

微生物由来酵素を用いた
アミノ酸誘導体の製法に関する研究

2023年1月

高倉 康彰

微生物由来酵素を用いた
アミノ酸誘導体の製法に関する研究

筑波大学大学院
理工情報生命学術院
生命地球科学研究群
生命農学学位プログラム
博士（生命農学）学位論文

高倉 康彰

目次		
第一章	序論	3
第一節	アミノ酸とアミノ酸誘導体	3
第二節	化粧品原料としてのアシルアミノ酸	3
第三節	フレーバー素材としてのベンズアルデヒド	4
第四節	微生物由来酵素を用いる製法	5
第五節	本研究の目的と本論文の構成	6
第二章	<i>N</i> -ラウロイル-L-フェニルアラニン (Lau-Phe) 分解菌の単離と同定	7
第一節	緒言	7
第二節	材料および方法	7
第三節	集積培養による <i>N</i> -ラウロイル-L-フェニルアラニン (Lau-Phe) 分解菌の単離	12
第四節	LP5_18B 株の同定	15
第五節	まとめと考察	17
第三章	アシルアミノ酸合成酵素の精製と酵素学的解析、および遺伝子の同定	19
第一節	緒言	19
第二節	材料および方法	19
第三節	目的酵素の精製	24
第四節	酵素学的諸性質の解析	27
第五節	精製酵素を用いた各種アシルアミノ酸の合成	31
第六節	アシルアミノ酸合成酵素遺伝子の同定	37
第七節	まとめと考察	39
第四章	ベンズアルデヒドの酵素合成ルート構築	41
第一節	緒言	41
第二節	材料および方法	43
第三節	酵素 4 種を用いる基本ルートの構築	49
第四節	HMAS のスクリーニング	51
第五節	まとめと考察	53
第五章	酵素改変によるベンズアルデヒド収率の向上	54
第一節	緒言	54
第二節	材料および方法	54
第三節	酵素の性質解析と改変	60
第四節	改変型酵素を用いたベンズアルデヒドの生成	64
第五節	まとめと考察	66
第六章	総括	68
引用文献		70

謝辭77

第一章 序論

第一節 アミノ酸とアミノ酸誘導体

アミノ酸はタンパク質の構成要素であり、栄養素としての研究が 1900 年代から進められてきた (Willcock EG 1906, Osborne TB *et al.* 1914)。また、グルタミン酸塩がうま味を呈することが見いだされ、1909 年から調味料として販売が開始された (池田 1908, Sano C 2009)。その後も様々な機能や用途が研究され、現在では食品・飲料だけではなく、医薬品、再生医療用培地、化粧品、飼料、肥料などにも活用されている (中森 2008)。2021 年のアミノ酸生産量は 1000 万トンに達し、2027 年には 1300 万トンを超えると試算されている (IMARC Group 2022)。

アミノ酸誘導体は、アミノ酸の分子構造を一部変化させた化合物であり、主にアミノ酸を原料として生産される。自然界から単離されたアミノ酸誘導体の例としては、高峰によるアドレナリン (Takamine 1902)、Raab らによるドーパミン (Raab W *et al.* 1951)、Rapport らによるセロトニン (Rapport MM *et al.* 1948) などがあり、アミノ酸と同様に古くから機能や活用に関する研究が進められてきた。アミノ酸誘導体は、アミノ酸類を分析するためにも用いられてきた。ニンヒドリンによるアミノ酸の比色定量法も、アミノ酸誘導体を活用した例と言える (Moore S *et al.* 1948, 1958)。現在では様々なアミノ酸の誘導体化試薬が開発され、高感度での高速分析やキラル分析も可能になっている (Shimbo K *et al.* 2009, Gogami Y *et al.* 2011, Harada M *et al.* 2019)。ペプチドを合成する際には、保護基が導入されたアミノ酸誘導体を用いられてきた。特に、ベンジルオキシカルボニル (Cbz) 基、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc) 基、*tert*-ブトキシカルボニル (t-Boc) 基が導入されたアミノ酸は、現在でも様々なペプチドの合成に活用されている (Bergmann M *et al.* 1932, Carpino AL *et al.* 1972, Lundt BF *et al.* 1978)。ペプチドもまたアミノ酸誘導体であり、L-フェニルアラニンメチルエステルと L-アスパラギン酸の縮合物である甘味料アスパルテームも、アミノ酸誘導体と言える (Ariyoshi Y 1976, Leuchtenberger W *et al.* 2005)。グルタミンは水溶液中での安定性が低く容易にピログルタミン酸へと変換されてしまうため、アラニンを付与したジペプチドである L-アラニル-L-グルタミンが培地や飼料の添加剤として用いられることもある (Imamoto Y *et al.* 2013, Lima NL *et al.* 2007, Zou TD *et al.* 2019)。神経伝達物質としてよく知られている GABA (gamma-aminobutylic acid) も、グルタミン酸の脱炭酸により得られるアミノ酸誘導体であり、現在ではサプリメントや食品成分として広く用いられている (Pascual-Anaya J *et al.* 2006, Boonstra E *et al.* 2015)。

このように、安価なアミノ酸から様々な機能や呈味を有する誘導体を得られるため、幅広い用途での活用が期待されている (Zhao CJ *et al.* 2016)。

第二節 化粧品原料としてのアシルアミノ酸

化粧品と薬用化粧品を合わせて香粧品と呼ばれ、ファンデーションや口紅の他、石鹸やシャンプーなどスキンケア製品全般が含まれる（徳永 2021）。洗浄系製品には界面活性剤が用いられ、肌に触れること、日常的に使用することから、洗浄力の他にも人体への安全性や低刺激性が求められる（押村 2013）。また近年では、製造や使用に際して発生する環境への影響を低減させることも重視される（LOREAL 2020, Unilever 2021）。

アシルアミノ酸は、アミノ酸と脂肪酸から生成されるアミノ酸誘導体であり、界面活性作用に関する報告は 1930 年代の Hentrich らによる、アシルサルコシン塩などの洗浄剤、シャンプー、歯磨きなどへの応用に関する特許に始まったとされる（坂本 1995）。代表的なアシルアミノ酸としては、ラウリン酸と L-グルタミン酸から生産される N-ラウロイル-L-グルタミン酸塩などが挙げられる。安全性や生分解性の高さが確認され、現在では洗浄剤として広く用いられている（Takehara M *et al.* 1972, 吉田ら 1975）。また、グルタミン酸以外のアミノ酸を用いるアシルアミノ酸についても、性質解析や利用検討が広く進められてきた（Mhaskar SY *et al.* 1990, Pinazo A *et al.* 2011, Bordes R *et al.* 2015, Foley P *et al.* 2012）。アシルアミノ酸の、香粧品原料以外での利用法や機能としては、酵素を用いる光学分割による光学活性アミノ酸製法の原料や、タンパク質の安定化剤やリフォールディング剤、抗炎症作用なども知られている（Tosa T *et al.* 1966, Imabayashi Y *et al.* 2016, Wang W *et al.* 2013, Abe R *et al.* 2010, Kudou M *et al.* 2011, Succar R *et al.* 2007）。

アシルアミノ酸の工業製法としては、脂肪酸クロリドとアミノ酸を原料として用い、アルカリ条件で縮合させるシュotten・バウマン反応がよく利用される（Takehara M *et al.* 1972）。バイオ製法についてもいくつか報告はあるが、おそらく収率の低さや精製工程の煩雑さなどが原因で、工業化には至っていない（Yokoigawa K *et al.* 1994, Wada E *et al.* 2002, Koreishi M *et al.* 2005, Koreishi M *et al.* 2006）。アシルアミノ酸の効率的なバイオ製法としては、Nε-ラウロイル-L-リジンの酵素製法が知られている。Nε-ラウロイル-L-リジンは撥水性を有する機能性粉体であり、*Streptomyces mobaraensis* 由来 Nε-リジンアシラーゼを用いることで、ラウリン酸と L-リジンから 90%以上の高収率で得ることが報告されている（Koreishi M *et al.* 2005, Koreishi M *et al.* 2009）。生成物の Nε-ラウロイル-L-リジンが水に不溶であり、反応液中で析出し系外除去されるために脱水縮合が効率的に進むのだが、酵素の基質特異性が厳密なため Nε-アシル-L-リジン以外の製法には適用できない。アシラーゼを用いるアシルアミノ酸の分解については多数の報告があるが、それらの合成活性については調べられていない（Koreishi M *et al.* 2009, Arima J *et al.* 2013, Liu J *et al.* 2012, Parker BM *et al.* 2011）。

今後も、アシルアミノ酸は洗浄剤や化粧品原料として世界的に広く使用されることが見込まれる。また、現行製法よりも環境負荷の小さい製法が求められると予想され、原料の脂肪酸やアミノ酸を修飾することなく、水系で効率的にアシルアミノ酸を生成することができる酵素製法の開発が必要と考えられている。

第三節 フレーバー素材としてのベンズアルデヒド

フレーバーとは、食品に香気を付与または増強するために用いられる香料であり、香粧品の香料として用いられるフレグランスとは区別される。香料を大別すると、天然香料と合成香料に分類される（堀内 2005）。近年の自然派嗜好やサステイナブル素材への関心により、ナチュラルフレーバーと呼ばれる天然香料やバイオ製法への需要が世界的に高まっている（Goodman MJ 2017）。フレーバー成分のバイオ製法としては、世界的に最もよく使用される香料であるバニリンに関する報告が多く、関心も高い（Banerjee G *et al.* 2019, Ciriminna R *et al.* 2019, Martău GA *et al.* 2021）。Solvay 社の Rhovanil®, BASF 社の Natural Vanillin F など、バニリンのバイオ製法品はすでに生産、販売されている（Leffingwell JC *et al.* 2015）。

ベンズアルデヒドはアーモンドの香りを呈する化合物で、ビターアーモンドやアンズの芯から抽出される精油の主成分である。フレーバーとして飲料や食品に用いられるだけでなく、フレグランスとして香水等にも広く用いられており、バニリンに次いで生産量の多い香料としても知られている（Surburg H *et al.* 2006, Gupta VK 2016）。また、合成化学ではビルディングブロックとして用いられ、プラスチック用添加剤としても利用されている（Baumann M *et al.* 2013, Patel RN 2016）。抗菌作用や抗酸化作用を示すという報告もある（Ullah I *et al.* 2015）。生産方法は化学合成が主流で、トルエンの酸化により生成される。カシア油から得られるシナムアルデヒドを基質とし、レトロアルドール反応によりベンズアルデヒドを生成させる手法もよく用いられる。また、ビターアーモンドや杏仁からの抽出によっても得られる（Clark GS 1995）。

ベンズアルデヒドのバイオ製法としては、L-フェニルアラニンを原料に用いて検討されてきたが、収率は低く、また蓄積は低濃度に留まっており、効率的な製法は未だ構築されていない（Jensen KA *et al.* 1994, Kawabe T *et al.* 1994, Krings U *et al.* 1996, Nierop Groot MN *et al.* 1998, 1999, Lomascolo A *et al.* 2001）。これらの製法では効率的なベンズアルデヒド生成に至らない理由として、生成に関与する酵素活性の低さ、副反応の多さ、反応経路の複雑さ、などが考えられる。

バニリンと比較しベンズアルデヒドは、植物からの抽出でも比較的安価に得られることや、市場規模が小さいことから、バイオ製法の開発が進められてこなかった可能性がある。ただし、今後は特定の植物原料に頼らず、環境負荷が小さく持続可能なバイオ製法が求められると考えられる。

第四節 微生物由来酵素を用いる製法

アミノ酸の生産に用いられるバイオ製法としては、糖などの炭素源を基質に用いて生育とともに目的物質を生成させる発酵法の他に、目的物質の前駆体を基質に用いて酵素または酵素発現菌によって変換させる酵素法がある（横関 1999）。アミノ酸誘導体についても、アミノ酸と同様に発酵法と酵素法の適用が可能だが、原料のアミノ酸（または類似物質）が比較的安価に入手可能で、アミノ酸誘導体が菌体の生育に影響を及ぼすと懸念される場合には、酵素法が適していると考えられる。

アミノ酸またはアミノ酸誘導体の工業生産に酵素法が適用された例としては、L-テアニン（*Pseudomonas nitroreducens* 由来グルタミナーゼを使用）、アスパルテーム（*Sphingobacterium* sp.由来アミノ酸エステルアシルトランスフェラーゼを使用）、D-p-ヒドロキシフェ

ニルグリシン (*Pseudomonas putida* 由来ヒダントイナーゼおよび *Agrobacterium* sp.由来 D-カルバミラーゼを使用)、L-ドーパ (*Erwinia herbicola* 由来チロシンフェノールリアーゼを使用)、L-アスパラギン酸 (*E. coli* 由来アスパラギナーゼを使用)、L-アラニン (*Pseudomonas dachunhae* 由来 L-アスパラギン酸デカルボキシラーゼを使用)、などが挙げられる(太陽化学株式会社 2009、味の素株式会社 2017、中森 2009)。いずれも微生物由来酵素が使用されており、基質特異性や安定性など目的の性質に合致する酵素の探索源として、微生物が適していたと推察される。

近年では、データベース上のゲノム情報から探索を開始する、ゲノムマイニングと呼ばれる手法を用いた新規化合物や新規酵素遺伝子の発見についても報告されている(Matsuda K *et al.* 2022, Choirunnisa AR *et al.* 2022)。シーケンス技術の発展に伴い急速に微生物ゲノムの情報が拡充され、これまで知ることのできなかった多様な代謝経路および酵素を利用しやすくなったと考えられる。

第五節 本研究の目的と本論文の構成

安価なアミノ酸から生成が可能で、かつ様々な機能を有するアミノ酸誘導体は産業的に重要な化合物群である。界面活性剤として作用するアシルアミノ酸は香料品原料として、特有の香気を有するベンズアルデヒドはフレーバー素材として、いずれも世界的に活用されている重要な成分で今後も需要は拡大すると考えられている。そのため、現在用いられている化学合成法や抽出法に代わる、環境負荷の低いバイオ製法で生産することが将来は必要になると考えられるが、これまでに効率的なバイオ製法は構築されていなかった。

そこで、本研究の目的として、アシルアミノ酸およびベンズアルデヒドの効率的な酵素製法を構築すべく、目的に合致する酵素の取得と、得られた酵素を用いた製法の開発を進めることとした。酵素の探索源としては、酵素製法の実績が多く、取り扱いが比較的容易と推察される微生物を用いることとした。開発される酵素製法は、溶媒や危険な薬剤を用いないため環境負荷が小さく、かつ特定の原料に頼らないため安定で持続的な製法になると期待された。

本論文の構成は以下のとおりである。まず第二章では、*N*-ラウロイル-L-フェニルアラニン(以下、Lau-Phe)分解菌の単離と同定について述べる。第三章では、Lau-Phe分解菌から精製したアシルアミノ酸合成酵素の諸性質および同定した遺伝子について述べる。第四章では、ベンズアルデヒドの酵素合成ルートに用いる酵素4種の評価と、マンデル酸合成酵素のスクリーニングについて述べる。第五章では、マンデル酸合成酵素の改変による機能改善と改変型酵素の性質解析、および改変型酵素を用いるベンズアルデヒドの生成について述べる。最後に第六章で、本研究全体の総括と、今後の展望について述べる。

第二章 *N*-ラウロイル-*L*-フェニルアラニン (Lau-Phe) 分解菌の単離と同定

第一節 緒言

アシルアミノ酸の合成活性を有する酵素としては、アミノアシラーゼ (Yokoigawa K *et al.* 1994, Wada E *et al.* 2002, Koreishi M *et al.* 2005)、 ϵ -リジンアシラーゼ (Koreishi M *et al.* 2006, 2009)、リパーゼ (Soo EL *et al.* 2003)、カプサイシン分解酵素 (Koreishi M *et al.* 2006)、などが報告されている。これらはアシルアミノ酸の生成に用いることが可能だが、様々なアシルアミノ酸を効率的に生成することはできなかった。

そこで、脂肪酸とアミノ酸から様々なアシルアミノ酸を生成させられる酵素を探索し、新たな酵素製法の確立を試みることにした。アシルアミノ酸を分解する酵素ならば、逆反応によるアシルアミノ酸の合成も可能と考え、アシルアミノ酸の分解酵素 (菌株) を取得することとした。酵素源を広く自然界から探索するため、集積培養を用いたアシルアミノ酸分解菌の取得を試みた。香料品に用いられるアシルアミノ酸には、ラウリン酸がアシル基の供与体として用いられることが多く、またフェニルアラニン HPLC での分析が容易なことから、基質には *N*-ラウロイル-*L*-フェニルアラニン (以下、Lau-Phe) を使用した。本章では、集積培養による Lau-Phe 分解菌の単離と同定、最有望株の選定について記載する。

第二節 材料および方法

2-2-1 実験材料

N-ステアロイル-*L*-フェニルアラニン (以下、Ste-Phe) は、渡辺ケミカル社より購入した。Lau-Phe は、味の素社より提供された。Yeast Nitrogen Base (Table 2-2-1) は BD バイオサイエンス社より購入した。その他の試薬類は、市販品を購入し精製せずに使用した。

2-2-2 Lau-Phe 分解菌の集積培養

Lau-Phe 単一炭素源培地 (Table 2-2-2、Lau-Phe 以外にもアミノ酸とビタミン類由来の微量炭素は含まれる) 0.5 mL を入れた 96 穴ディープウェルプレートに、富山県立大学内および周辺で採取した土壌試料を接種し、30℃で 1 日間振とう培養を行った。得られた培養液 0.005 mL を Lau-Phe 単一炭素源培地 0.5 mL を入れた 96 穴ディープウェルプレートに接種し、30℃で 2 日間振とう培養を行った。同様にして再度 3 日間の振とう培養を行った。3 回の集積培養後に生育が認められた培養液を Lau-Phe 単一炭素源寒天培地 (Table 2-2-2、agar 1.5%) に塗布し、30℃で 3 日間培養した。得られたコロニーを TGY 寒天培地 (Table 2-2-3、agar 1.5%) に塗布し、30℃で 2 日間培養しコロニーを単離した。

2-2-3 Lau-Phe 分解活性の評価

集積培養で得られた菌株を、TGY 培地 (Table 2-2-3) 0.5 mL を入れた 96 穴ディープウェルプレートに接種し、30°C で 24 時間振とう培養した。得られた培養液 0.05 mL を 3,000 x g、10 分、4°C で集菌し、5 mM の Lau-Phe および 100 mM の Tris-HCl (pH 8.0) を含む反応液 0.1 mL に懸濁した。30°C で 16 時間の反応を行い、0.01 M NaOH および 50% エタノールを含む反応停止液 0.5 mL を添加した。反応液中に残存している Lau-Phe は、フィルターろ過後に UPLC システム (ウォーターズ) により定量した。分析条件は以下に記載の通り。

2-2-4 UPLC での Lau-Phe 分析

以下に示す条件で Lau-Phe の UPLC 分析を実施した。

移動相 A : 0.1% リン酸、移動相 B : アセトニトリル、A/B : 20/80、流速 : 0.6 mL/min、カラム : Acquity UPLC BEH column (C18 1.7 μ m 2.1 x 100 mm、ウォーターズ) 、カラム温度 : 40°C、検出 : UV 210 nm

2-2-5 Lau-Phe 合成活性の評価

集積培養で得られた菌株を、TGY 培地 (Table 2-2-3) 0.5 mL を入れた 96 穴ディープウェルプレートに接種し、30°C で 24 時間振とう培養した。得られた培養液 0.02 mL を 3,000 x g、10 分、4°C で集菌し、10 mM のラウリン酸ナトリウム、100 mM の L-フェニルアラニン、100 mM の Tris-HCl (pH 8.0)、10%のエタノールを含む溶液 0.1 mL に懸濁した。30°C で 16 時間の反応を行い、0.01 M NaOH および 50% エタノールを含む反応停止液 0.5 mL を添加した。生成した Lau-Phe は、フィルターろ過後に UPLC システムで分析した。分析条件は上述の通り。

2-2-6 Ste-Phe 合成活性の評価

集積培養で得られた菌株を、TGY 培地 (Table 2-2-3) 4 mL を入れた試験管に接種し、30°C で 24 時間振とう培養した。得られた培養液 0.125 mL を 3,000 x g、10 分、4°C で集菌し、10 mM のステアリン酸ナトリウム、100 mM の L-フェニルアラニン、100 mM の Tris-HCl (pH 8.0)、10%のエタノールを含む溶液 0.25 mL に懸濁した。50°C で 16 時間の反応を行い、0.1 M HCl および 90% エタノールを含む反応停止液 1 mL を添加した。生成した Ste-Phe は、フィルターろ過後に UPLC システムで分析した。分析条件は以下に記載の通り。

2-2-7 UPLC での Ste-Phe 分析

以下に示す条件で Ste-Phe の UPLC 分析を実施した。

移動相 A : 0.1% リン酸、移動相 B : アセトニトリル、A/B : 10/90、流速 : 0.6 mL/min、カラム : Acquity UPLC BEH column (C18 1.7 μ m 2.1 x 100 mm、ウォーターズ) 、カラム温度 : 40°C、検出 : UV 210 nm

