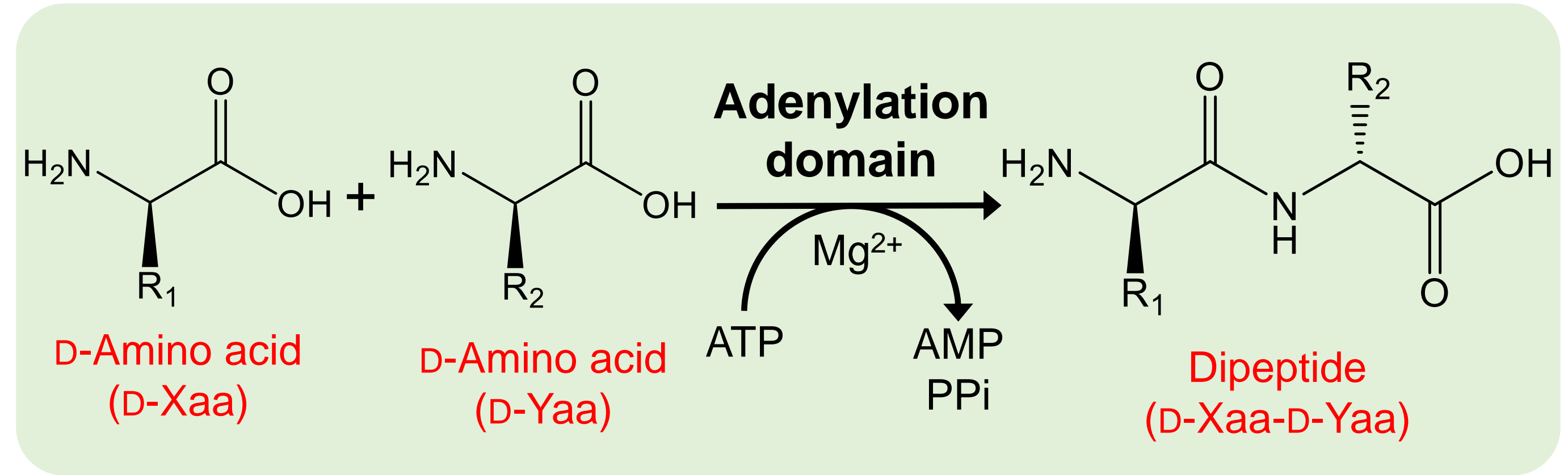
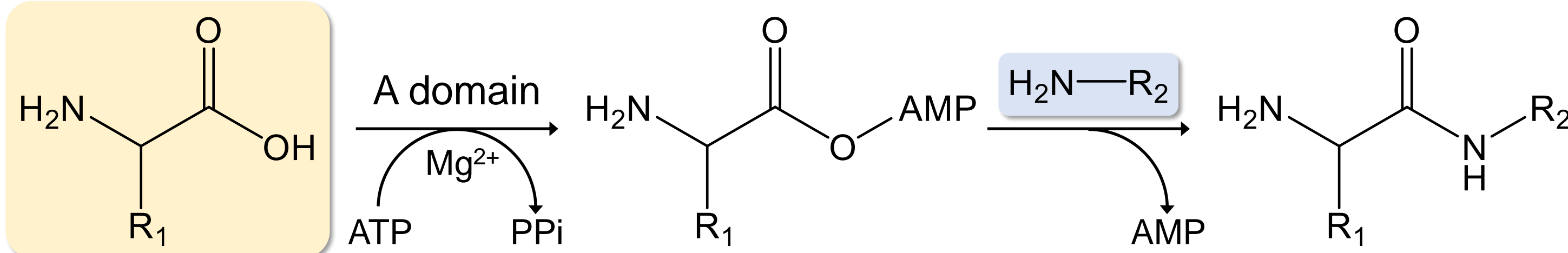




目的 ジペプチドは構成するアミノ酸単体には見られない生理活性や物理化学的特性を有し、医薬品や健康食品素材、化成品などその用途は拡大している。一方、発酵・醸造食品中の遊離D-アミノ酸の存在と呈味性などが報告され、D-アミノ酸を含むジペプチドにも新たな機能や特性が期待できる。本研究では、我々が見出した非リボソーム型ペプチド合成酵素のアデニル化ドメインを利用するユニークなアミド結合形成反応¹⁾を応用して、D-アミノ酸含有ジペプチドの新規生産法を開発した。