2-2-8 集積培養菌の同定

集積培養で得られ、活性評価によって選抜された菌株を、テクノスルガ・ラボ社の細菌同定試験に供した。16S rDNA 遺伝子の解析に用いられたプライマーは、Table 2-2-4 に示した。系統樹の作成には、GENETYX Ver.13 (ゼネティックス) を用いた。7GGDC web server (<http://ggdc.dsmz.de/>) を用いた (Meier-Kolthoff *et al.* 2022)。

Table 2-2-1. Yeast Nitrogen Base (Approximate Formula Per Liter)

Nitrogen Source	
Ammonium Sulfate	5.0 g
Amino Acids	
L-Histidine Monohydrochloride	10.0 mg
LD-Methionine	20.0 mg
LD-Tryptophan	20.0 mg
Vitamins	
Biotin	2.0 µg
Calcium Pantothenate	400.0 µg
Folic Acid	2.0 µg
Inositol	2,000.0 µg
Niacin	400.0 µg
p-Aminobenzoic Acid	200.0 µg
Pyridoxine Hydrochloride	400.0 µg
Riboflavin	200.0 µg
Thiamine Hydrochloride	400.0 µg
Compounds Supplying Trace Elements	
Boric Acid	500.0 µg
Copper Sulfate	40.0 µg
Potassium Iodide	100.0 µg
Ferric Chloride	200.0 µg
Manganese Sulfate	400.0 µg
Sodium Molybdate	200.0 µg
Zinc Sulfate	400.0 µg
Salts	
Monopotassium Phosphate	1.0 g
Magnesium Sulfate	0.5 g
Sodium Chloride	0.1 g
Calcium Chloride	0.1 g

Table 2-2-2. Lau-Phe medium

Yeast Nitrogen Base	6.7 g
Na ₂ HPO ₄	2.0 g
Lau-Phe	1.0 g
<hr/>	
	1 L (pH 5.2)

Table 2-2-3. TGY medium

Tryptone	5.0 g
Glucose	1.0 g
Yeast extract	5.0 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
<hr/>	
	1 L (pH 7.0)

Table 2-2-4. Primers used in 16S rDNA gene sequence analysis

Primer	Sequence (5'-3')
9F	GAGTTTGATCCTGGCTCAG
785F	GGATTAGATACCCTGGTA
802R	TACNVGGGTWTCTAATCC
1510R	GGCTACCTTGTTACGA

第三節 集積培養による *N*-ラウロイル-L-フェニルアラニン (Lau-Phe) 分解菌の単離

富山県立大学内および周辺の土壌を採取し、Lau-Phe を単一炭素源とする培地に接種、集積培養を実施した (Figure 2-3-1)。その結果、複数のサンプルから Lau-Phe 培地で生育する菌株が得られた。これらの菌株を用いて Lau-Phe 分解活性を確認したところ、3 株が Lau-Phe 分解活性を示した (Figure 2-3-2a)。これらの 3 株を、LP5_18B 株、LP5_35B 株、および LP5_36B 株と、それぞれ命名した。

次に、これら 3 株の Lau-Phe 合成活性を評価したところ、いずれの株もラウリン酸と L-フェニルアラニン を基質とした反応で、Lau-Phe 生成活性を示した (Figure 2-3-2b)。これらの結果より、得られた菌株は Lau-Phe の分解活性だけでなく、ラウリン酸と L-フェニルアラニンから脱水縮合反応にて Lau-Phe を生成する活性も有していると推察された。

さらに、これらの株を用いて Ste-Phe の合成活性についても検討した結果、LP5_18B 株が 3 株の中で最も高い活性を示した (Figure 2-3-2c)。この結果より、LP5_18B 株を最有望株と選定し、その後の検討に用いることとした。

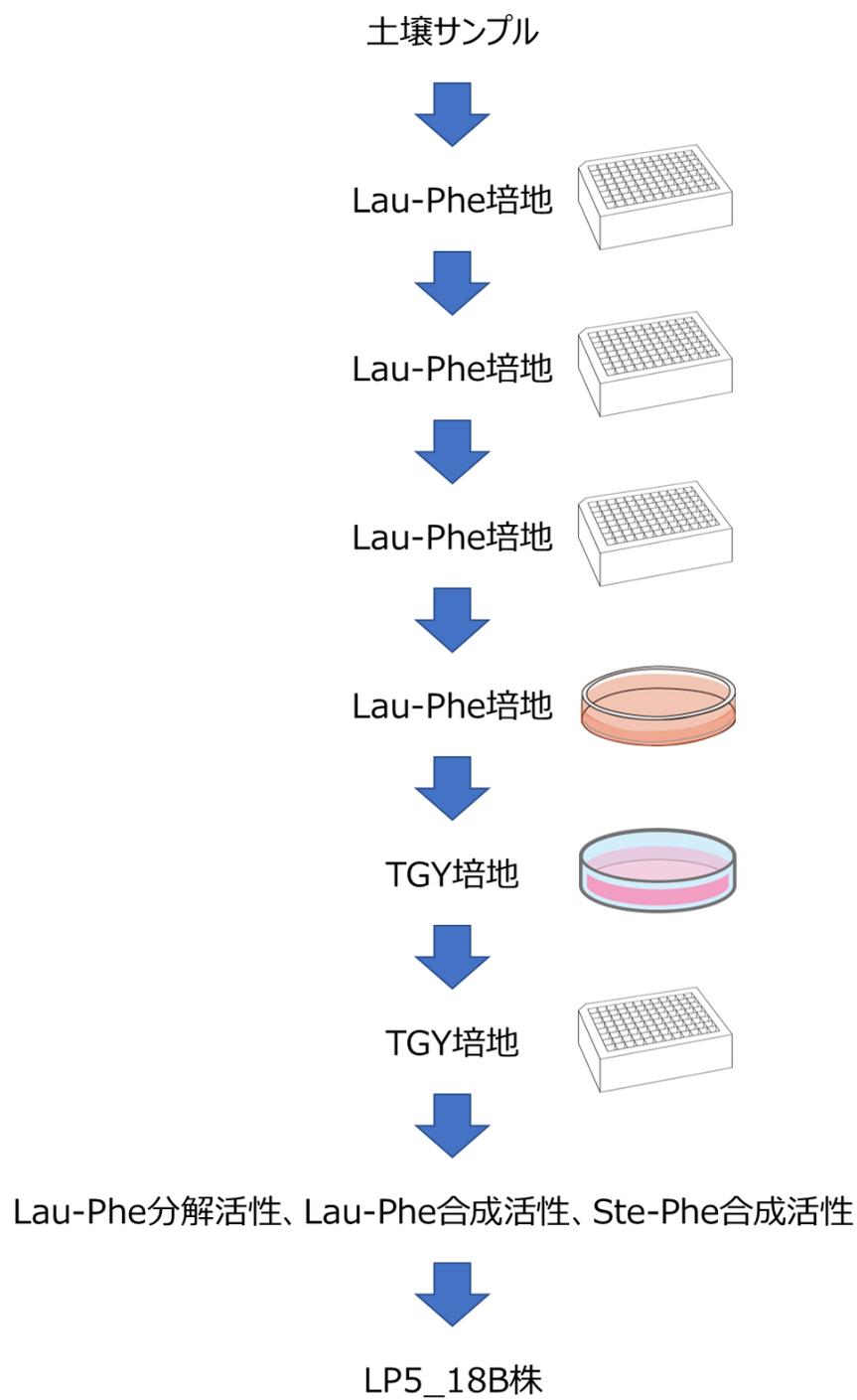


Figure 2-3-1. 集積培養と活性評価、および菌株選抜の流れ

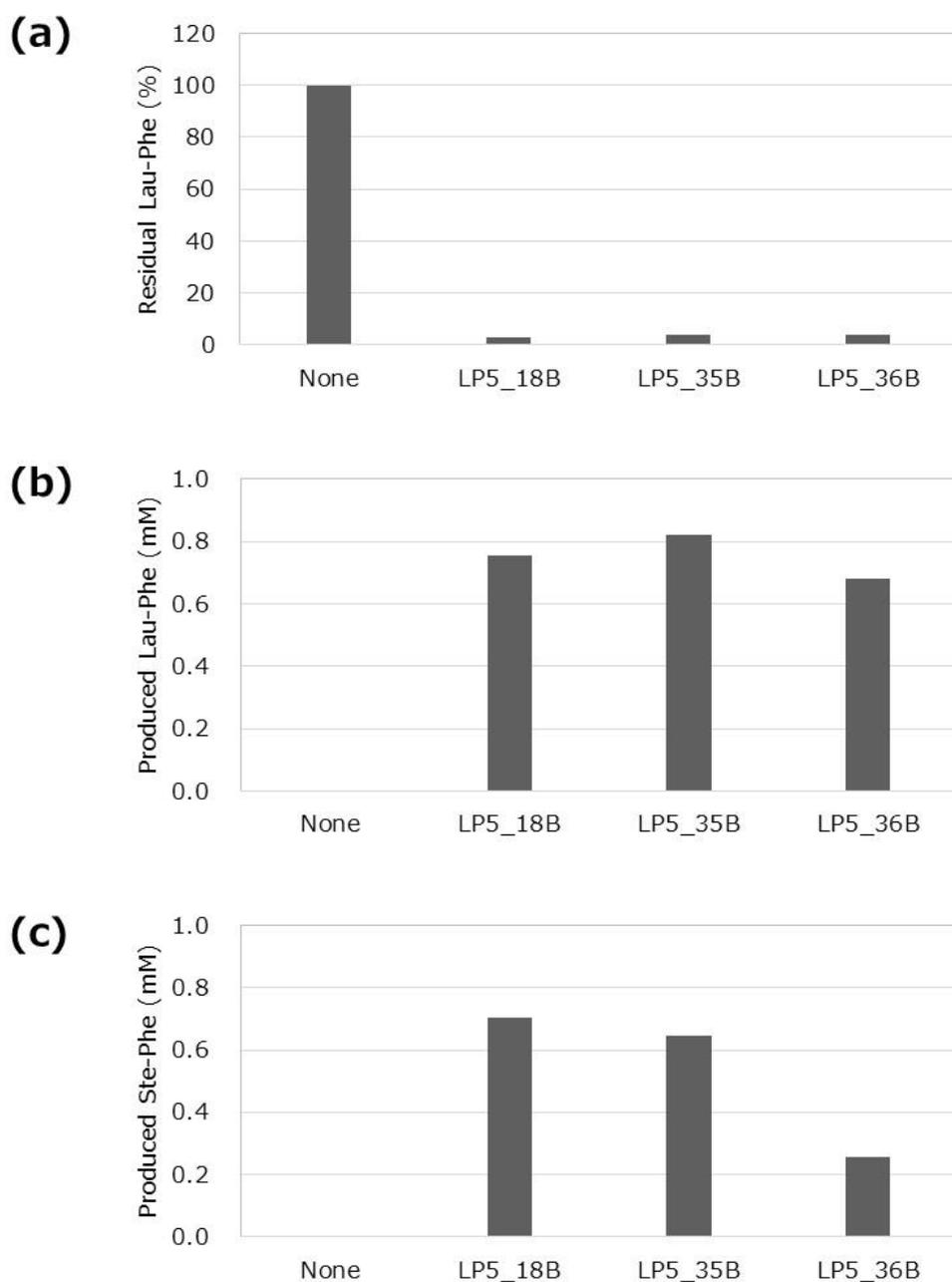


Figure 2-3-2. Lau-Phe degradation, Lau-Phe synthesis, and Ste-Phe synthesis reaction by selected three strains. (a) Lau-Phe degradation reaction: 30°C for 16 h, 5 mM Lau-Phe (pH 8.0). (b) Lau-Phe synthesis reaction: 30°C for 16 h, 10 mM Lau-Na and 100 mM L-Phenylalanine (pH 8.0). (c) Ste-Phe synthesis reaction: 50°C for 16 h, 10 mM Ste-Na and 100 mM L-Phenylalanine (pH 8.0).

第四節 LP5_18B 株の同定

選抜した LP5_18B 株について、16S rDNA 配列、形態、および生理・生化学的性状、による同定を行った。

LP5_18B 株の 16S rDNA 配列 (accession no. LC462719) は、*Burkholderia tuberum* STM678 の 16S rDNA 配列 (AJ302311) と最も高い相同性を示した (97.8%)。また、*Burkholderia unamae* MTI-641 (AY221956)、*Burkholderia unamae* MTI-641 (AY221956)、*Burkholderia bannensis* E25 (AB561874)、および *Burkholderia sacchari* CCT6771 (AF263278) の 16S rDNA 配列とは 97.3%の相同性を示した。16S rDNA 配列を用いて分子系統樹を作成したところ、LP5_18B 株は *Burkholderia tuberum* とクラスターを形成した (Figure 2-4-1)。

LP5_18B 株の特徴としては、グラム陰性、非孢子形成、好気、運動性、桿状 (0.7–0.8 μm x 1.0–1.2 μm)、が挙げられた。30°C と 37°C では生育したが、45°C では生育しなかった。カタラーゼ反応、オキシダーゼ反応、 β -ガラクトシダーゼ反応、および硝酸塩還元反応は陽性だったが、グルコース酸化活性、D-マンニトール酸化活性、メリビオース酸化活性、D-ソルビトール酸化活性、L-アラビノース酸化活性、L-ラムノース酸化活性、ウレアーゼ活性、およびアルギニンジヒドロラーゼ活性は検出されなかった。また、D-グルコース、L-アラビノース、アジピン酸は資化した、マルトース、カプリン酸は資化しなかった。

これらの特徴から、LP5_18B 株は *Burkholderia* 属の細菌と判断した。ただし、16S rDNA 配列が高い相同性を示した *B. tuberum* は、硝酸還元活性を示さず、またアジピン酸を資化しない点で LP5_18B 株とは異なっていた (Vandamme P et al. 2002)。これらの結果より、本菌株を *Burkholderia* sp. LP5_18B 株とした。

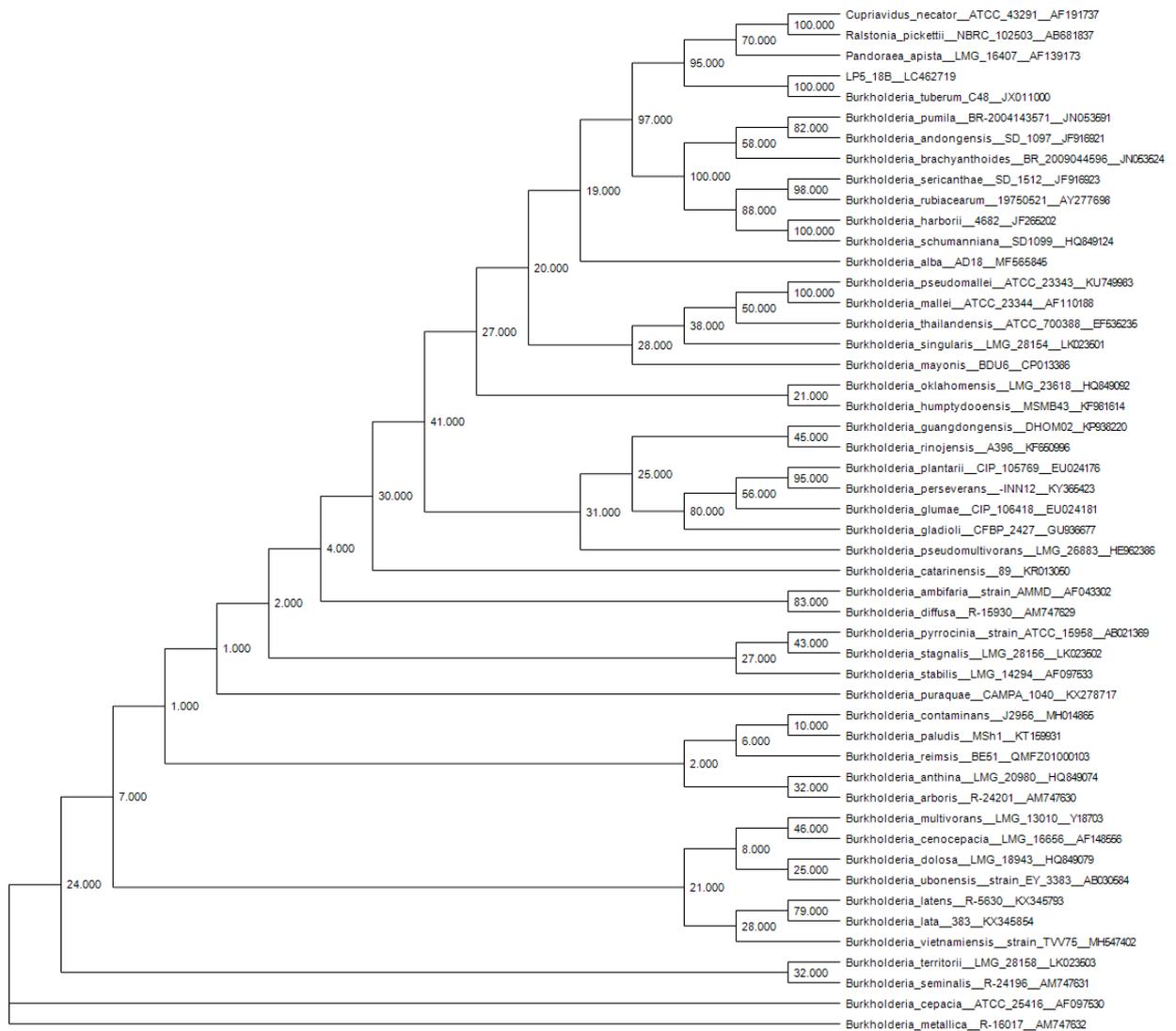


Figure 2-4-1. Phylogenetic tree based on the 16S rDNA gene sequences of strain LP5_18B and type strains of related species and three outgroup sequences from the genera *Cupriavidus*, *Ralstonia*, and *Pandoraea*. Bootstrap values are shown at branch points. Numbers represent the accession numbers of the GenBank/EMBL/DDBJ database.

第五節 まとめと考察

本章では、効率的なアシルアミノ酸の製法に用いることができる新規酵素の取得を目指し、Lau-Phe を単一炭素源とした集積培養を実施した。基質 Lau-Phe は、洗浄剤として用いられるアシルアミノ酸の多くがラウリン酸をアシル基とすること、フェニルアラニンは取り扱いと UV での分析が容易なこと、を理由に選定した。

土壌サンプルを Lau-Phe 培地に接種し、液体培地での培養と寒天培地での培養を行うことで Lau-Phe 分解菌を取得した。さらに、この中から Lau-Phe 合成活性および Ste-Phe 合成活性を示す株が選抜された。得られた菌株は、Lau-Phe をラウリン酸と L-フェニルアラニンに加水分解する活性だけでなく、ラウリン酸と L-フェニルアラニンを脱水縮合する活性、およびステアリン酸と L-フェニルアラニンを脱水縮合する活性を有していると推察された (Figure 2-5-1)。

本菌株の 16S rDNA 配列解析および性状・生育試験等により、LP5_18B 株は *Burkholderia* 属細菌であると考えられた。しかし、同様の性質を有する近縁の種が報告されていなかったため、*Burkholderia* sp. LP5_18B 株と命名した。本菌株を用いて、酵素の精製や性質解析等を進めることとした。

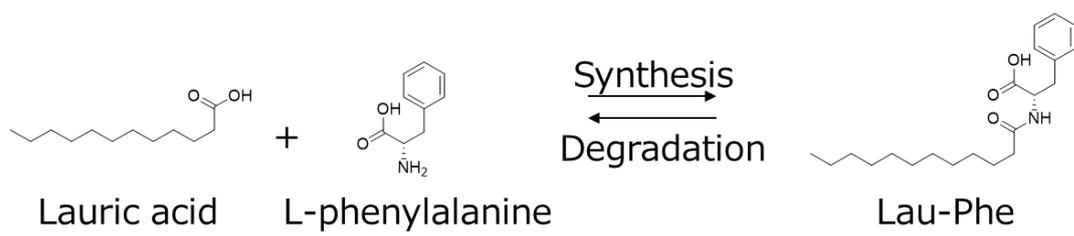


Figure 2-5-1. *Burkholderia* sp. LP5_18B showed degradation and synthesis activities of Lau-Phe.

第三章 アシルアミノ酸合成酵素の精製と酵素学的解析、および遺伝子の同定

第一節 緒言

前章で選定した有望株 *Burkholderia* sp. LP5_18B が、どのような反応で *N*-ラウロイル-L-フェニルアラニン (Lau-Phe) を分解および合成しているのか不明だったため、また同一酵素が分解と合成を行っているのか不明だったため、解析を進めることとした。本章では、アシルアミノ酸合成酵素を精製し、酵素学的諸性質の解析およびアシルアミノ酸合成反応への適用を実施した。さらに、目的酵素をコードする遺伝子も同定したので、詳細について述べる。

第二節 材料および方法

2-3-1 実験材料

N-アセチル-L-フェニルアラニン (以下、Ace-Phe) は、東京化成工業社より購入した。*N*-ステアロイル-L-フェニルアラニン (以下、Ste-Phe) は、渡辺ケミカル社より購入した。*Na*-ラウロイル-L-リジン (以下、 α -Lau-Lys) は、シグマアルドリッチ社より購入した。その他のアシルアミノ酸は、味の素社より提供された。その他の試薬類は、市販品を購入し精製せずに使用した。

2-3-2 酵素の精製

特別な記載がない限り、4-10℃で実施した。

2-3-2-1 無細胞抽出液の調製

酵素生産培地 (Table 3-2-1) 800 mL を入れた 2000 mL 容のバツフル付きフラスコに、*Burkholderia* sp. LP5_18B 株を接種し、30℃で 18 時間振とう培養を行った。得られた培養液 (合計 8 L) から 8,000 x g、15 分、4℃で集菌し、20 mM の Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に懸濁した。懸濁液を超音波破碎、遠心し (8,000 x g、15 分、4℃)、得られた上清を無細胞抽出液とした。

2-3-2-2 硫酸沈殿

無細胞抽出液を用いて 20-40%の硫酸分画を行い、得られた沈殿を 20 mM の Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に懸濁、20 mM の Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を用いて透析後、フィルターでろ過した。

2-3-2-3 Q sepharose カラムでの精製

上記サンプルを Q Sepharose HP 26/10 カラム (GE ヘルスケア) に供し、2 CV の 20 mM の Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で洗浄した後、NaCl のグラジエントにより溶出した (0-100 mM、20 CV) 。Lau-Phe 分解活性を有する画分を回収した。

2-3-2-4 Resource 15 Phe 6 mL カラムでの精製

上記サンプルに硫酸アンモニウムが 900 mM 含まれるよう調製し、Resource 15 Phe 6 mL カラム (GE ヘルスケア) に供した。2 CV の 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 、900 mM 硫酸アンモニウムで洗浄した後、硫酸アンモニウムのグラジエントにより溶出した (900-400 mM、20 CV) 。Lau-Phe 分解活性を有する画分を回収した。

2-3-2-5 Mono Q 5/50 GL カラムでの精製

上記サンプルを、20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) と Amicon Ultra-15 filter (10 kDa、メルク) を用いて濃縮とバッファー交換を行った。得られたサンプルを Mono Q 5/50 GL カラム (GE ヘルスケア) に供し、2 CV の 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で洗浄した後、NaCl のグラジエントにより溶出した (0-20 mM、80 CV) 。Lau-Phe 分解活性を有する画分を回収し、20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) と Amicon Ultra-15 filter (10 kDa) を用いて濃縮とバッファー交換を行った。

2-3-3 Lau-Phe 分解活性の測定

100 mM ホウ酸-Na 緩衝液、10 mM Lau-Phe、0.01 mL 酵素液または 100 ng/mL 精製酵素、を含む 0.2 mL の反応液 (pH 10.0) を 25°C で 15 分間反応した。反応終了後、0.1 mL の反応液と 0.9 mL の反応停止液 (1% リン酸) を混合し、フィルターろ過後に UPLC 分析、生成したフェニルアラニンを定量した。1 U は、1 μ mol のフェニルアラニンを 1 分あたりに生成する活性とした。

フェニルアラニンの UPLC 分析は、以下の条件で実施した。移動相 A : 0.1% リン酸、移動相 B : アセトニトリル、A/B : 90/10、流速 : 0.6 mL/min、カラム : Acquity UPLC BEH column (C18 1.7 μ m 2.1 x 100 mm、ウォーターズ) 、カラム温度 : 40°C、検出 : UV 254 nm

2-3-4 Lau-Phe 合成活性の測定

100 mM ホウ酸-Na 緩衝液、10 mM ラウリン酸ナトリウム、100 mM L-フェニルアラニン、100 ng/mL 精製酵素、を含む 0.2 mL の反応液 (pH 9.0) を 25°C で 15 分間反応した。反応終了後、0.1 mL の反応液と 0.9 mL の反応停止液 (90% エタノール、0.1 N HCl) を混合し、フィルターろ過後に UPLC 分析、生成した Lau-Phe を定量した。1 U は、1 μ mol の Lau-Phe を 1 分あたりに生成する活性とした。

Lau-Phe の UPLC 分析は、以下の条件で実施した。移動相 A : 0.1% リン酸、移動相 B : アセトニトリル、A/B : 20/80、流速 : 0.6 mL/min、カラム : Acquity UPLC BEH column (C18 1.7 μ m 2.1 x 100 mm、ウォーターズ) 、カラム温度 : 40°C、検出 : UV 210 nm

2-3-5 酵素の反応速度論的解析

Lau-Phe 分解反応は、2-3-3 の条件を以下のように変更して実施した。Lau-Phe の濃度は 0.01-10 mM の範囲に、精製酵素は 1 ng/mL に変更した。

Lau-Phe 合成反応は、2-3-4 の条件を以下のように変更して実施した。L-フェニルアラニンの濃度は 200 mM に、ラウリン酸ナトリウムの濃度は 0.25-10 mM の範囲に変更した。

キネティックパラメータは、KaleidaGraph (シナジーソフトウェア) を用いてカーブフィッティング法にて算出した。

2-3-6 その他の分析

タンパク質濃度は、バイオ・ラッドプロテインアッセイキット (バイオ・ラッド) を用いて測定した。スタンダードには、BSA を用いた。

酵素の分子量は、ゲル濾過カラムを用いて算出した。150 mM の塩化ナトリウムを含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した Superdex 200 10/300 GL カラム (GE ヘルスケア) に、精製酵素を供した。分子量スタンダードには、ferritin (440 kDa)、glutamate dehydrogenase (290 kDa)、lactate dehydrogenase (140 kDa)、enolase (67 kDa)、myokinase (32 kDa)、および cytochrome c (12 kDa) を用いた。

酵素の精製度は、SDS-PAGE によって確認した。染色には、クマシーブリリアントブルーR250 を用いた。

酵素に含まれる金属種は、ICP-MS によって解析した。Agilent 7700x (アジレント・テクノロジー) および ICP マルチエレメントスタンダード I (メルク) を用いた。

2-3-7 基質特異性の解析

N-アシル-L-フェニルアラニンの分解活性は、2-3-3 の条件を以下のように変更して測定した。種々の *N*-アシル-L-フェニルアラニンを 10 mM 用いて、50℃で 15 分間反応を実施して、生成したフェニルアラニンを定量した。グリシル-L-フェニルアラニン、L- α -アスパルチル-L-フェニルアラニン、Z-L-フェニルアラニンの分解活性も、同様にして測定した。Lau-Phe の分解活性を 100%とした。

N-ラウロイル-アミノ酸の分解活性も、上述の方法と同様にして測定した。分解に伴い生成したラウリン酸を、*N*-クロロメチル-4-ニトロフタルイミドを用いて誘導体化し、生成した誘導体化物を UPLC にて定量した。Lau-Phe 分解活性を 100%とした。

ラウリン酸誘導体化物の UPLC 分析は、以下の条件で実施した。移動相 A : 0.1% リン酸、移動相 B : アセトニトリル、A/B : 15/85、流速 : 0.6 mL/min、カラム : Acquity UPLC BEH column (C18 1.7 μ m 2.1 x 100 mm、ウォーターズ)、カラム温度 : 40℃、検出 : UV 230 nm

2-3-8 *N*-ラウロイル-アミノ酸の合成活性の測定

N-ラウロイル-アミノ酸の合成反応は、2-3-4 の条件を以下のように変更して実施した。ラウリン酸ナトリウムは 100 mM、各種アミノ酸は 200 mM、精製酵素は 2 µg/mL、25°C で 60 時間の反応を行った。生成した *N*-ラウロイル-アミノ酸は、UPLC および LC-MS を用いて検出した。

LC-MS の分析は、以下の条件で実施した。移動相 A : 0.1% ギ酸アンモニウム、移動相 B : アセトニトリル、A/B : 50/50、流速 : 0.3 mL/min、カラム : COSMOSIL 2.5 C18-MS-II Packed Column (2.0 x 100 mm、ナカライテスク)、カラム温度 : 40°C、検出 : ESI-negative、HCT-TK Mass Spectrometer (ブルカー) および Waters 2795 separation module (ウォーターズ)。

2-3-9 アシルアミノ酸合成酵素をコードする遺伝子のクローニング

トリプシンで処理した精製酵素を LC-MS/MS システム (nanoACQUITY UPLC および SYNAPT G2-Si Mass Spectrometer、ウォーターズ) に供し、内部配列を確認した。得られた配列を用いて BLAST 検索を実施し、相同性が確認された配列 (*Burkholderia* sp. JPY251 由来酵素、accession number: NZ_KB890086) を参照しプライマーを設計した。設計したプライマーは、Table 3-2-2 に示した。

Burkholderia sp. LP5_18B 株のゲノム DNA を鋳型にして、プライマー UP-50-F および DOWN-200-R を用いて、アシルアミノ酸合成酵素をコードする遺伝子の周辺領域を増幅した。PCR の条件は以下の通り。酵素 : KOD-Plus-Ver.2 (TOYOBO)、94°C で 2 分、(98°C で 10 秒、63°C で 10 秒、68°C で 90 秒) 25 サイクル、68°C で 90 秒。

得られた PCR 産物の配列を確認した。

2-3-10 アシルアミノ酸合成酵素の発現

Burkholderia sp. LP5_18B 株由来のアシルアミノ酸合成酵素遺伝子について、遺伝子合成をライフテクノロジーズ社に依頼した。*E. coli* での発現に適するよう、アミノ酸配列は変更せずコドンの最適化を実施した。5'末端には *Nde*I 認識配列を、3'末端には *Xho*I 認識配列を付与した。

得られた DNA 断片は、pET-22b (メルク) の *Nde*I および *Xho*I サイトに挿入した。得られたプラスミドは *E. coli* BL21 (DE3) に導入し、100 mg/L のアンピシリンナトリウムを含む Overnight Express Instant TB Medium (メルク) に接種した。硫酸亜鉛 7 水和物は、0、50、100、200 mg/L になるよう培地に添加した。

試験管を用いて 30°C で 16 時間の振とう培養を行い、得られた培養液から 9,000 x g、5 分、4°C で集菌し、20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) を用いて洗浄と懸濁を行った。得られた懸濁液中の菌体を超音波にて破砕し、遠心 (16,000 x g、10 分、4°C)、上清を菌体抽出液とした。pET22b が導入された *E. coli* BL21 (DE3) を、ネガティブコントロール株として用いた。

Table 3-2-1. Enzyme production medium

Yeast extract	10 g
Polypeptone	10 g
K ₂ HPO ₄	3 g
KH ₂ PO ₄	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
Glucose	1 g
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.1 g
	1 L

Table 3-2-2. Primers used for gene cloning

Primer	Sequence (5'-3')
UP-50-F	ccgtattagtgccgacctgtcgcgcccg
DOWN-200-R	cgctgcacgtggtcgtgacgcagcggatg

第三節 目的酵素の精製

前章で選抜した *Burkholderia* sp. LP5_18B 株から、目的酵素の精製を試みた。*Burkholderia* sp. LP5_18B 株の培養液から菌体抽出液を調製し、硫酸沈殿、Q Sepharose 26/10 カラム、Resource 15 Phe カラム、Mono Q 5/50 カラムでの精製を経て、収率 9%、精製倍率 3230 倍で Lau-Phe 分解酵素を SDS-PAGE 上で single band になるまで精製した (Figure 3-3-1)。Table 3-3-1 に精製の結果を示す。SDS-PAGE での解析により、得られた酵素の分子量は約 42 kDa であることが確認された。ゲル濾過カラムでの解析結果より、非変性状態での分子量は約 300 kDa と見積もられたことから (Figure 3-3-2)、本酵素はホモ 8 量体で存在していることが示唆された。

Table 3-3-1. Purification of the enzyme from *Burkholderia* sp. LP5_18B

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification [↵] (fold) [↵]
Cell-free-extract	4020	1180	0.294	100	1 [↵]
(NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation	784	692	0.883	58	3 [↵]
Q Sepharose 26/10	7.74	563	72.7	48	247 [↵]
Resource 15 Phe	0.835	354	424	30	1440 [↵]
Mono Q 5/50	0.118	112	949	9	3230 [↵]

One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme that produces 1 μ mol of phenylalanine from Lau-Phe per min at 25°C and pH 10.0.

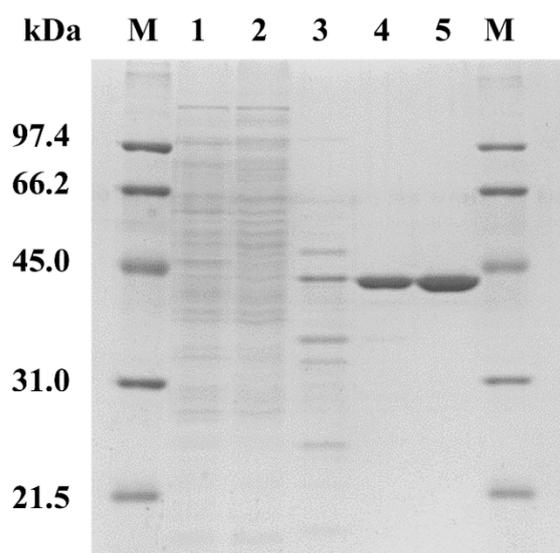


Figure 3-3-1. SDS-PAGE analysis of the protein fractions obtained in the various purification steps. Lane M, standard protein mixture containing phosphorylase *b* (97.4 kDa), serum albumin (66.2 kDa), ovalbumin (45.0 kDa), carbonic anhydrase (31.0 kDa), and a trypsin inhibitor (21.5 kDa); lane 1, cell-free extract; lane 2, after (NH₄)₂SO₄ fractionation; lane 3, after Q Sepharose 26/10 column chromatography; lane 4, after Resource 15 Phe column chromatography; and lane 5, after Mono Q 5/50 column chromatography. The gel was stained with Coomassie Blue.

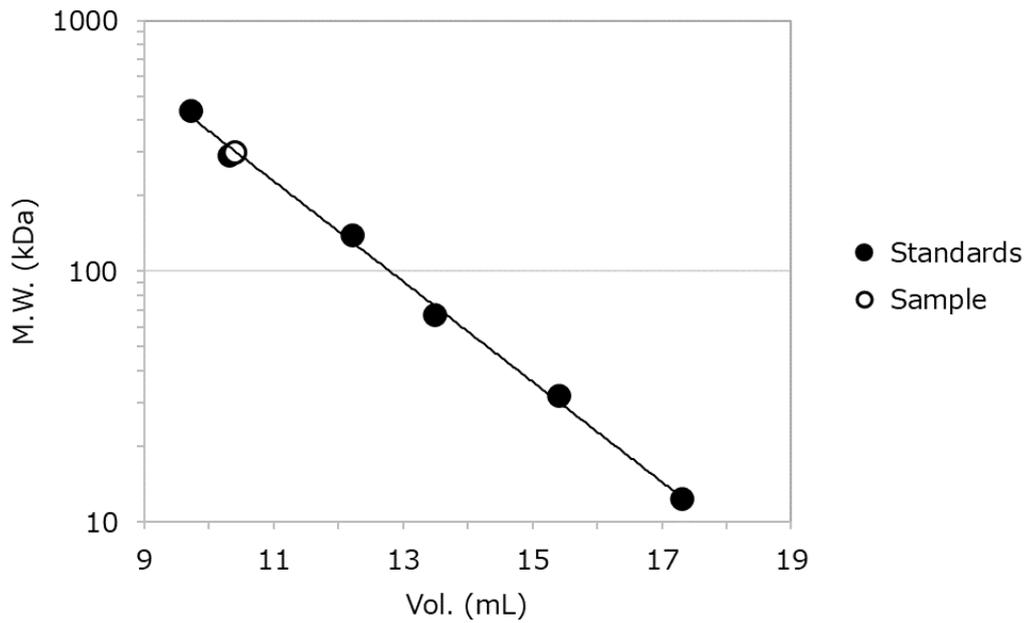


Figure 3-3-2. Analytical gel filtration chromatography of the purified enzyme. The protein standards, in order of decreasing molecular weight, were ferritin (440 000), glutamate dehydrogenase (290 000), lactate dehydrogenase (140 000), enolase (67 000), myokinase (32 000) and cytochrome c (12 400).

第四節 酵素学的諸性質の解析

精製し得られた酵素について、温度と pH が活性および安定性に与える影響を確認した。Lau-Phe 分解活性に反応温度が与える影響を確認したところ、最大活性は 70℃で得られることが明らかとなった (Figure 3-4-1a)。様々な温度で保温し残存活性を確認したところ、70℃での保温後でも 98%、80℃の保温後でも 56%の活性を維持していることが確認された (Figure 3-4-1b)。同様に、pH についても検討したところ、Lau-Phe 分解活性は pH 12.0 以上で最大になると推察された (Figure 3-4-1c)。一方、Lau-Phe 合成活性は pH 9.0 で最大となることが確認された (Figure 3-4-1d)。Figure 3-4-1e は、Lau-Phe 合成活性/Lau-Phe 分解活性の比を示している。最大値は pH 9.0 (ホウ酸-Na 緩衝液) で得られ、この時の比活性は 98 U/mg (合成) および 608 U/mg (分解) と示された。pH 安定性についても確認したところ、pH 5.0-12.0 の範囲で安定であった (Figure 3-4-1f)。

次に、基質濃度が酵素活性に与える影響を確認したところ、Lau-Phe (Lau-Phe 分解) に対する K_m 値は 0.024 mM、ラウリン酸 (Lau-Phe 合成) に対する K_m 値は 2.2 mM と算出された。 V_{max} 値は、それぞれ 951 U/mg (Lau-Phe 分解)、225 U/mg (Lau-Phe 合成) と算出された。L-フェニルアラニンに対する K_m 値および V_{max} 値は、L-フェニルアラニン濃度 10-200 mM の範囲で活性が直線的に上昇したため算出できなかった (Lau-Phe 合成)。

基質特異性を確認するため、様々なアシルアミノ酸を基質とした分解反応を実施した。Table 3-4-1 に示すように、Na-ラウロイル-中性アミノ酸、Na-ラウロイル-疎水性アミノ酸、および Na-ラウロイル-塩基性アミノ酸に広く作用することが確認された。一方、Nε-ラウロイル-アミノ酸や N-ラウロイル-酸性アミノ酸には作用しなかった。Ste-Phe を基質とした場合は Lau-Phe を基質とした場合と比較し 4%の活性を示したが、Ace-Phe を基質とした際には活性が見いだされなかった。ペプチドや保護アミノ酸についても検討したが、活性は示さなかった。

金属イオン (1 mM) や阻害物質の影響を確認したところ、 Fe^{2+} と Cu^{2+} 添加時にそれぞれ 12% と 8%の活性低下が確認された。 Ca^{2+} 添加時には、9%の活性向上が確認された。 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、および Ni^{2+} の添加時には、大きな影響は確認されなかった (96%-100%)。阻害物質の影響については、EDTA、PCMB、2-メルカプトエタノール、DTT の添加で 11-22%の活性低下が確認されたが、他の化合物では大きな影響が見られなかった (Table 3-4-2)。

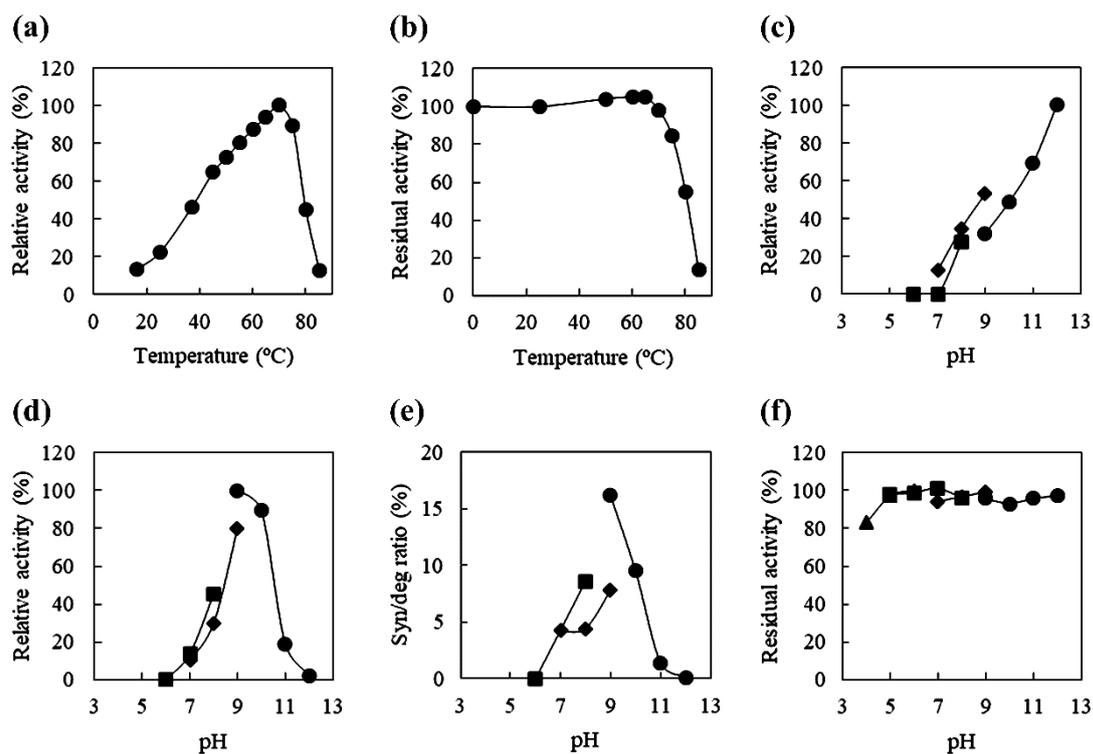


Figure 3-4-1. Effects of temperature and pH on enzyme activity and stability. (a) Optimal temperature: enzyme activity was measured at the indicated temperatures under the standard assay conditions. (b) Thermostability: purified enzyme was incubated at the indicated temperatures for 60 min in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0). After incubation, the residual enzyme activity was measured. (c) Optimal pH for the Lau-Phe degradation reaction: enzyme activity was measured under the standard assay conditions, except that the following buffers were used at a final concentration of 100 mM in the reaction mixture: phosphate-K buffer (■), Tris-HCl buffer (◆), or sodium borate buffer (●). (d) Optimal pH for the Lau-Phe synthesis reaction: Lau-Phe synthesis activity was measured at the indicated pH values with the same 100 mM buffers as described above (c). (e) Synthesis/degradation (Syn/deg) ratio: the ratio (%) of Lau-Phe synthesis activity (U/mg) to Lau-Phe degradation activity (U/mg) at the indicated pH value. (f) pH stability: purified enzyme was incubated for 60 min at the indicated pH values with the same 100 mM buffers as described above in (c), except that a sodium citrate buffer was used for pH 4.0 to 6.0 (▲). After incubation, the residual enzyme activity was measured.