方法・結果 1. アデニル化ドメインを利用したジペプチド合成



アミノ酸のアデニル化反応 + アミノ基による求核置換反応

N末端側アミノ酸(制限有り)
Aドメインの基質となるアミノ酸

C末端側アミノ酸(制限無し)
全てのアミノ酸

➤ D-アミノ酸を基質とするAドメインを利用
→ 多様なキラリティを有するジペプチドが合成可能と推察

2. D-アミノ酸を基質とするAドメインの探索

■ 作業仮説の構築

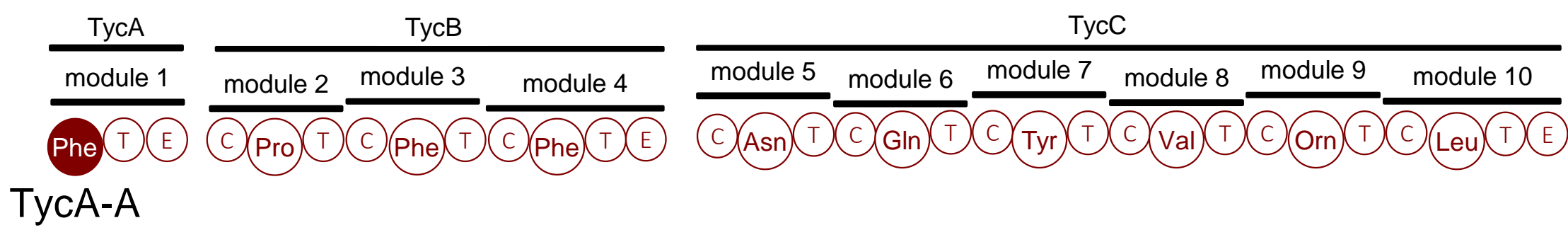
NRPSによるペプチド合成におけるキラリティ制御

1. Aドメイン: アデニル化する基質アミノ酸
2. Eドメイン: L-アミノ酸 → D-アミノ酸の立体反転
3. Cドメイン: 厳密なキラリティ認識を伴うアミノ酸同士の縮合

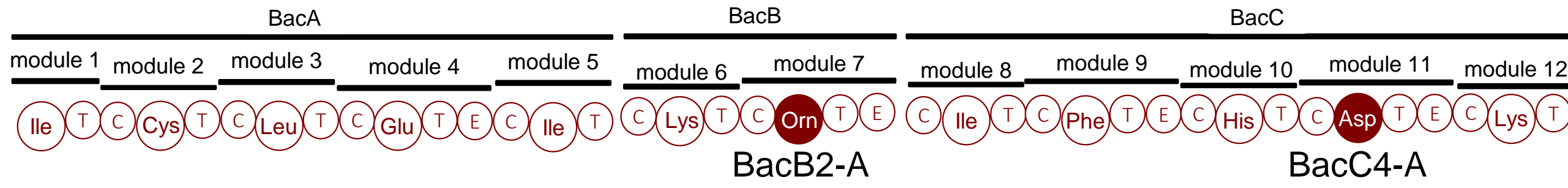
➤ Eドメインを有するモジュールのAドメイン
→ D-アミノ酸を基質としても生合成に不都合がない
= D-アミノ酸を基質とする可能性が高い

■ 候補Aドメインの選定

Tyrocidine synthetase from *Brevibacillus parabrevis* IAM 1031²⁾



Bacitracin synthetase from *Bacillus licheniformis* NBRC 12199³⁾



Paenibacterine synthetase from *Paenibacillus alvei* NBRC 3343
(homolog of paenibacterine synthetase from *Paenibacillus thiaminolyticus* OSY-SE⁴⁾)

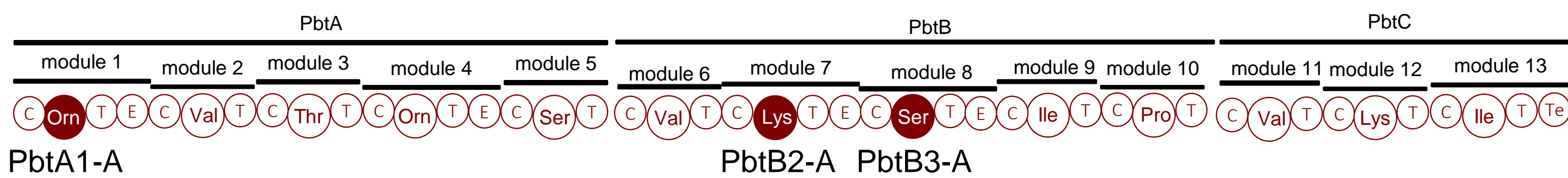


Fig. 1. Location of six candidate A domains in the NRPS modules.