Table 3-4-1. Substrate specificity of the enzyme from *Burkholderia* sp. LP5_18B

Substrate	Relative activity (%)
<i>N</i> -lauroyl-L-phenylalanine (Lau-Phe)	100
<i>N</i> -lauroyl-L-alanine	104
<i>N</i> -lauroyl-DL-aspartic acid	0
<i>N</i> -lauroyl-L-glutamic acid	0
<i>N</i> -lauroyl-glycine	27
<i>N</i> -lauroyl-L-glutamine	53
<i>N</i> -lauroyl-L-arginine (Lau-Arg)	6
<i>N</i> α -lauroyl-L-lysine	81
<i>N</i> ϵ -lauroyl-L-lysine	0
<i>N</i> -lauroyl-L-serine	30
<i>N</i> -lauroyl-L-valine	85
<i>N</i> -lauroyl-L-pyrrolidone carboxylic acid	0
<i>N</i> -lauroyl-L-theanine	21
<i>N</i> -acetyl-L-phenylalanine	0
<i>N</i> -stearoyl-L-phenylalanine	4
glycyl-L-phenylalanine	0
L-alanyl-L-phenylalanine	0
L- α -aspartyl-L-phenylalanine	0
L-arginyl-L-phenylalanine	0
Z-L-phenylalanine	0

Degradation activity was measured after 15 min at 50°C and pH 10.0.

Table 3-4-2. Effects of inhibitors on the enzyme activity

Reagent	Relative activity (%)
None	100
EDTA	87
1,10-phenanthroline	103
8-quinolinol	100
2,2'-dipyridyl	105
iodoacetamide	96
PCMB	89
<i>N</i> -ethylmaleimide	99
Leupeptin	98
2-mercaptoethanol	81
DTT	78
PMSF	93
NaN ₃	101

The enzyme was incubated for 1 h at 25°C with 1 mM of reagent. The residual activity is relative to the standard assay without any reagent.

第五節 精製酵素を用いた各種アシルアミノ酸の合成

ラウリン酸とアミノ酸を基質として、精製酵素を用いた各種ラウロイルアミノ酸の合成を試みた。結果を Table 3-5-1 に示す。ラウリン酸と L-フェニルアラニンから、対ラウリン酸のモル収率 51% で Lau-Phe が生成した (51 mM の蓄積、Figure 3-5-1)。また、N-ラウロイル-L-アルギニン (以下、Lau-Arg) は対ラウリン酸のモル収率 89% で生成した (89 mM の蓄積、Figure 3-5-2)。Lau-Arg は溶解度が低いため、反応液中で析出している様子が観察された。他の N-ラウロイル-中性アミノ酸、-疎水性アミノ酸、-塩基性アミノ酸も生成が確認され、収率は 2%-28% だった。N-ラウロイル-L-リジンに関しては、 α -ラウロイル体と ϵ -ラウロイル体、どちらが生成しているのか判断できなかった。N-ラウロイル-酸性アミノ酸および N-ラウロイル-D-アミノ酸に関しては、生成が認められなかった。標品が入手できなかった生成物に関しては、LC-MS での生成確認のみで、収率は算出できなかった。マスクロマトグラフを示す (Figure 3-5-3、3-5-4)。

Table 3-5-1. Production of *N*-lauroyl-amino acids from lauric acid and various amino acids

Product	Yield (%)	LC-MS
<i>N</i> -lauroyl-L-phenylalanine (Lau-Phe)	51	+
<i>N</i> -lauroyl-L-alanine	4.7	+
<i>N</i> -lauroyl-DL-aspartic acid	0	N.D.
<i>N</i> -lauroyl-L-glutamic acid	0	N.D.
<i>N</i> -lauroyl-glycine	5.5	+
<i>N</i> -lauroyl-L-asparagine	Unk	+
<i>N</i> -lauroyl-L-glutamine	8.2	+
<i>N</i> -lauroyl-L-arginine (Lau-Arg)	89	+
<i>N</i> -lauroyl-L-lysine	28	+
<i>N</i> -lauroyl-L-histidine	Unk	+
<i>N</i> -lauroyl-L-serine	13	+
<i>N</i> -lauroyl-L-threonine	Unk	+
<i>N</i> -lauroyl-L-valine	23	+
<i>N</i> -lauroyl-L-leucine	Unk	+
<i>N</i> -lauroyl-L-isoleucine	Unk	+
<i>N</i> -lauroyl-L-methionine	Unk	+
<i>N</i> -lauroyl-L-tryptophan	Unk	+
<i>N</i> -lauroyl-L-tyrosine	Unk	+
<i>N</i> -lauroyl-L-proline	0	N.D.
<i>N</i> -lauroyl-L-pyrrolidone carboxylic acid	0	N.D.
<i>N</i> -lauroyl-L-theanine	2.6	+
<i>N</i> -lauroyl-D-phenylalanine (Lau-D-Phe)	0	N.D.
<i>N</i> -lauroyl-D-arginine (Lau-D-Arg)	0	N.D.

The condensation reaction was performed in 100 mM sodium borate buffer, pH 9.0, containing 2 µg/mL purified enzyme, 100 mM sodium laurate, and 200 mM amino acid. The reaction was carried out for 60 h at 25 °C in a solution volume of 200 µL. Unk (unknown, standard was not available); + (detected); N.D. (not detected)

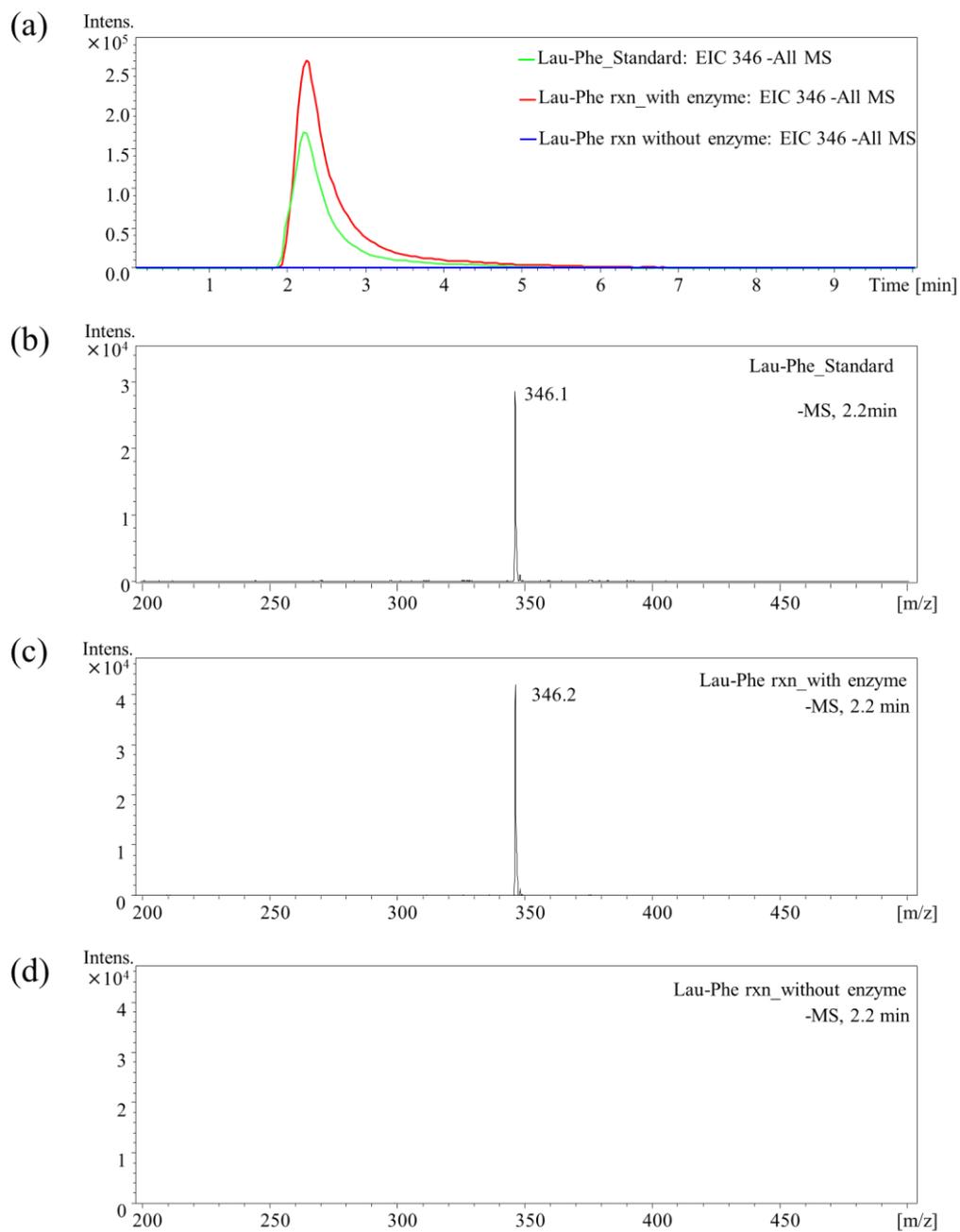


Figure 3-5-1. (a) LC-MS chromatograms of Lau-Phe (green line), Lau-Phe synthesis reaction with the enzyme (red line) and without the enzyme (blue line) at m/z 346. LC-MS spectrum of a peak eluting at 2.2 min of Lau-Phe (b), Lau-Phe synthesis reaction with the enzyme (c) and without the enzyme (d).

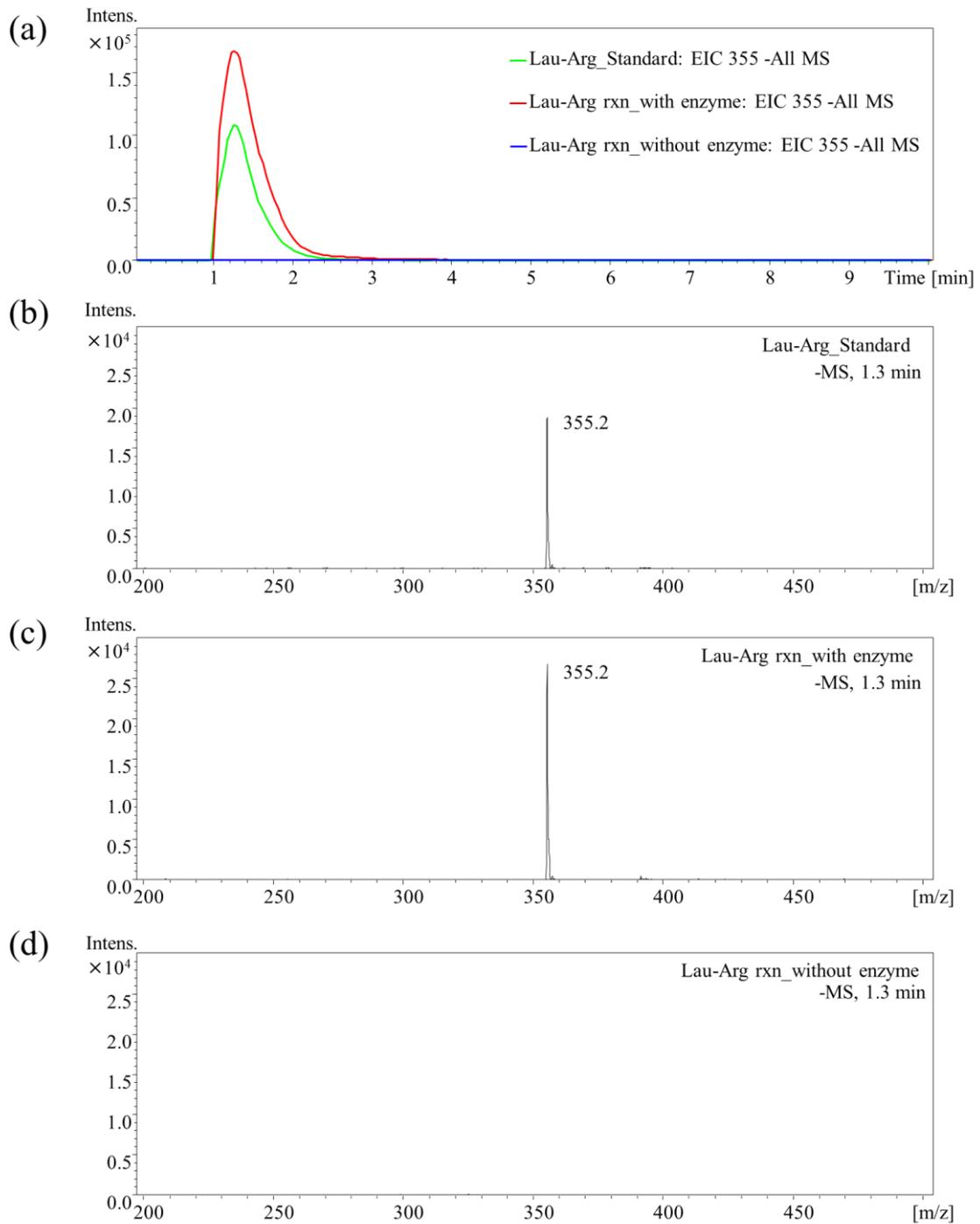


Figure 3-5-2. (a) LC-MS chromatograms of Lau-Arg (green line), Lau-Arg synthesis reaction with the enzyme (red line) and without the enzyme (blue line) at m/z 355. LC-MS spectrum of a peak eluting at 1.3 min of Lau-Arg (b), Lau-Arg synthesis reaction with the enzyme (c) and without the enzyme (d).

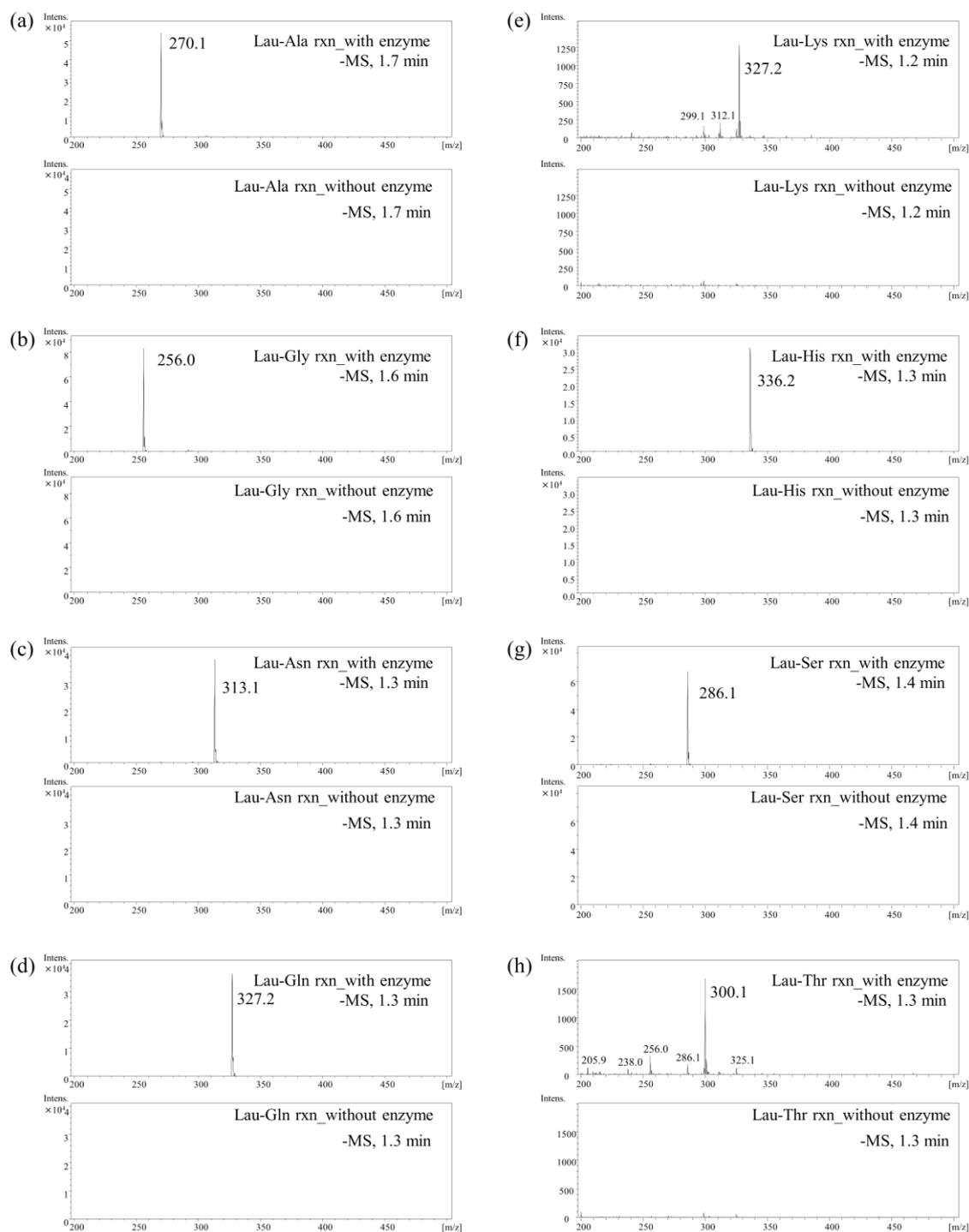


Figure 3-5-3. LC-MS spectrum of synthesis reaction with or without the enzyme for *N*-lauroyl-L-alanine (a), *N*-lauroyl-glycine (b), *N*-lauroyl-L-asparagine (c), *N*-lauroyl-L-glutamine (d), *N*-lauroyl-L-lysine (e), *N*-lauroyl-L-histidine (f), *N*-lauroyl-L-serine (g), and *N*-lauroyl-L-threonine (h).

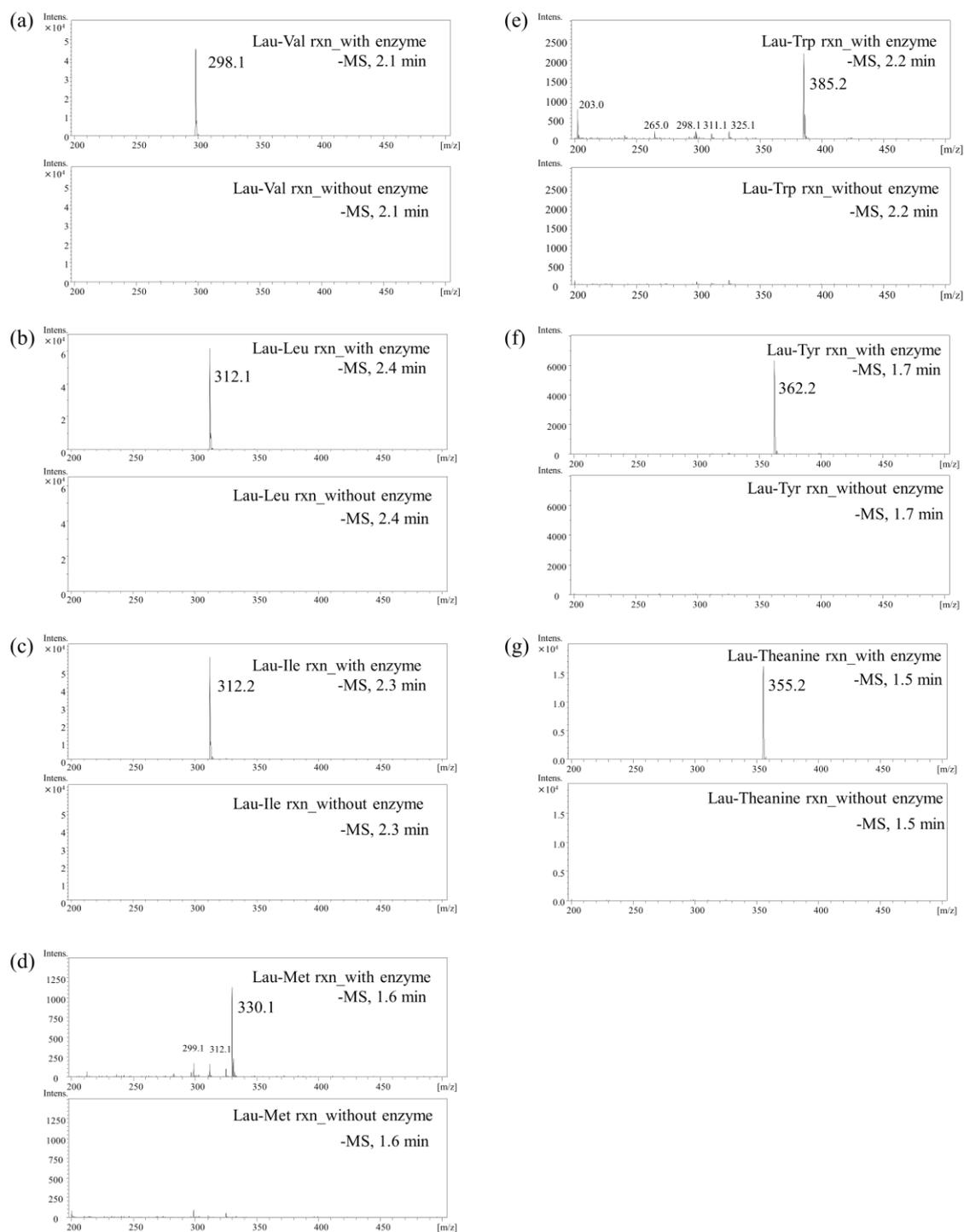


Figure 3-5-4. LC-MS spectrum of synthesis reaction with or without the enzyme for *N*-lauroyl-L-valine (a), *N*-lauroyl-L-leucine (b), *N*-lauroyl-L-isoleucine (c), *N*-lauroyl-L-methionine (d), *N*-lauroyl-L-tryptophan (e), *N*-lauroyl-L-tyrosine (f), and *N*-lauroyl-L-theanine (g).

第六節 アシルアミノ酸合成酵素遺伝子の同定

取得したアシルアミノ酸合成酵素をコードする遺伝子を同定、クローニングするために、精製酵素を用いて検討を行った。精製酵素をトリプシンで処理し LC-MS/MS にて内部配列を確認したところ、PPPAPAZPVXF、SPXDMXTFTED、および VETAADWGTYYXVHAYTPE の配列が得られた (X: L または I, Z: K または Q)。これらの配列は、*Burkholderia* 属細菌のアミド加水分解酵素と推定されるアミノ酸配列と相同性を示した。具体的には、*Burkholderia tuberum* WSM4176 株、*Burkholderia mimosarum* NBRC 106338 株、*Burkholderia nodosa* DSM 21604 株由来のアミド加水分解酵素とよく一致した (accession no. WP_026226399、WP_028231170、WP_028204446)。*Burkholderia* sp. JPY251 株由来のアミド加水分解酵素遺伝子と推定されている ORF (accession no. NZ_KB890086、locus_tag B020_RS0121740) の、周辺配列を参考にしてプライマーを設計した。ORF の上流 50 bp と下流 200 bp に対応するプライマーを用いて、*Burkholderia* sp. LP5_18B 株のゲノム DNA を鋳型に PCR を行ったところ、1.6 kbp の DNA 断片が得られた。その DNA 配列はアミド加水分解酵素遺伝子の配列と相同性が確認されたため、目的の酵素をコードする遺伝子配列を得たと判断した。具体的には、*Burkholderia* sp. CCGE1002 株由来アミド加水分解酵素遺伝子 (accession no. CP002014、locus_tag BC1002_4774) と 83%、*Burkholderia sprentiae* WSM5005 株由来アミド加水分解酵素遺伝子 (accession no. CP017562、locus_tag BJG93_22720) と 83% の相同性を示した。ORF 全長で 1,323 bp、GC 含量は 63.3%、440 アミノ酸からなる酵素で、分子量は 47.4 kDa と算出された (accession no. BBI47489)。SDS-PAGE での解析結果と比較し、やや大きな値であった。この ORF 内には、LC-MS/MS で確認された 3 断片の配列も含まれていた。

全体のアミノ酸配列は、*Burkholderia* 属由来のアミド加水分解酵素と 73%–85% の相同性を示した。PDB に対して検索すると、相同性 28%–36% のアミド加水分解酵素が確認された。具体的には、*Paraburkholderia phytofirmans* 由来アミド加水分解酵素 (3MKV)、*Burkholderia lata* 由来プロリダーゼ (3N2C)、*Alteromonas macleodii* 由来 Xaa-Pro ジペプチダーゼ (2QS8)、亜鉛依存型アルギニンカルボキシペプチダーゼ (3DUG)、*Caulobacter vibrioides* 由来 L-リジンおよび L-アルギニンカルボキシペプチダーゼ (3MTW)、などであった。これらは全て金属酵素であり、亜鉛かマグネシウムを含む (Xiang DF *et al.* 2009, 2010)。ICP-MS での解析結果から、本酵素はサブユニット当たり 2 モルの亜鉛と 3 モルのマグネシウムを含むことが判明しており、PDB の登録情報ともよく一致していた。

次に、同定した遺伝子を pET-22b ベクターに導入し、*E. coli* BL21 (DE3) を形質転換して、目的活性の確認を試みた。発現株から菌体抽出液を調製し Lau-Phe 分解活性を測定したところ、活性は低かったが (0.078 U/mL)、硫酸亜鉛および塩化コバルトを培地に添加すると活性が向上することを見出した。硫酸亜鉛 7 水和物を 50、100、200 mg/L になるよう添加すると、活性は 0.56、0.80、1.0 U/mL へと向上した。同様に、塩化コバルト 6 水和物を 50、100、200 mg/L になるよう添加すると、活性は 0.23、0.30、0.26 U/mL へと向上した。しかし、SDS-PAGE 上では目的酵素

のバンドは確認できず、*E. coli*での発現量は少ないと推察された。硫酸マグネシウム7水和物を添加した場合には、活性向上は認められなかった。

第七節 まとめと考察

前章で単離した *Burkholderia* sp. LP5_18B 株から目的酵素を精製、単離し性質解析と遺伝子クローニング、*E. coli* 発現株の構築を行った。

得られた精製酵素は、Lau-Phe の分解反応だけではなく合成反応も触媒したため、*Burkholderia* sp. LP5_18B 株が示した両活性は単一の酵素によるものと推察された。また、取得した酵素が目的のアシルアミノ酸合成酵素だと考えられた。

温度や pH の影響を確認したところ、70℃でも失活せず、pH 5-12 の範囲で安定であると確認された。工業製法に用いるためには、失活が起こりづらい安定な酵素が望ましい。本酵素は安定性が高く、活用しやすい酵素であった。

基質特異性を確認したところ、Lau-Phe の他、Lau-Arg も高収率で生成させられることが明らかとなった。Lau-Arg は反応液中で析出している様子が観察され、89%もの高収率で脱水縮合反応が進む理由として、生成物の系外除去による平衡の移動が考えられた。様々な基質に対する反応を検討し、多くのアミノ酸を基質とすることを確認したが、酸性アミノ酸や D アミノ酸は基質としないことが判明した。これらのアミノ酸を用いて反応させたい場合は、酵素改変や新規酵素の探索が必要になると考えられる。

遺伝子を同定しクローニングするため、精製酵素の内部配列を確認した。データベース上に相同性を有する配列を見出したことで、PCR での遺伝子単離が可能となった。ただし、相同性を示した配列はアミド加水分解酵素と想定されているのみで、アシルアミノ酸の分解または合成酵素とは想像されない配列であった。今回は集積培養によって新規酵素を単離したため、このように容易には想像できない酵素を得ることができた。相同性を有する酵素や、基質特異性などから、本酵素は脱水縮合反応も触媒するアミノアシラーゼと考えるのが妥当と判断した (Figure 3-7-1)。

最後に、得られた遺伝子の *E. coli* での発現を試みた。活性を確認し、亜鉛またはコバルトの添加による活性向上は達成したが、活性は低く、また SDS-PAGE では目的のバンドが確認できていない。効率的に反応を進めるためには酵素を *E. coli* で大量に発現させることが必要なため、今後は発現量を向上させるためのプロモーター変更やアミノ酸配列の改変、またはホモログ酵素の探索などが必要になると考えられる。

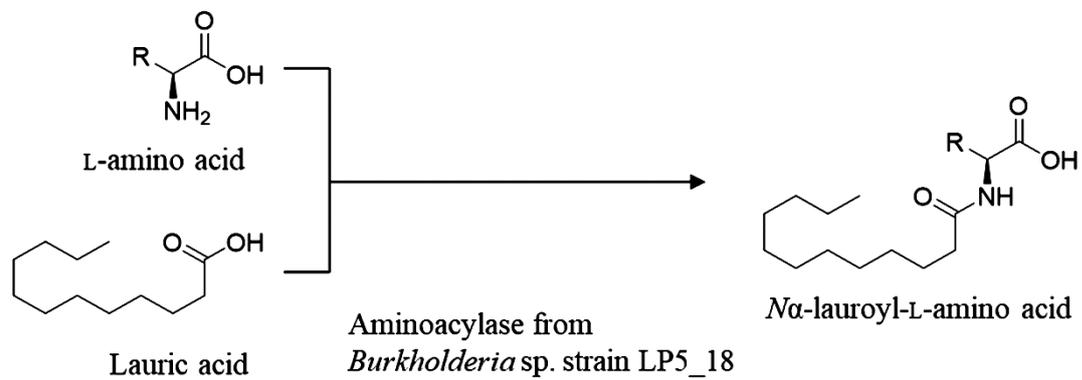


Figure 3-7-1. Aminoacylase from *Burkholderia* sp. LP5_18B showed synthesis activities for various *N*α-lauroyl-L-amino acids.

第四章 ベンズアルデヒドの酵素合成ルート構築

第一節 緒言

ベンズアルデヒドを酵素的に生成させる場合の原料としては、ベンゼン環を有するフェニルアラニンが妥当と考えられた。フェニルアラニンを原料とするベンズアルデヒドの製法としては、担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* を用いる手法が報告されている。この方法では、フェニルアラニンからケイ皮酸と安息香酸を経てベンズアルデヒドが得られる。しかし、シナムアルデヒドから安息香酸への経路が明らかではなく、また、ベンズアルデヒドの対フェニルアラニン収率は7%程度と低かった (Jensen KA *et al.* 1994, Figure 4-1-1a)。他にも、*Lactobacillus plantarum* を用いる手法が報告されているが、フェニルピルビン酸からベンズアルデヒドへの変換が非酵素的で目的外の反応も進行するためか、対フェニルアラニン収率は3%程度と低かった (Nierop Groot MN *et al.* 1998, Figure 4-1-1b)。 *Trametes suaveolens* や *Ischnoderma benzoinum* と樹脂を用いる手法も報告されているが、いずれもベンズアルデヒドの生成経路は特定されておらず、また対フェニルアラニン収率は最大でも30%程度であった (Lomascolo A *et al.* 2001, Krings U *et al.* 1996)。これらの手法を用いた場合に収率や生産性が低かった原因として、非酵素的な反応を用いていることや、複雑な経路を用いていること、経路が不明なため酵素活性の増強を実施できていないことが考えられた。

そこで、フェニルアラニンから数段階の酵素反応を経てベンズアルデヒドを生成させる、新規ルートの確立を試みることにした。具体的には、L-フェニルアラニンから、フェニルピルビン酸、(S)-マンデル酸、ベンゾイルギ酸を経由し、ベンズアルデヒドを生成させるルートについて検討した。L-フェニルアラニンからフェニルピルビン酸を生成させる酵素としてはアミノ酸デアミナーゼ (以下、AAD)、フェニルピルビン酸から(S)-マンデル酸を生成させる酵素としては4-ヒドロキシマンデル酸合成酵素 (以下、HMAS)、(S)-マンデル酸からベンゾイルギ酸を生成させる酵素としては(S)-マンデル酸脱水素酵素 (以下、SMDH)、ベンゾイルギ酸からベンズアルデヒドを生成させる酵素としてはベンゾイルギ酸脱炭酸酵素 (以下、BFDC) を用いた (Figure 4-1-1c)。本章では、これらの酵素4種を用いる新規ルートの検証と、収率を制限していることが判明したHMASのスクリーニングについて述べる。

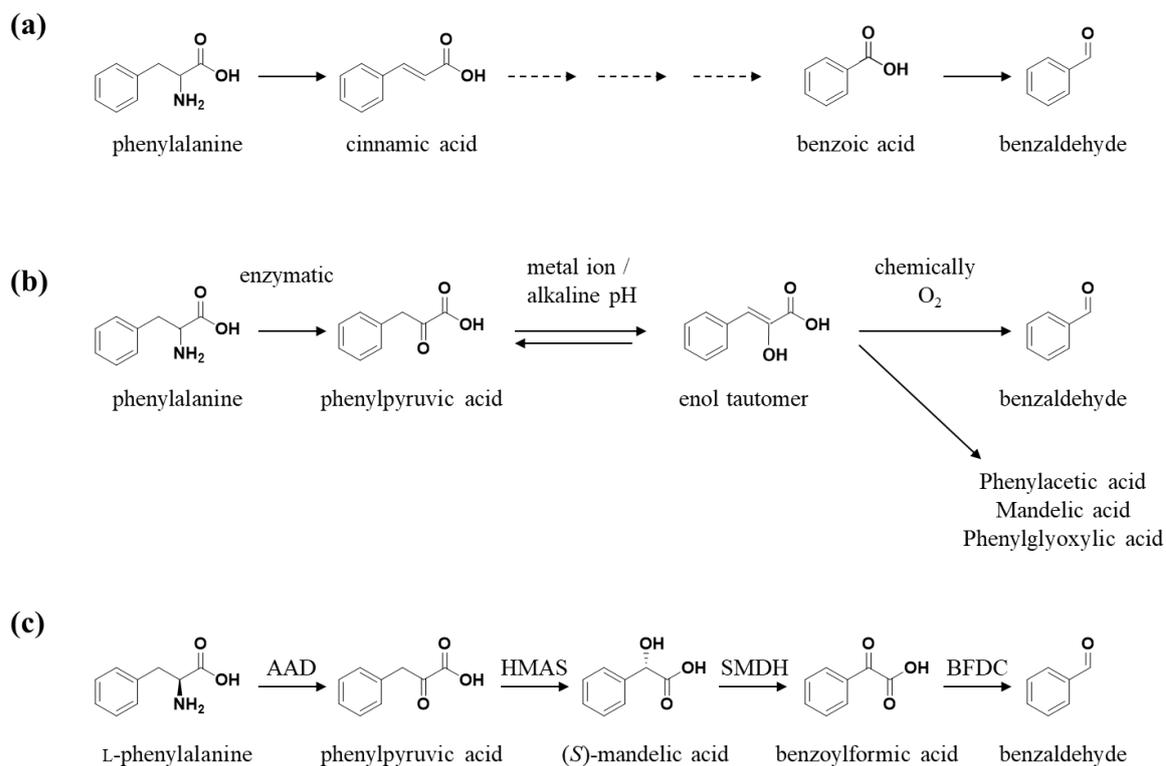


Figure 4-1-1. Benzaldehyde synthesis from phenylalanine by *Phanerochaete chrysosporium* (a), *Lactobacillus plantarum* (b), and constructed novel route (c). The dashed lines are hypothetical. AAD, Amino acid deaminase; HMAS, 4-hydroxymandelate synthase; SMDH, (S)-mandelate dehydrogenase; BFDC, Benzoylformate decarboxylase.

第二節 材料および方法

4-2-1 プラスミドおよびプライマー

HMAS 発現プラスミド (Table 4-2-1)、およびその他のプラスミドを示す (Table 4-2-2)。用いたプライマーは、Table 4-2-3 に記載する。

4-2-2 菌株の構築

AAD の発現株は以下のようにして構築した。変異型の酸性フォスファターゼプロモーター (PphoC) を有するプラスミド pSFN_Sm_Aet (WO2006075486)、および *aad* 遺伝子を有するプラスミド pTB2 (US20100221795A1) を用いた。プライマー NdeI-aad-5R6R8L-F および aad-HindIII-R を用いた PCR を行い、*aad* 遺伝子配列を含む DNA 断片を増幅し、pSFN Sm_Aet の NdeI および HindIII サイトに導入した。得られたプラスミドを pSFN-aad と命名した。このプラスミドが導入された *E. coli* JM109 を、AAD 発現株とした。

HMAS の発現株は以下のようにして構築した。*Amycolatopsis orientalis* 由来 HMAS (HMAS Ao, accession number: WP_037311069) の遺伝子配列を、*E. coli* での発現用に最適化した (accession number: LP933331)。遺伝子合成はライフテクノロジーズ社で実施された。目的の DNA 断片が導入されたプラスミドとプライマー NdeI-hmaS Ao-F および hmaS Ao-XhoI-R を用いた PCR を行い、hmaS Ao 遺伝子配列を含む DNA 断片を増幅し、pET-22b の NdeI および XhoI サイトに導入した。得られたプラスミドを pET22-hmaS Ao と命名した。このプラスミドが導入された *E. coli* BL21 (DE3) を、HMAS Ao 発現株とした。同様にして、*Streptomyces coelicolor* 由来 HMAS (HMAS Sc, accession number: WP_011028841, LP933333) 発現株を構築した。

Amycolatopsis balhimycina 由来 HMAS (HMAS Ab, accession number: CAC48371) の配列最適化と遺伝子合成は、ユーロフィン社で実施された (accession number: LP933350)。目的の DNA 断片を、pET-22b の NdeI および XhoI サイトに導入し、HMAS Ao と同様に発現株を構築した。HMAS Ar (*Actinoplanes rectilineatus*, accession number: WP_045739980, LP933356), HMAS As (*Actinoplanes subtropicus*, accession number: WP_030437841, LP933358), HMAS At (*Actinoplanes teichomyceticus*, accession number: CAG15040, LP933339), HMAS Ka (*Kibdelosporangium aridum*, accession number: WP_051895522, LP933352), HMAS Nc (*Nonomuraea coxensis*, accession number: WP_026214630, LP933354), HMAS Rr (*Rhodococcus rhodnii*, accession number: WP_037255771, LP933337), HMAS Sr (*Streptomyces rimosus*, accession number: WP_050515337, LP933360), HMAS St (*Streptomyces toyocaensis*, accession number: AAM80551, LP933335)、および HMAS Ha (*Herpetosiphon aurantiacus*, accession number: ABX04531, LP933362) についても、HMAS Ar 発現株と同様にして発現株を構築した。

SMDH および BFDC 発現株は、以下のようにして構築した。*Pseudomonas putida* 由来 SMDH (accession Number: BAM38408) の遺伝子配列および *Pseudomonas putida* 由来 BFDC (accession Number: BAM38407) の遺伝子配列を、*E. coli* での発現用に最適化した (accession number: LP933345, LP933347)。遺伝子合成はライフテクノロジーズ社で実施された。目的の DNA 断片が導入されたプラスミドとプライマー-NdeI-smdh-F および smdh-XhoI-R を用いた PCR を行い、smdh 遺伝子配列を含む DNA 断片を増幅し、pET22b の NdeI および XhoI サイトに導入した。得られたプラスミドを pET22-smdh を命名した。このプラスミドが導入された *E. coli* BL21 (DE3) を、SMDH 発現株とした。同様にして、プライマー-AseI-bfdc-F および bfdc-XhoI-R を用いて、BFDC 発現株を構築した。

4-2-3 発現株の培養

AAD 発現株は、Terrific Broth に 100 mg/L のアンピシリンナトリウムを含む培地（以下、TB-amp）を用いて 25°C で 16 時間の振とう培養を行った。HMAS Ao 発現株は、Overnight Express Instant TB Medium（メルク）に 100 mg/L のアンピシリンナトリウムを含む培地（以下、OETB-amp）を用いて 30°C で 16 時間の振とう培養を行った。他の HMAS 発現株も、HMAS Ao 発現株と同様に培養した。SMDH 発現株および BFDC 発現株は、OETB-amp を用いて 37°C で 16 時間の振とう培養を行った。

4-2-4 HPLC 分析

フェニルアラニン、フェニルピルビン酸、マンデル酸、ベンゾイルギ酸、およびベンズアルデヒドは、HPLC を用いて定量した。分析条件は以下の通りである。移動相 A : 10 mM KH₂PO₄ + 10 mM K₂HPO₄、移動相 B : アセトニトリル、グラジエント : 0–2 min (B: 2%) 2–16 min (B: 2%–50%) 16.1–20 min (B: 2%)、流速 : 1.0 mL/min、カラム : CAPCELL PAK MGII column (4.6 × 150 mm 3 μm、資生堂)、カラム温度 : 40°C、検出 : UV 210 nm

4-2-5 AAD、HMAS Ao、SMDH 発現株の評価

100 mM リン酸カリウム緩衝液、50 mM 反応基質、30 mM アスコルビン酸ナトリウム、10 mM クエン酸 3 ナトリウム、0.01 mM 硫酸鉄、10 mM チアミンピロリン酸クロリド、1 mM 硫酸マグネシウム、0.1 mL 発現株の培養液（4-2-3 発現株の培養、を参照）、を含む 1 mL の反応液（pH 7.0）を 15°C で 20 時間振とうして反応させた。反応基質としては、AAD 発現株には L-フェニルアラニン、HMAS Ao 発現株にはフェニルピルビン酸ナトリウム、SMDH 発現株には (S)-マンデル酸、を用いた。反応終了後、それぞれの生成物を HPLC で定量した。

4-2-6 BFDC 発現株の評価

100 mM リン酸カリウム緩衝液、50 mM ベンゾイルギ酸、30 mM アスコルビン酸ナトリウム、10 mM クエン酸 3 ナトリウム、0.01 mM 硫酸鉄、10 mM チアミンピロリン酸クロリド、1 mM 硫酸マグネ