➤ 候補として6つのAドメインを選定
TycA-A, BacB2-A, BacC4-A, PbtA1-A, PbtB2-A, PbtB3-A

■ 候補AドメインのD-アミノ酸に対する基質特異性評価

タンパク質構成性アミノ酸およびOrnのD-体を対象として評価
ヒドロキシルアミン比色分析(Fig. 2)⁵⁾を利用

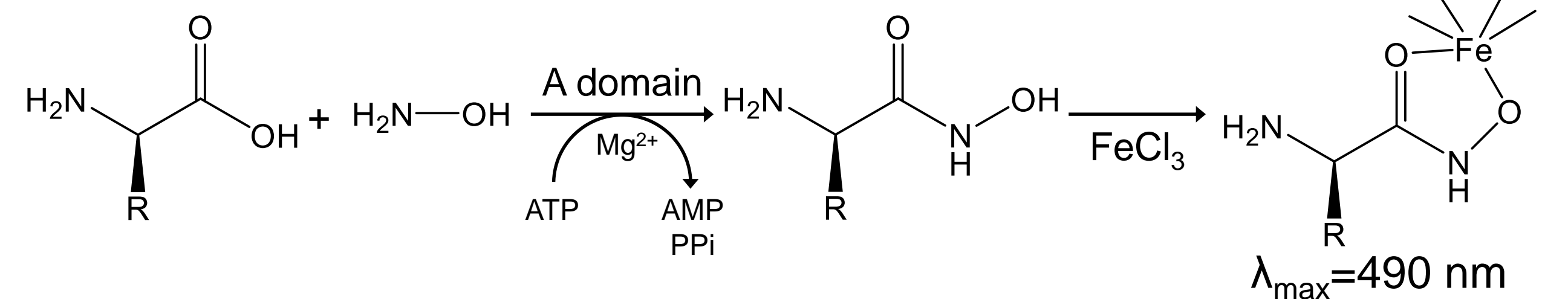


Fig. 2. Hydroxamate-based colorimetric assay⁵⁾.

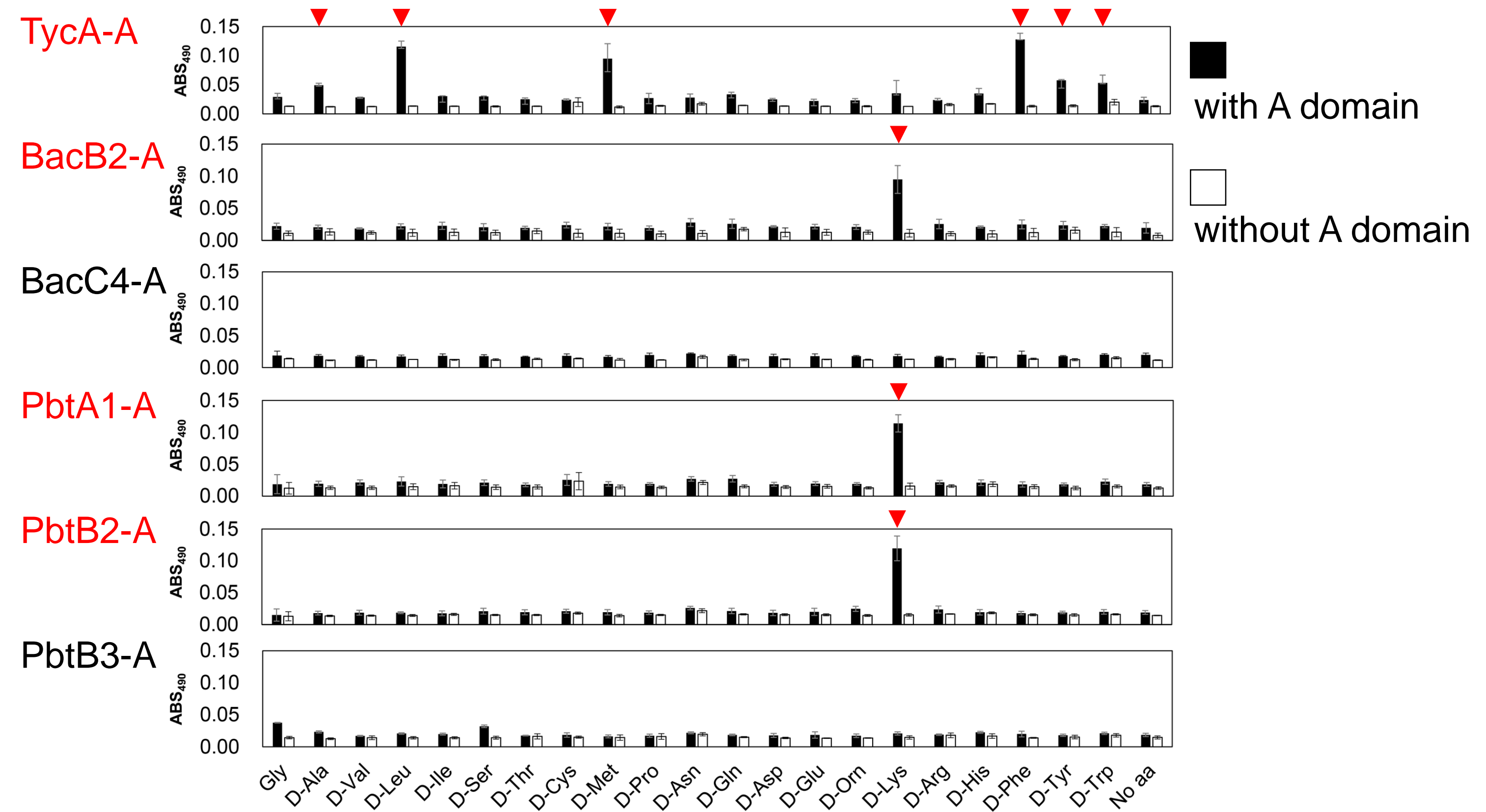
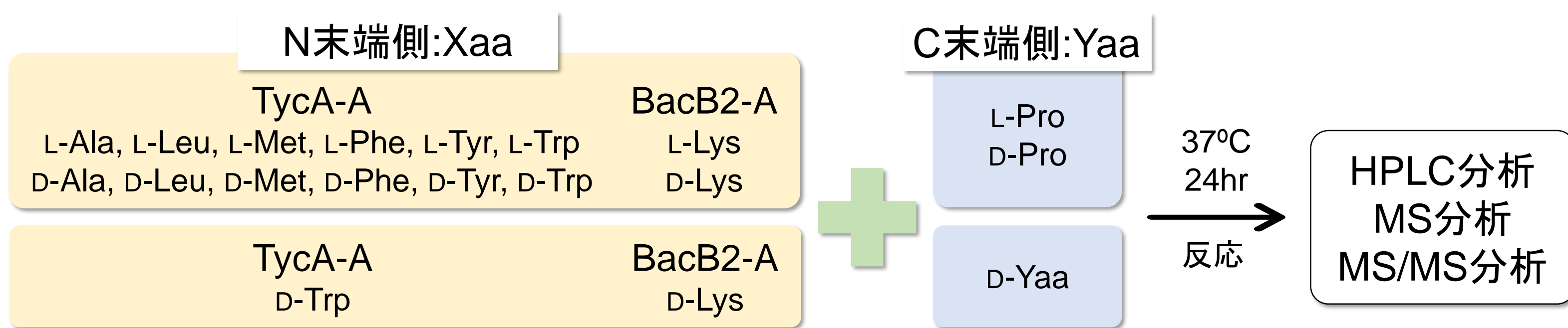


Fig. 3. Colorimetric assay for substrate specificity of A domains.

➤ TycA-AがD-Ala, D-Leu, D-Met, D-Phe, D-Tyr, D-Trp、
BacB2-A, PbtA1-A, PbtB2-AがD-Lysを基質とすることが判明

3. D-アミノ酸含有ジペプチドの合成

■ TycA-A、BacB2-Aを用いたジペプチド合成



➤ L-Xaa-L-Pro, L-Xaa-D-Pro, D-Xaa-L-Pro, D-Xaa-D-Proが生成
→ 基質のキラリティを反映したジペプチドの作り分けが可能
➤ D-Trp-D-Yaa, D-Lys-D-Yaaが生成
→ 求核剤として任意のD-Yaaが利用可能