シウム、0.1 mL BFDC 発現株の培養液（4-2-3 発現株の培養、を参照）、を含む 1 mL の反応液（pH 7.0）を 25℃で 4 時間緩やかに振とうして、反応させた。反応終了後、生成したベンズアルデヒドを HPLC で定量した。

4-2-7 HMAS ホモログを用いたベンズアルデヒドの生成量評価

2ステップ反応は、以下の条件で実施した。100 mM リン酸カリウム緩衝液、50 mM L-フェニルアラニン、30 mM アスコルビン酸ナトリウム、10 mM クエン酸 3 ナトリウム、0.01 mM 硫酸鉄、10 mM チアミノピロリン酸クロリド、1 mM 硫酸マグネシウム、5 倍に濃縮し得られた 0.02 mL の AAD 発現株培養液、5 倍に濃縮し得られた 0.1 mL の HMAS 発現株培養液、5 倍に濃縮し得られた 0.02 mL の SMDH 発現株培養液、を含む 1 mL の反応液（pH 7.0）を 15℃で 20 時間振とうして反応させた。得られた反応液を 12,000 x g、5 分、4℃で遠心し、上清 0.49 mL と 5 倍に濃縮し得られた 0.01 mL の BFDC 発現株培養液を混合し、25℃で 4 時間緩やかに振とうして、反応させた。反応終了後、生成物を HPLC で定量した。

1ステップ反応は、以下の条件で実施した。上記の 2 ステップ反応で、1 ステップ目から BFDC 発現株培養液を添加し、15℃で 20 時間振とうして反応。得られた反応液を HPLC 分析に供した。

Table 4-2-1. Plasmids used in the present study

Plasmid	Description	accession number
pET22-hmaS Ao	pET22 harboring the <i>hmaS</i> gene from <i>Amycolatopsis orientalis</i> (Ao)	WP_037311069
pET22-hmaS Sc	pET22 harboring the <i>hmaS</i> gene from <i>Streptomyces coelicolor</i> (Sc)	WP_011028841
pET22-hmaS Ab	pET22 harboring the <i>hmaS</i> gene from <i>Amycolatopsis balhimycina</i> (Ab)	CAC48371
pET22-hmaS Ar	pET22 harboring the <i>hmaS</i> gene from <i>Actinoplanes rectilineatus</i> (Ar)	WP_045739980
pET22-hmaS As	pET22 harboring the <i>hmaS</i> gene from <i>Actinoplanes subtropicus</i> (As)	WP_030437841
pET22-hmaS At	pET22 harboring the <i>hmaS</i> gene from <i>Actinoplanes teichomyceticus</i> (At)	CAG15040
pET22-hmaS Ka	pET22 harboring the <i>hmaS</i> gene from <i>Kibdelosporangium aridum</i> (Ka)	WP_051895522
pET22-hmaS Nc	pET22 harboring the <i>hmaS</i> gene from <i>Nonomuraea coxensis</i> (Nc)	WP_026214630
pET22-hmaS Rr	pET22 harboring the <i>hmaS</i> gene from <i>Rhodococcus rhodnii</i> (Rr)	WP_037255771
pET22-hmaS Sr	pET22 harboring the <i>hmaS</i> gene from <i>Streptomyces rimosus</i> (Sr)	WP_050515337
pET22-hmaS St	pET22 harboring the <i>hmaS</i> gene from <i>Streptomyces toyocaensis</i> (St)	AAM80551
pET22-hmaS Ha	pET22 harboring the <i>hmaS</i> gene from <i>Herpetosiphon aurantiacus</i> (Ha)	ABX04531

Accession number: GenBank accession number of the expressed protein.

Table 4-2-2. Plasmids used in the present study

Plasmid	Description	Reference or accession no.
pSFN_Sm_Aet	pUC18-based plasmid containing the mutated acid phosphatase promoter of <i>Enterobacter aerogenes</i> (<i>PphoC</i>)	Abe <i>et al.</i> 2006
pTB2	pUC118 containing the <i>aad</i> gene from <i>Providencia rettgeri</i>	Takakura <i>et al.</i> 2010
pSFN-aad	pUC18-based vector harboring the <i>PphoC</i> from pSFN_Sm_Aet and the <i>aad</i> gene from pTB2	Present study
pET-22b(+)	Expression vector containing T7lac promoter	Merck KGaA
pET22-smdh	pET22 harboring the <i>smdh</i> gene from <i>Pseudomonas putida</i>	BAM38408
pET22-bfdc	pET22 harboring the <i>bfdc</i> gene from <i>Pseudomonas putida</i>	BAM38407

Accession no.: GenBank accession number of the expressed protein.

Table 4-2-3. Primers used for plasmid construction

Primer	Sequence (5'-3')
NdeI-aad-5R6R8L-F	GGGAATTCCATATGAAAATCTCGcGtcGtAAGCTgTTATTAGGGGTTGGT
aad-HindIII-R	CCCAAGCTTTTAGCTAAAACGGGAAAGTTTATA
NdeI-hmaS Ao-F	<i>ggaattccat</i> ATGCAGAACTTTGAAATCGA
hmaS Ao-XhoI-R	<i>accgctcgag</i> TCAACGACCGGCAACTTCGC
AseI-hmaS Sc-F	<i>ggaattcatta</i> ATGCTGCCTCCGTTTCCGT
hmaS Sc-XhoI-R	<i>accgctcgag</i> TCAACGACGTGCCGGACCCA
NdeI-smdh-F	<i>ggaattccat</i> ATGAGCCGCAACCTGTTTAA
smdh-XhoI-R	<i>accgctcgag</i> TCATGCATGGGTGCCTTTAC
AseI-bfdc-F	<i>ggaattcatta</i> ATGGCAAGCGTTCATGGCA
bfdc-XhoI-R	<i>accgctcgag</i> TCATTTAACCGGACTAACGG

The restriction sites used for cloning are shown in italics.

第三節 酵素 4 種を用いる基本ルートの構築

L-フェニルアラニンを原料として、4 段階の酵素反応を経てベンズアルデヒドを生成させる新規ルートについて、検討を進めることとした。アミノ酸デアミナーゼ (AAD)、4-ヒドロキシマンデル酸合成酵素 (HMAS)、および (S)-マンデル酸脱水素酵素 (SMDH) は、反応に分子状の酸素を必要とするため、酵素反応中の通気や攪拌が必要と考えられた。ベンゾイルギ酸脱炭酸酵素 (BFDC) は反応に酸素を必要としないため、酵素反応中の通気や攪拌は必須でないと考えられた。これらの特性より、4 反応を好氣的に実施する 1 ステップ反応と、3 反応を好氣的に実施しベンズアルデヒド生成反応を嫌氣的に実施する 2 ステップ反応、2 つの方法が考えられた (Figure 4-3-1)。

まず、それぞれの酵素反応が問題なく進行するかを確認することとした。AAD、HMAS、SMDH、および BFDC の発現株を構築し、それぞれの単反応を実施した。基質 50 mM での反応で収率を確認したところ、AAD による L-フェニルアラニンからフェニルピルビン酸への反応は 100%、HMAS Ao によるフェニルピルビン酸から (S)-マンデル酸への反応は 2%、SMDH による (S)-マンデル酸からベンゾイルギ酸への反応は 99%、BFDC によるベンゾイルギ酸からベンズアルデヒドへの反応は 96%の収率で生成物が得られた。これらの結果より、HMAS Ao による (S)-マンデル酸生成反応が律速になることが示された。

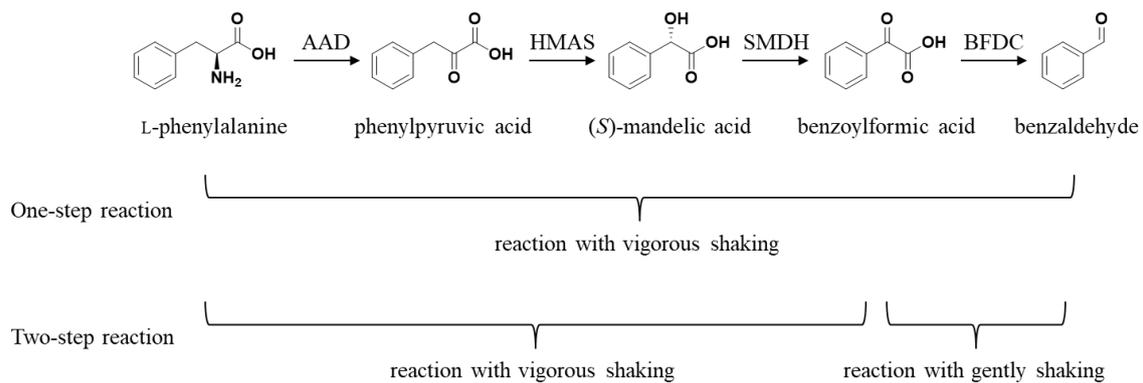


Figure 4-3-1. Enzymatic synthesis of benzaldehyde from L-phenylalanine in one-step and two-step reactions by mixing *E. coli* strains expressing the four enzymes. AAD, Amino acid deaminase; HMAS, 4-hydroxymandelate synthase; SMDH, (*S*)-mandelate dehydrogenase; BFDC, Benzoylformate decarboxylase.

第四節 HMAS のスクリーニング

HMAS を用いる反応が律速になる可能性が見いだされたので、次に他生物由来 HMAS をスクリーニングすることとした。上述の検討では、最も多くの報告がされている *Amycolatopsis orientalis* 由来の HMAS (HMAS Ao) を用いた。データベース上には、活性の報告はされていないが HMAS Ao と相同性を有する HMAS も存在する。これらの HMAS についても発現株を構築し、HMAS Ao も含めて 12 種の HMAS 発現株を評価した。反応は、4 反応を同時に進める 1 ステップ反応と、3 反応を先に、ベンズアルデヒド生成反応を後に実施する 2 ステップ反応、両方で評価した (Figure 4-3-1)。

12 種の HMAS を用いて、それぞれ 1 ステップ法と 2 ステップ法にてベンズアルデヒドの生成量を検討した。その結果、*Actinoplanes teichomyceticus* 由来の HMAS (HMAS At) を用いて 2 ステップ法で反応を行った場合に、最も高いベンズアルデヒド蓄積が確認された (6.9 mM)。HMAS At を用いて 1 ステップ法で反応を行った場合は、4.6 mM のベンズアルデヒドが蓄積した。1 ステップ法と 2 ステップ法、いずれでも HMAS At を用いた場合に最もベンズアルデヒドの蓄積が高く、HMAS At は他 HMAS と比較し本ルートでのベンズアルデヒド生産に適した酵素と推察された。ただし、基質には 50 mM の L-フェニルアラニンを用いており、ベンズアルデヒドのモル収率は最大で 14%であった (HMAS At での 2 ステップ反応)。反応終了時、フェニルピルビン酸は 39 mM が残存しており、依然として (S) - マンデル酸の生成段階が律速と推察された。この時の残存量は、フェニルアラニンは 0.5 mM、マンデル酸は 0.1 mM、ベンズイルギ酸は 0.2 mM で、いずれも 1 mM 以下だった。反応の効率化を進めるためには、HMAS 反応のさらなる検討を進める必要があると考えられた。

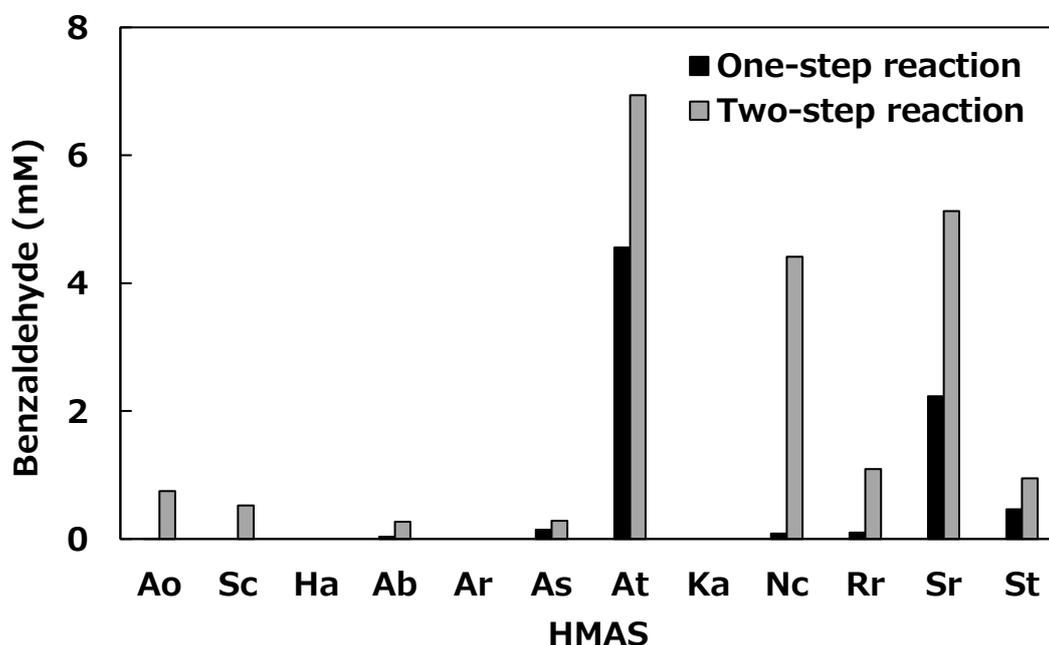


Figure 4-4-1. Benzaldehyde production from 50 mM of L-phenylalanine with HMAS homologs in one-step or two-step reaction. Bars represent the amount of produced benzaldehyde after 20 h incubation at 15°C with shaking (one-step reaction, black bars), 20 h incubation at 15°C with shaking (first step) and 4 h incubation at 25°C with gentle shaking (second step) for two-step reaction (gray bars). The reactions were performed in duplicate, and the data are presented as mean values. The origins of HMAS were shown as; Ao, *Amycolatopsis orientalis*; Sc, *Streptomyces coelicolor*; Ha, *Herpetosiphon aurantiacus*; Ab, *Amycolatopsis balhimycina*; Ar, *Actinoplanes rectilineatus*; As, *Actinoplanes subtropicus*; At, *Actinoplanes teichomyceticus*; Ka, *Kibdelosporangium aridum*; Nc, *Nonomurea coxensis*; Rr, *Rhodococcus rhodnii*; Sr, *Streptomyces rimosus*; St, *Streptomyces toyocaensis*.

第五節 まとめと考察

L-フェニルアラニンからベンズアルデヒドを生成する菌株としては、担子類などが知られている。これらは反応経路が明確になっておらず、長く複雑な経路を用いていることが原因で収率や蓄積が向上しない可能性も考えらえた。また、機能している酵素が把握されておらず、特定酵素の強化による生成速度の向上は困難と推察された。

今回は L-フェニルアラニンを出発原料とし、4 種の酵素を用いる新規ルートについて検証することとした。4 酵素の発現株を単独で評価したところ、HMAS による反応に課題があり、律速となりうることが明らかとなった。そこで、データベースから新たに HMAS ホモログを探索し、評価済みの HMAS Ao と合わせて、12 種の HMAS を評価した。その結果、HMAS 活性については報告がなかった、*Actinoplanes teichomyceticus* 由来の HMAS (HMAS At) が良好な反応を示すことを確認した。この時、全体の反応を 2 ステップに分割する方法で、より高いベンズアルデヒド蓄積が確認された。通気しながらベンズアルデヒドの生成を行うと、生成したベンズアルデヒドの揮発や分解などが起こってしまう可能性が考えられた。

評価した反応条件の中では HMAS At を用いる 2 ステップ反応が高いベンズアルデヒド蓄積を示したが、基質 L-フェニルアラニン 50 mM から 7 mM 程度のベンズアルデヒドしか生成しておらず、さらに大幅な改善が必要とされた。L-フェニルアラニン、(S)-マンデル酸、およびベンゾイルギ酸の残存が 1 mM 以下であるのに対し、フェニルピルビン酸が 39 mM 蓄積していることから HMAS の反応が律速となっていることは明らかであり、HMAS の探索または改良が必須と推察された。

第五章 酵素改変によるベンズアルデヒド収率の向上

第一節 緒言

前章にて *Actinoplanes teichomyceticus* 由来 HMAS (HMAS At) を選抜したが、反応収率は依然として低かった。そこで、酵素改変による反応の効率化とベンズアルデヒドの収率改善を試みた。本章では、HMAS At の改変による改良と性質解析、改変型酵素を用いたベンズアルデヒドの生成反応について述べる。

第二節 材料および方法

5-2-1 プラスミドおよびプライマー

用いたプラスミドを Table 5-2-1 に示す。用いたプライマーは、Table 5-2-2 に記載する。

5-2-2 菌株の構築

His タグが付与された HMAS At の発現株は、以下のようにして構築した。プラスミド pET22-hmaS At とプライマー T7 promoter および hmaS At-XhoHis-R を用いた PCR を行い、hmaS At 遺伝子配列を含む (終止コドンを含まない) DNA 断片を増幅し、pET-22b の NdeI および XhoI サイトに導入した。得られたプラスミドを pET22-hmaS At-His と命名した。プラスミド pSFN-aad とプライマー PphoC up-F および PphoC NdeI-R を用いた PCR を行い、phoC プロモーター配列を含む DNA 断片を増幅した。プラスミド pET22-hmaS At-His とプライマー PphoC-NdeI-hmaS At-F および His6 SacI-R を用いた PCR を行い、His タグ配列が付与された hmaS At 遺伝子配列を含む DNA 断片を増幅した。得られた phoC プロモーター配列を含む DNA 断片と His タグ配列が付与された hmaS At 遺伝子配列を含む DNA 断片、およびプライマー EcoRI-PphoC-F と His6 SacI-R を用いた PCR を行い、phoC プロモーター配列と His タグ配列が付与された hmaS At 遺伝子配列を含む DNA 断片を増幅し、pUC18 (タカラバイオ) の EcoRI および SacI サイトに導入した。得られたプラスミドとプライマー PphoC up-F および PphoC SDact NdeI-R を用いた PCR を行い、phoC プロモーター配列と改変した SD 配列を含む DNA 断片を増幅し、得られたプラスミドの EcoRI および NdeI サイトに導入した。得られたプラスミドを pPC-hmaS At-His と命名し、このプラスミドが導入された *E. coli* JM109 を、HMAS At-His 発現株とした。

5-2-3 酵素の精製

HMAS At-His 発現株を、Terrific Broth に 100 mg/L のアンピシリンナトリウムを含む培地 (以下、TB-amp) を用いて 37°C で 16 時間の振とう培養を行った。得られた培養液から 10,000 x g、15 分、4°C で遠心し、集菌して菌体を xTractor buffer (タカラバイオ) に懸濁、細胞溶解液を得た。溶解液を遠心し (10,000 x g、15 分、4°C)、得られた上清を無細胞抽出液とした。無細胞抽

出液を HisTALON Superflow Cartridge (タカラバイオ) に供し、平衡化緩衝液 (20 mM トリス塩酸塩、300 mM 塩化ナトリウム、10 mM イミダゾール、pH 8.0) で洗浄した後、溶出緩衝液 (20 mM トリス塩酸塩、300 mM 塩化ナトリウム、150 mM イミダゾール、pH 8.0) で HMAS At-His を溶出させた。得られた溶出液は、20 mM トリス塩酸塩 (pH 7.6) と Amicon Ultra 30K (メルク) を用いて濃縮とバッファー交換を行い、HMAS At 精製酵素溶液とした。

改変型 HMAS At も同様にして精製を行った。

タンパク質濃度は、プロテインアッセイ CBB 溶液 (ナカライテスク) を用いて測定した。スタンダードには、BSA を用いた。

5-2-4 活性測定

100 mM トリス塩酸塩、5 mM フェニルピルビン酸ナトリウム、10 mM アスコルビン酸ナトリウム、10 mM クエン酸 3 ナトリウム、0.01 mM 硫酸鉄、0.02 mg/mL HMAS At 精製酵素、を含む 0.2 mL の反応液 (pH 7.0) を 25°C で 60 分間反応させた。反応終了後、生成したマンデル酸を HPLC で定量した。1 U は、1 μ mol のマンデル酸を 1 分あたりに生成する活性とした。

ベンゾイルギ酸添加条件での反応では、50 mM のベンゾイルギ酸を添加した。

フェニルピルビン酸高濃度条件での反応では、50 mM のフェニルピルビン酸ナトリウムを基質として用いた。

5-2-5 HPLC 分析

フェニルアラニン、フェニルピルビン酸、マンデル酸、ベンゾイルギ酸、およびベンズアルデヒドは、HPLC を用いて定量した。分析条件は以下の通りである。移動相 A : 10 mM KH_2PO_4 + 10 mM K_2HPO_4 、移動相 B : アセトニトリル、グラジエント : 0–2 min (B: 2%) 2–16 min (B: 2%–50%) 16.1–20 min (B: 2%)、流速 : 1.0 mL/min、カラム : CAPCELL PAK MGII column (4.6 \times 150 mm 3 μ m、資生堂)、カラム温度 : 40°C、検出 : UV 210 nm

5-2-6 酵素改変

1 ラウンド目の酵素改変は、以下の条件で実施した。プラスミド pPC-hmaS At-His とプライマー-RV と M4、および GeneMorph II Random Mutagenesis Kit (アジレントテクノロジーズ) を用いてエラーブローン PCR を行い、得られた DNA 断片を pPC-hmaS At-His の *Nde*I および *Xho*I サイトに導入した。得られたプラスミドライブラリーで *E. coli* JM109 を形質転換し、TB-amp を用いて 37°C で 18 時間の振とう培養を行った。100 mM トリス塩酸塩、5 mM フェニルピルビン酸ナトリウム、50 mM ベンゾイルギ酸、30 mM アスコルビン酸ナトリウム、10 mM クエン酸 3 ナトリウム、0.01 mM 硫酸鉄、0.1 mL 培養液、を含む 0.2 mL の反応液 (pH 7.0) を 25°C で 24 時間反応させた。反応終了後、生成したマンデル酸を UPLC で定量した。

2 ラウンド目の酵素改変では、鋳型プラスミドに pPC-hmaS At #13-His を用いてエラーブローン PCR を実施した。ライブラリーの構築と培養は、1 ラウンド目の酵素改変と同様の条件で行った。100

mM トリス塩酸塩、50 mM フェニルピルビン酸ナトリウム、50 mM ベンゾイルギ酸、30 mM アスコルビン酸ナトリウム、10 mM クエン酸 3 ナトリウム、0.01 mM 硫酸鉄、0.05 mL 培養液、を含む 0.2 mL の反応液 (pH 7.0) を 25°C で 24 時間反応させた。反応終了後、生成したマンデル酸を UPLC で定量した。

3 ラウンド目の酵素改変は、以下のように実施した。プラスミド pPC-hmaS At #18-His とプライマー RV および Q206R-R を用いた PCR を行い、*hmas At #18* 遺伝子の部分配列を含む DNA 断片を増幅した。同様に、プライマー-Q206R-F と M4 を用いて *hmas At #18* 遺伝子の部分配列を含む DNA 断片を増幅した。得られた 2 つの DNA 断片とプライマー-RV および M4 を用いた PCR を行い、増幅した DNA 断片を pPC-hmaS At-His の *NdeI* および *XhoI* サイトに導入した。得られたプラスミドを pPC-hmaS At #212-His と命名し、このプラスミドが導入された *E. coli* JM109 を、HMAS At #212-His 発現株とした。

5-2-7 UPLC 分析

ランダム改変体の発現株が生成したマンデル酸は、UPLC を用いて定量した。分析条件は以下の通りである。装置：Acquity UPLC システム (ウォーターズ)、移動相 A：0.1% リン酸 + 5 mM 1-オクタンスルホン酸ナトリウム、移動相 B：アセトニトリル、A/B：85/15、流速：0.8 mL/min、カラム：Acquity UPLC BEH column (C18 1.7 μ m 2.1 \times 50 mm、ウォーターズ)、カラム温度：40°C、検出：UV 210 nm

5-2-8 ベンゾイルギ酸生成反応

野生型 HMAS At-His 発現株 (*E. coli* JM109/pPC-hmaS At-His) および改変型 HMAS At-His 発現株 (*E. coli* JM109/pPC-hmaS At #XX-His) は、TB-amp を用いて 37°C で 16 時間の振とう培養を行った。AAD 発現株 (*E. coli* JM109/pSFN-aad) は、TB-amp を用いて 25°C で 16 時間の振とう培養を行った。SMDH 発現株 (*E. coli* BL21 (DE3)/pET22-smdh) は、OETB-amp を用いて 37°C で 16 時間の振とう培養を行った。

ベンゾイルギ酸生成反応は、以下の条件で実施した。100 mM リン酸カリウム緩衝液、20-100 mM L-フェニルアラニン、30 mM アスコルビン酸ナトリウム、10 mM クエン酸 3 ナトリウム、0.01 mM 硫酸鉄、10 mM チアミノピロリン酸クロリド、1 mM 硫酸マグネシウム、5 倍に濃縮し得られた 0.02 mL の AAD 発現株培養液、5 倍に濃縮し得られた 0.1 mL の HMAS 発現株培養液、5 倍に濃縮し得られた 0.02 mL の SMDH 発現株培養液、を含む 1 mL の反応液 (pH 7.0) を 15°C で 20 時間振とうして反応させた。反応終了後、生成したベンゾイルギ酸を HPLC で定量した。

5-2-9 ベンズアルデヒド生成反応

野生型 HMAS At-His 発現株 (*E. coli* JM109/pPC-hmaS At-His) および改変型 HMAS At #212-His 発現株 (*E. coli* JM109/pPC-hmaS At #212-His) は、TB-amp を用いて 37°C で 16 時間の振とう培養を行った。AAD 発現株 (*E. coli* JM109/pSFN-aad) は、TB-

amp を用いて 25°C で 16 時間の振とう培養を行った。SMDH 発現株 (*E. coli* BL21 (DE3)/pET22-smdh) および BFDC 発現株 (*E. coli* BL21 (DE3)/pET22-bfdc) は、OETB-amp を用いて 37°C で 16 時間の振とう培養を行った。

ステップ 1 のベンゾイルギ酸生成反応は、以下の条件で実施した。100 mM リン酸カリウム緩衝液、100 mM L-フェニルアラニン、30 mM アスコルビン酸ナトリウム、10 mM クエン酸 3 ナトリウム、0.01 mM 硫酸鉄、10 mM チアミノピロリン酸クロリド、1 mM 硫酸マグネシウム、5 倍に濃縮し得られた 0.04 mL の AAD 発現株培養液、10 倍に濃縮し得られた 0.6 mL の HMAS 発現株培養液、5 倍に濃縮し得られた 0.08 mL の SMDH 発現株培養液、を含む 2 mL の反応液 (pH 7.0) を 15°C で 20 時間振とうして反応させた。反応終了後、生成したベンゾイルギ酸を HPLC で定量した。ステップ 2 のベンズアルデヒド生成反応は、以下の条件で実施した。ステップ 1 で得られた反応液を 12,000 x g、5 分、4°C で遠心し、上清 0.98 mL と 5 倍に濃縮し得られた 0.02 mL の BFDC 発現株培養液を混合し、25°C で 4 時間緩やかに振とうして、反応させた。反応終了後、生成物を HPLC で定量した。

Table 5-2-1. Plasmids used in the present study

Plasmid source	Description	Reference or accession no.
pSFN-aad	pUC18-based vector harboring the <i>PphoC</i> from pSFN_Sm_Aet and the <i>aad</i> gene from pTB2	Present study
pET22-hmaS At	pET22 harboring the <i>hmaS</i> gene from <i>Actinoplanes teichomyceticus</i> (At)	CAG15040
pET22-smdh	pET22 harboring the <i>smdh</i> gene from <i>Pseudomonas putida</i>	BAM38408
pET22-bfdc	pET22 harboring the <i>bfdc</i> gene from <i>Pseudomonas putida</i>	BAM38407
pPC-hmaS At-His	pUC18-based vector harboring the <i>PphoC</i> and the <i>hmaS At</i> gene with C-terminal His-tag	Present study
pPC-hmaS At #13-His	I217V was introduced	Present study
pPC-hmaS At #17-His	Q206R/I217V were introduced	Present study
pPC-hmaS At #18-His	A199V/I217V/K337Q were introduced	Present study
pPC-hmaS At #212-His	A199V/Q206R/I217V/K337Q were introduced	Present study

Accession no.: GenBank accession number of the expressed protein.

Table 5-2-2. Primers used for plasmid construction

Primer	Sequence (5'-3')
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGG
hmaS At-XhoHis-R	<i>accgctcgag</i> ACGGCCATCCGCGGCAGCCT
PphoC up-F	AAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAG
PphoC NdeI-R	<i>CATATG</i> cattcctccttacggtgttatatg
PphoC-NdeI-hmaS At-F	ccgtaaggaggaatg <i>CATATG</i> ACCATGACGGGCCACTTTC
His6 SacI-R	ACCG <i>gagctcagtggtggtggtggtggtg</i>
EcoRI-PphoC-F	gaaccg <i>GAATT</i> Cattttttcaatgtgatttta
PphoC SDact NdeI-R	ATGGTCATatggattcctccttacggtgtt
RV	CAGGAAACAGCTATGAC
M4	GTTTTCCCAGTCACGAC
Q206R-R	GGCACTacgAACCACCTGGGAATCCAT
Q206R-F	GTGGTTcgtAGTGCCGGTGGGGCTGTG

The restriction sites used for cloning are shown in italics.

第三節 酵素の性質解析と改変

5-3-1 HMAS At の性質解析

HMAS At が反応液中の成分から阻害を受けている可能性を考え、検討を行った。HMAS At の精製酵素を用いて検証した結果、基質であるフェニルピルビン酸により阻害を受け、50 mM 添加時には 5 mM 添加時の 22% にまで活性が低下することが確認された (0.12→0.027 U/mg)。また、2 ステップ法での 1 ステップ目の生成物であるベンゾイルギ酸によっても阻害を受け、50 mM 添加時には無添加時の 22% の活性に低下することが確認された (0.12→0.027 U/mg、Table 5-3-1)。これらの結果より、HMAS At は反応中にフェニルピルビン酸およびベンゾイルギ酸から阻害を受けていると推察された。

5-3-2 HMAS At の酵素改変

1 ラウンド目では、HMAS At 全長を対象としたエラーブローン PCR によるランダム改変を実施して、ベンゾイルギ酸添加時の活性向上を指標にスクリーニングを行った。検討の結果、ベンゾイルギ酸からの阻害を低減させる改変型酵素を取得した (#13、I217V)。2 ラウンド目では、#13 を親酵素としたエラーブローン PCR によるランダム改変を実施して、フェニルピルビン酸からの阻害を受けづらい改変型酵素を 2 種、取得した (#17、Q206R/I217V および #18、A199V/I217V/K337Q)。3 ラウンド目では、得られた変異を組み合わせ、4 重変異体 #212 (A199V/Q206R/I217V/K337Q) を構築した。本改変型酵素 (#212) は、野生型と比較し活性が向上していた (0.12→0.30 U/mg)。また、フェニルピルビン酸高濃度条件での活性が改善し (22→37%)、ベンゾイルギ酸添加条件での活性も改善した (22→30%、Table 5-3-1)。野生型および改変型 HMAS At を用いたベンゾイルギ酸生成反応 (2 ステップ法の 1 ステップ目) を実施したところ、野生型 HMAS At では 2.6 mM のベンゾイルギ酸蓄積だったのに対し、改変型 HMAS At #212 を用いた場合は 9.3 mM のベンゾイルギ酸蓄積を示した (Table 5-3-1)。基質の L-フェニルアラニン濃度を 20、50、100 mM で検討したが、生成したベンゾイルギ酸の濃度に大きな差異は確認されなかった (Figure 5-3-1)。また、発現量の向上が影響している可能性も考えられたため、HMAS At 発現株の菌体抽出液を SDS-PAGE に供し確認した。HMAS At に相当するバンドに大きな強度の差異は確認されず、変異導入による発現量への影響は少ないと判断した (Figure 5-3-2)。

Table 5-3-1. Activity and benzoylformic acid productivity of HMAS At WT and mutants

HMAS At	Mutations	Activity (U/mg)			<u>Benzoylformic acid</u> production (mM) [±]
		A	B	C	
WT	-	0.12 ± 0.02	0.027 ± 0.002	0.027 ± 0.005	3.6 [±]
#13	I217V	0.11 ± 0.003	0.14 ± 0.01	0.013 ± 0.008	2.8 [±]
#17	Q206R/I217V	0.19 ± 0.01	0.12 ± 0.04	0.092 ± 0.02	5.3 [±]
#18	A199V/I217V/K337Q	0.18 ± 0.07	0.10 ± 0.02	0.029 ± 0.01	6.2 [±]
#212	A199V/I217V/Q206R/K337Q	0.30 ± 0.002	0.089 ± 0.004	0.11 ± 0.01	9.3 [±]

One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme that produces 1 μ mol of mandelic acid from phenylpyruvic acid per min at 25°C and pH 7.0. The experiments were performed in triplicate, and the data shown are the mean values \pm standard deviations.

Substrates and inhibitors: A; 5 mM phenylpyruvic acid, B; 5 mM phenylpyruvic acid and 50 mM benzoylformic acid, C; 50 mM phenylpyruvic acid.

Benzoylformic acid production: Step 1 of the two-step reaction was performed with 100 mM L-phenylalanine.

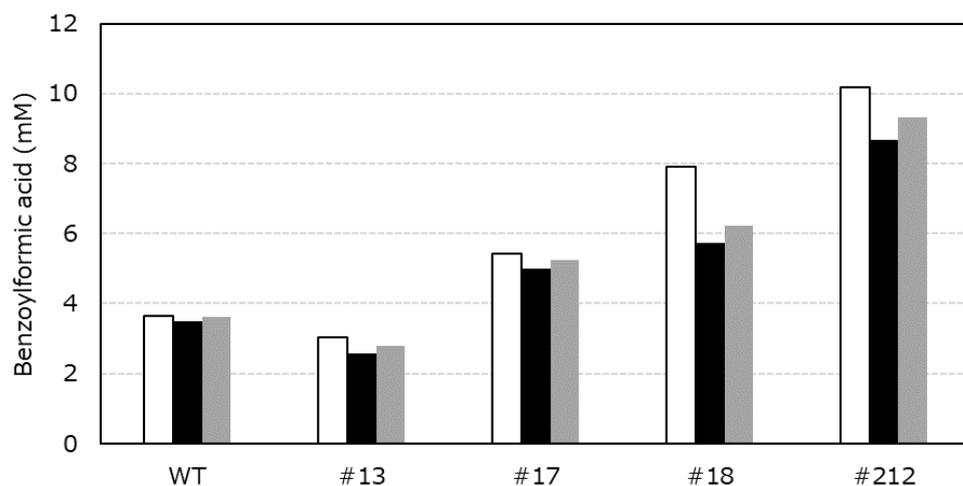


Figure 5-3-1. Benzoylformic acid production with WT and mutant expression strains. The bars represent the amount of produced benzoylformic acid after 20 h incubation at 15°C with shaking. The reactions were performed using 20 mM (white bar), 50 mM (black bar), and 100 mM (gray bar) of L-phenylalanine as a substrate.

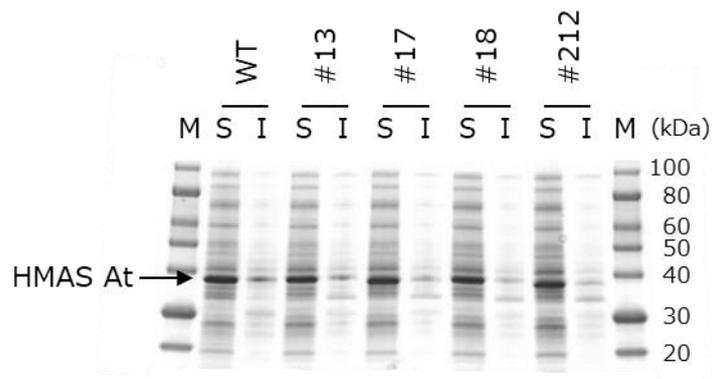


Figure 5-3-2. SDS-PAGE analysis of soluble (S) and insoluble (I) fractions of the HMAS At expressing *E. coli* strains. M indicates protein molecular standards; the arrow shows the bands corresponding to HMAS At (WT, #13, #17, #18, and #212).

第四節 改変型酵素を用いたベンズアルデヒドの生成

5-4-1 改変型酵素 HMAS At #212 を用いたベンズアルデヒドの生成

3 ラウンド目で得られた4重改変型酵素#212 (A199V/Q206R/I217V/K337Q) を用いて、2ステップ法でのベンズアルデヒド生成反応を行った。1ステップ目の、L-フェニルアラニンからベンゾイルギ酸を生成させる反応では、野生型 HMAS At を用いた場合には96時間で40 mMのベンゾイルギ酸が生成したのに対し、HMAS At #212 を用いた場合には85 mMのベンゾイルギ酸が生成した。得られた反応液を用いて2ステップ目の、ベンゾイルギ酸からベンズアルデヒドを生成させる反応を行ったところ、野生型 HMAS At を用いて調製した反応液からは2時間で37 mMのベンズアルデヒドが生成したのに対し、HMAS At #212 を用いて調製した反応液からは84 mMのベンズアルデヒドが生成した。基質には100 mMのL-フェニルアラニンを用いたため、ベンズアルデヒドの反応収率は野生型 HMAS At を用いた場合に37%、改変型 HMAS At#212 を用いた場合では84%であった (Figure 5-4-1)。

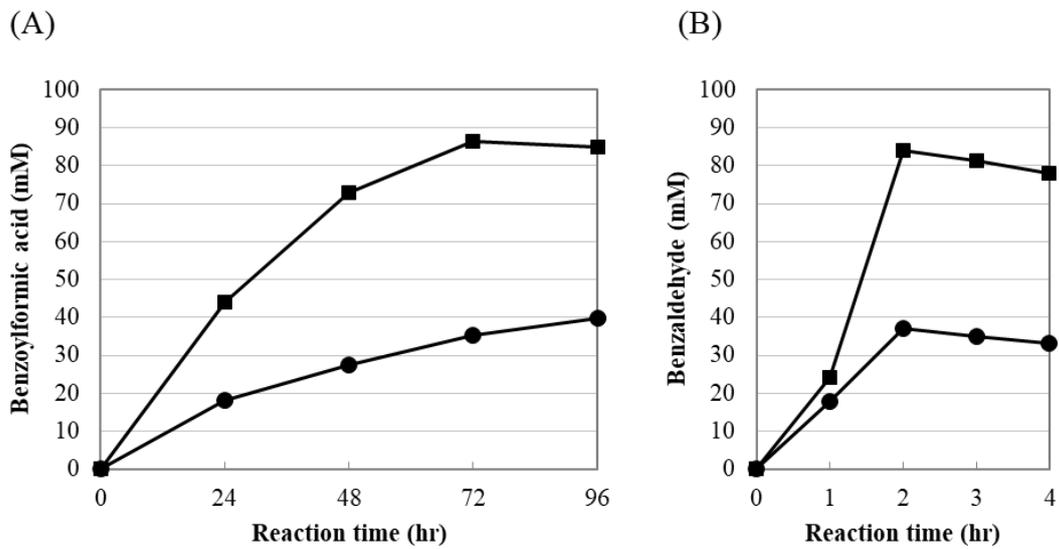


Figure 5-4-1. Time course of benzoylformic acid (a) and benzaldehyde (b) production with the HMAS At WT (●) and HMAS At #212 (■) in two-step reaction. Reactions were carried out using 100 mM L-phenylalanine as a substrate. The reactions were performed in duplicate, and the data are presented as mean values.