■ 菌体反応によるD-Trp-D-Pro合成

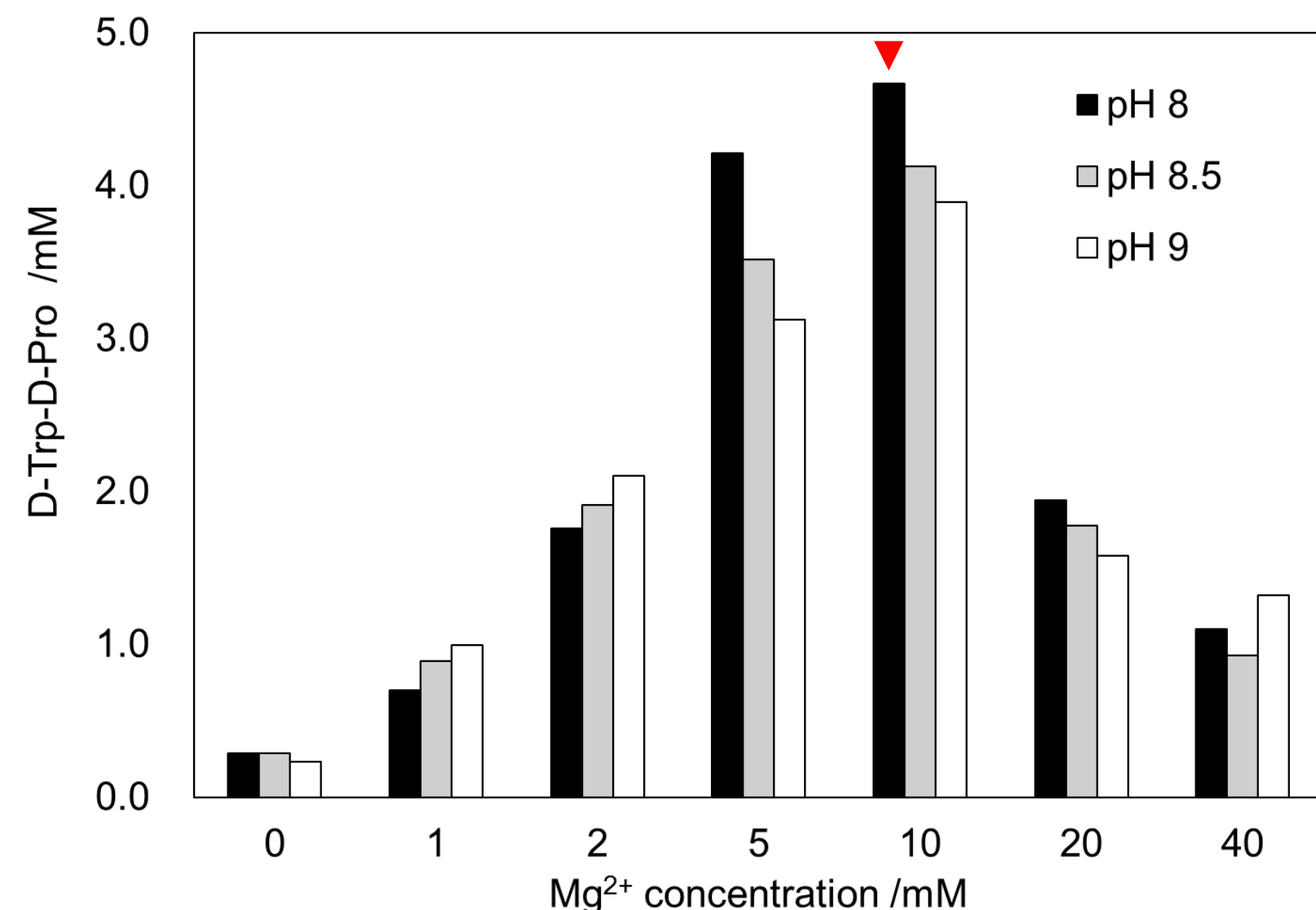


Fig. 4. D-Trp-D-Pro synthesis by whole cell reaction.

➤ 最大4.67 mMの
D-Trp-D-Proが生成
pH: 8.0
Mg²⁺: 10 mM

まとめ 1. NRPSによるペプチド合成機構を踏まえて“Eドメインを有するモジュールのAドメインはD-アミノ酸も基質とする”という作業仮説を立て、それに基づいて探索を行った結果、D-アミノ酸を基質とする目的のAドメインを4つ(TycA-A, BacB2-A, PbtA1-A, PbtB2-A)見出した。
2. TycA-A及びBacB2-Aを用いた場合、基質Xaaと求核剤Proを作用させると、L-Xaa-L-Pro、L-Xaa-D-Pro、D-Xaa-L-Pro、D-Xaa-D-Proが、D-TrpあるいはD-Lysを基質として求核剤D-Yaaを作用させると、それぞれ、D-Trp-D-Yaa と D-Lys-D-Yaa が生成した。
3. D-Trpを基質とするTycA-Aを発現させた組換え大腸菌による菌体反応では、10 mMのD-Trpから最大4.67 mMのD-Trp-D-Proを生産した。