第五節 まとめと考察

前章で課題として把握された、HMAS の性質改善に取り組んだ。HMAS At の性質を確認したところ、高濃度のフェニルピルビン酸やベンゾイルギ酸によって阻害を受けることが明らかとなった。これを改善できれば反応性が向上すると予想し、HMAS At の酵素改変を開始した。

1 ラウンド目では、ベンゾイルギ酸からの阻害を低減させる改変型酵素を取得した（#13、I217V）。2 ラウンド目では、#13 を親酵素としてフェニルピルビン酸からの阻害を受けづらい改変型酵素を2種、取得した（#17、Q206R/I217V および#18、A199V/I217V/K337Q）。3 ラウンドでは、得られた変異を組み合わせ、4 重変異体#212（A199V/Q206R/I217V/K337Q）を構築した。本改変型酵素（#212）は、活性の向上や阻害の受けづらさを示した。#212 を用いたベンズアルデヒド生成反応を実施したところ、野生型 HMAS At では 37%の収率に対し、84%の収率でベンズアルデヒドを生成させた。

取得された4種の変異箇所について、他の HMAS 8種とのアライメントで確認したところ、Q206 以外の3か所（A199/I217/K337）は完全に保存されていた。また、Q206についても、9種の HMAS のうち8種で保存されている残基であった（Figure 5-6-1）。HMAS は本来、マンデル酸ではなくヒドロキシマンデル酸を生成させる酵素である。マンデル酸の生成活性は向上したが、ヒドロキシマンデル酸の生成活性は低下している可能性も考えられる。

立体構造が報告されている HMAS Ao とのアライメントより、HMAS At の I217 は活性中心近傍に位置していると推察された（Brownlee J *et al.* 2008）。他の3変異（A199V/Q206R/K337Q）は活性中心から離れていると推察され、遺伝子配列全長を対象としたランダム改変を実施したことで取得できた変異と考えられた。

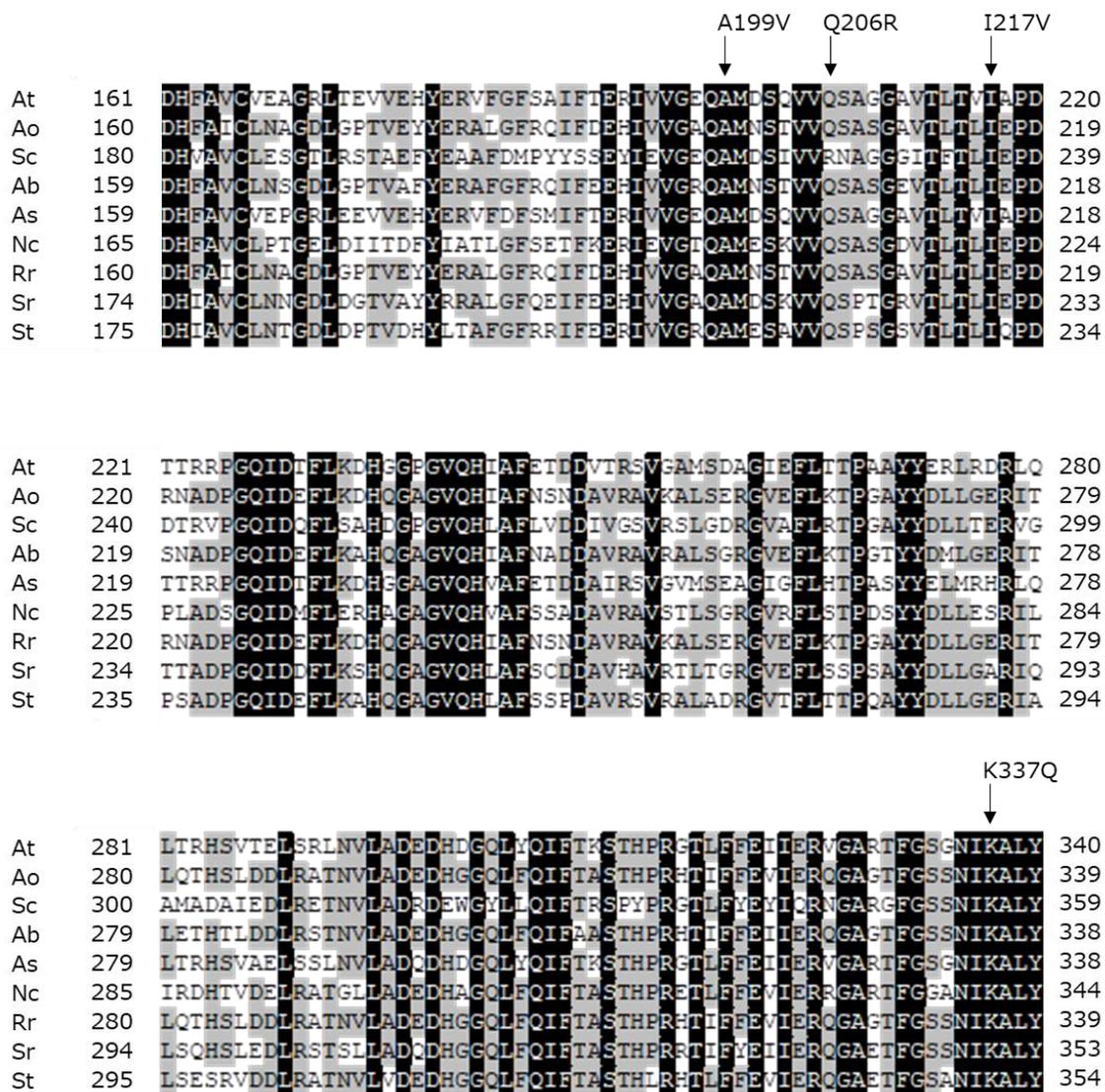


Figure 5-6-1. Multiple sequence alignment of HMAS At and 8 other HMAS proteins showing the activity in Figure 4-4-1. Sequence alignments were done with GENETYX software (Genetyx Corp., Tokyo, Japan). The positions of A199V, Q206R, I217V, and K337Q mutations in HMAS At #212 are indicated by arrows. Black shading indicates completely conserved residues; gray shading indicates semi-conserved residues. At, *Actinoplanes teichomyceticus*; Ao, *Amycolatopsis orientalis*; Sc, *Streptomyces coelicolor*; Ab, *Amycolatopsis balhimycina*; As, *Actinoplanes subtropicus*; Nc, *Nonomuraea coxensis*; Rr, *Rhodococcus rhodnii*; Sr, *Streptomyces rimosus*; St, *Streptomyces toyocaensis*.

第六章 総括

アミノ酸誘導体は、安価なアミノ酸から生成が可能で、かつ様々な機能を有する産業的に重要な化合物群である。しかし、工業的には化学合成法で生産されることがほとんどで、バイオ製法が適用される例は未だにごく一部である。これまで用いられてきた化学合成法は効率が良く、廃棄物も極力排出しないよう長年の開発と工夫によって最適化が成されている。ただし、今後はエネルギー供給の問題や環境意識の高まりによって、従来の化学合成法が許容されなくなってしまう可能性も考えられる。バイオ製法は、石油化学製品由来の原料を用いることが少なく、また溶媒や反応性の高い試薬を用いることも少ない。バイオ製法の中でも、酵素法は反応経路が短く、また微生物の生育を必要としないため、発酵法と比較すると化学合成法からの転換が容易と考えられる。今回は、酵素製法の適用を検討する対象として、アミノ酸誘導体のアシルアミノ酸とベンズアルデヒドを取り上げた。また、自然界やデータベース上でも多様性に富み、*E. coli* での発現等も容易と推察される、微生物由来酵素に着目して検討を進めた。

アシルアミノ酸の中でも特に、*N*-ラウロイル-L-フェニルアラニン (Lau-Phe) を対象として検討を進めた。洗浄剤として用いられるアシルアミノ酸の多くがラウリン酸をアシル基とすること、フェニルアラニンは取り扱いと UV での分析が容易なこと、を理由に、着目・選定した。Lau-Phe を単一炭素源とした集積培養を実施し、土壌サンプルから Lau-Phe 分解活性菌を取得した。さらに、この中から Lau-Phe 合成活性および Ste-Phe 合成活性を示す株を選抜した。得られた菌株は、Lau-Phe をラウリン酸と L-フェニルアラニンに加水分解する活性だけでなく、ラウリン酸と L-フェニルアラニンを脱水縮合する活性、およびステアリン酸と L-フェニルアラニンを脱水縮合する活性を有していることが示された (Figure 2-5-1)。本菌株の同定を進め、*Burkholderia* sp. LP5_18B 株と命名した後に、目的酵素の精製を開始した。カラム等による精製を進め、SDS-PAGE 上で単一バンドになるまで精製することに成功した。酵素の性質解析を進める中で、Lau-Phe の分解反応だけではなく合成反応も触媒したため、菌株レベルで把握していた分解と合成反応は同一酵素によるものだと判断した。温度や pH の影響を確認したところ、70℃でも失活せず、pH 5-12 の範囲で安定であると確認された。工業製法に用いるためには、失活が起こりづらい安定な酵素が望ましい。本酵素は安定性が高く、活用しやすい酵素だと考えられた。基質特異性を確認したところ、Lau-Phe の他、Lau-Arg も高収率で生成することが明らかとなった。Lau-Arg は反応液中で析出している様子が観察され、89%もの高収率で脱水縮合反応が進む理由として、生成物の系外除去による平衡の移動が考えられた。本酵素は様々な基質に対し反応したが、酸性アミノ酸や D アミノ酸は基質としないことが判明した。これらのアミノ酸を用いて反応させたい場合は、酵素改変や新規酵素の探索が必要になると考えられる。本酵素をコードする遺伝子の同定を進め、アミノ酸配列を明らかにした。得られたアミノ酸配列に高い相同性を示した酵素は、アノテーション上加水分解酵素と予想されており、アシルアミノ酸の分解や合成に用いることが可能とは推察できなかった。今回は集積培養によって新規酵素を単離したため、このようにデータベース情報からは容易に同定できない機能を有する酵素を得ることができた。構築した *E. coli* の発現株は目的酵素の発現量が少なく、大量発現に至るまでには更なる検討が必要と考えられた。亜鉛やコバルトの添加以外にも、酵素の改変や宿主の変更などを試み、効率的な発現につなげたい。

L-フェニルアラニンからベンズアルデヒドを生成する菌株としては、担子類などが知られている。これらは反応経路が明確になっておらず、長く複雑な経路を用いていることが原因で収率や蓄積が向上しない可能性も考えられた。また、この経路で機能している酵素が把握されておらず、特定酵素の強化による生成速度の向上は困難と推察された。今回は L-フェニルアラニンを出発原料とし、4 種の酵素（AAD、HMAS、SMDH、BFDC）を用いる新規ルートについて検証することとした。4 酵素の発現株を単独で評価したところ、HMAS による反応に課題があり、律速となりうる事が明らかとなった。そこで、データベースから新たに HMAS ホモログを探索し、評価済みの HMAS Ao と合わせて、12 種の HMAS を評価した。その結果、HMAS 活性については報告がなかった、*Actinoplanes teichomyceticus* 由来の HMAS（HMAS At）が良好な反応を示すことを確認した。評価した反応条件の中では HMAS At を用いる 2 ステップ反応が高いベンズアルデヒド蓄積を示したが、基質 L-フェニルアラニン 50 mM から 7 mM 程度のベンズアルデヒドしか生成しておらず、またフェニルピルビン酸が 39 mM 蓄積していることから、HMAS の更なる探索または酵素改変が必須と推察された。HMAS At の性質を確認したところ、高濃度のフェニルピルビン酸やベンゾイルギ酸によって阻害を受けることが明らかとなった。これを改善できれば反応性が向上すると予想し、HMAS At の酵素改変を開始した。3 ラウンドの改変により、4 重変異体（A199V/Q206R/I217V/K337Q）を取得した。本改変型酵素（#212）は活性の向上や阻害の受けづらさを示した。#212 を用いたベンズアルデヒド生成反応を実施したところ、野生型 HMAS At では 37%の収率（37 mM の蓄積）に対し、84%の収率（84 mM の蓄積）でベンズアルデヒドを生成させた。ただし、蓄積は最大で 84 mM（8.9 g/L）、反応には約 100 時間を要しており、より生産性を向上させる必要があるかもしれない。さらに改変を進め、より効率的なプロセスの構築につなげたい。

以上のように、アミノ酸誘導体の新規酵素製法を構築すべく、検討を進めた。アシルアミノ酸に関しては、新規合成酵素を見出し、種々のアシルアミノ酸を合成可能なことを示した。ベンズアルデヒドに関しては、データベース上から目的に合った酵素を取得し、さらに酵素改変によって効率的な酵素製法につなげた。今後は、新規酵素の探索や改変手法をハイスループット化、また合理化していき、より速やかに望みの酵素を得て、アシルアミノ酸やベンズアルデヒドの他にも、様々なペプチドやフレーバー素材などのアミノ酸誘導体についても、バイオ製法を効率的に構築させられることが期待される。

引用文献

1. Abe R, Caaveiro JM, Kudou M, Tsumoto K. (2010) Solubilization of membrane proteins with novel *N*-acylamino acid detergents. *Mol Biosyst.* **6**, 677-679
2. Arima J, Isoda Y, Hatanaka T, Mori N. (2013) Recombinant production and characterization of an *N*-Acyl-D-amino acid amidohydrolase from *Streptomyces* sp. 64E6. *World J Microbiol Biotechnol.* **29**, 899-906
3. Ariyoshi Y. (1976) The Structure-taste Relationships of Aspartyl Dipeptide Esters. *Agr Biol Chem.* **40**, 983-992
4. Baumann M, Baxendale IR. (2013) An overview of the synthetic routes to the best selling drugs containing 6-membered heterocycles. *Beilstein J Org Chem.* **9**, 2265-2319
5. Bergmann M, Zervas L. (1932) Über ein allgemeines Verfahren der Peptid-Synthese. *Ber.* **65**, 1192-1201
6. Boonstra E, de Kleijn R, Colzato LS, Alkemade A, Forstmann BU, Nieuwenhuis S. (2015) Neurotransmitters as food supplements: the effects of GABA on brain and behavior. *Front Psychol.* **6**, 1520.
7. Bordes R, Holmberg K. (2015) Amino acid-based surfactants-do they deserve more attention? *Adv Colloid Interface Sci.* **222**, 79-91
8. Brownlee J, He P, Moran GR, Harrison DH. (2008) Two roads diverged: the structure of hydroxymandelate synthase from *Amycolatopsis orientalis* in complex with 4-hydroxymandelate. *Biochemistry.* **47**, 2002-2013
9. Carpino AL, Han GY. (1972) 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *J Org Chem.* **37**, 3404-3409
10. Choirunnisa AR, Arima K, Abe Y, Kagaya N, Kudo K, Suenaga H, Hashimoto J, Fujie M, Satoh N, Shin-Ya K, Matsuda K, Wakimoto T. (2022) New azodyrecins identified by a genome mining-directed reactivity-based screening. *Beilstein J Org Chem.* **18**, 1017-1025
11. Ciriminna R, Fidalgo A, Meneguzzo F, Parrino F, Ilharco LM, Pagliaro M. (2019) Vanillin: The Case for Greener Production Driven by Sustainability Megatrend. *Chemistry Open.* **8**, 660-667
12. Clark GS. (1995) An aroma chemical profile: benzaldehyde. *Perfumer and Flavorist*, **20**, 53-60
13. Foley P, Kermanshahi Pour A, Beach ES, Zimmerman J. (2012) Derivation and synthesis of renewable surfactants. *Chem Soc Rev.* **41**, 1499-1518

14. Gogami Y, Okada K, Oikawa T. (2011) High-performance liquid chromatography analysis of naturally occurring D-amino acids in sake. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **879**, 3259-3267
15. Goodman MJ. (2017) The “Natural” vs. “Natural Flavors” Conflict in Food Labeling: A Regulatory Viewpoint. *Food Drug Law J.* **72**, 78-102
16. Gupta VK. (2016) New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, 1st ed. Elsevier
17. Harada M, Karakawa S, Yamada N, Miyano H, Shimbo K. (2019) Biaryl axially chiral derivatizing agent for simultaneous separation and sensitive detection of proteinogenic amino acid enantiomers using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* **1593**, 91-101
18. IMARC Group (2022) Amino Acids Market: Global Industry Trends, Share, Size, Growth, Opportunity and Forecast 2022-2027
19. Imabayashi Y, Suzuki S, Kawasaki H, Nakamatsu T. (2016) Purification and characterization of enantioselective *N*-acetyl- β -Phe acylases from *Burkholderia* sp. AJ110349. *Biosci Biotechnol Biochem.* **80**, 104-113
20. Imamoto Y, Tanaka H, Takahashi K, Konno Y, Suzawa T. (2013) Advantages of AlaGln as an additive to cell culture medium: use with anti-CD20 chimeric antibody-producing POTELLIGENT™ CHO cell lines. *Cytotechnology.* **65**, 135-143
21. Jensen KA, Evans KM, Kirk TK, Hammel KE. (1994) Biosynthetic Pathway for Veratryl Alcohol in the Ligninolytic Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol.* **60**, 709-714
22. Kawabe T, Morita H. (1994) Production of benzaldehyde and benzyl alcohol by the mushroom *Polyporus tuberaster* K2606. *J Agric Food Chem.* **42**, 2556-2560
23. Koreishi M, Asayama F, Imanaka H, Imamura K, Kadota M, Tsuno T, Nakanishi K. (2005) Purification and characterization of a novel aminoacylase from *Streptomyces mobaraensis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* **69**, 1914-1922
24. Koreishi M, Kawasaki R, Imanaka H, Imamura K, Nakanishi K. (2005) A novel ϵ -lysine acylase from *Streptomyces mobaraensis* for synthesis of *N* ϵ -acyl-L-lysines. *J Am Oil Chem Soc.* **82**, 631-637
25. Koreishi M, Kawasaki R, Imanaka H, Imamura K, Takakura Y, Nakanishi K. (2009) Efficient *N* ϵ -lauroyl-L-lysine production by recombinant ϵ -lysine acylase from *Streptomyces mobaraensis*. *J Biotechnol.* **141**, 160-165

26. Koreishi M, Nakatani Y, Ooi M, Imanaka H, Imamura K, Nakanishi K. (2009) Purification, characterization, molecular cloning, and expression of a new aminoacylase from *Streptomyces mobaraensis* that can hydrolyze *N*-(middle/long)-chain-fatty-acyl-L-amino acids as well as *N*-short-chain-acyl-L-amino acids. *Biosci Biotechnol Biochem.* **73**, 1940-1947
27. Koreishi M, Zhang D, Imanaka H, Imamura K, Adachi S, Matsuno R, Nakanishi K. (2006) A novel acylase from *Streptomyces mobaraensis* that efficiently catalyzes hydrolysis/synthesis of capsaicins as well as *N*-acyl-L-amino acids and *N*-acyl-peptides. *J Agric Food Chem.* **54**, 72-78
28. Krings U, Hinz M, Berger RG. (1996) Degradation of [2H]phenylalanine by the basidiomycete *Ischnoderma benzoinum*. *J Biotechnol.* **51**, 123-129
29. Kudou M, Yumioka R, Ejima D, Arakawa T, Tsumoto K. (2011) A novel protein refolding system using lauroyl-l-glutamate as a solubilizing detergent and arginine as a folding assisting agent. *Protein Expr Purif.* **75**, 46-54
30. LOREAL (2020) Progress report 2020
31. Leffingwell JC, Leffingwell D. (2015) Flavours & fragrances: Recent advances in biotechnology. *Speciality Chemicals Magazine (Speciality Chemicals).* **35**, 32-34
32. Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K. (2005) Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* **69**, 1-8
33. Lima NL, Soares AM, Mota RM, Monteiro HS, Guerrant RL, Lima AA. (2007) Wasting and intestinal barrier function in children taking alanyl-glutamine-supplemented enteral formula. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* **44**, 365-374
34. Liu J, Asano Y, Ikoma K, Yamashita S, Hirose Y, Shimoyama T, Takahashi S, Nakayama T, Nishino T. (2012) Purification, characterization, and primary structure of a novel *N*-acyl-D-amino acid amidohydrolase from *Microbacterium natoriense* TNJL143-2. *J Biosci Bioeng.* **114**, 391-397
35. Lomascolo A, Asther M, Navarro D, Antona C, Delattre M, Lesage-Meessen L. (2001) Shifting the biotransformation pathways of L-phenylalanine into benzaldehyde by *Trametes suaveolens* CBS 334.85 using HP20 resin. *Lett Appl Microbiol.* **32**, 262-267
36. Lundt BF, Johansen NL, Vølund A, Markussen J. (1978) Removal of t-butyl and t-butoxycarbonyl protecting groups with trifluoroacetic acid. Mechanisms, biproduct formation and evaluation of scavengers. *Int J Pept Protein Res.* **12**, 258-268

37. Martău GA, Călinoiu LF, Vodnar DC. (2021) Bio-Vanillin: towards a sustainable industrial production. *Trends Food Sci Technol.* **109**, 579–592
38. Matsuda K, Arima K, Akiyama S, Yamada Y, Abe Y, Suenaga H, Hashimoto J, Shin-Ya K, Nishiyama M, Wakimoto T. (2022) A Natural Dihydropyridazinone Scaffold Generated from a Unique Substrate for a Hydrazine-Forming Enzyme. *J Am Chem Soc.* **144**, 12954-12960
39. Meier-Kolthoff JP, Carbasse JS, Peinado-Olarte RL, Göker M. (2022) TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* **50**, D801-D807
40. Mhaskar SY, Prasad RBN, Lakshminarayana G. (1990) Synthesis of *N*-acyl amino acids and correlation of structure with surfactant properties of their sodium salts. *J Am Oil Chem Soc.* **67**, 1015–1019
41. Moore S, Spackman DH, Stein WH. (1958) Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Fed Proc.* **17**, 1107-1115
42. Moore S, Stein WH. (1948) Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J Biol Chem.* **176**, 367-388
43. Nierop Groot MN, de Bont JA. (1999) Involvement of manganese in conversion of phenylalanine to benzaldehyde by lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **65**, 5590–5593
44. Nierop Groot MN, de Bont JAM. (1998) Conversion of phenylalanine to benzaldehyde initiated by an aminotransferase in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol.* **64**, 3009-3013
45. Osborne TB, Mendel LB. (1914) Amino-acids in nutrition and growth. *J Biol Chem.* **17**, 325-349
46. Parker BM, Taylor IN, Woodley JM, Ward JM, Dalby PA. (2011) Directed evolution of a thermostable L-aminoacylase biocatalyst. *J Biotechnol.* **155**, 396-405
47. Pascual-Anaya J, D'Aniello S. (2006) Free amino acids in the nervous system of the amphioxus *Branchiostoma lanceolatum*. A comparative study. *Int J Biol Sci.* **2**, 87-92
48. Patel RN. (2016) Green Biocatalysis. John Wiley & Sons, Inc.
49. Pinazo A, Pons R, Pérez L, Infante MR. (2011) Amino acids as raw material for biocompatible surfactants. *Ind Eng Chem Res.* **50**, 4805–4817
50. Raab W, Gigg W. (1951) Concentration and Distribution of "Enkephalin" in the Brain of Humans, and Animals. *Proc Soc Exp Biol. Med.* **76**, 97–100

51. Rapport MM, Green AA, Page IH. (1948) Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem.* **176**, 1243–1251
52. Sano C. (2009) History of glutamate production. *Am J Clin Nutr.* **90**, 728S-732S
53. Shimbo K, Yahashi A, Hirayama K, Nakazawa M, Miyano H. (2009) Multifunctional and highly sensitive precolumn reagents for amino acids in liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* **81**, 5172-5179
54. Soo EL, Salleh AB, Basri M, Zaliha Raja Abdul Rahman RN, Kamaruddin K. (2003) Optimization of the enzyme-catalyzed synthesis of amino acid-based surfactants from palm oil fractions. *J Biosci Bioeng.* **95**, 361-367
55. Succar R, Mitchell VA, Vaughan CW. (2007) Actions of *N*-arachidonyl-glycine in a rat inflammatory pain model. *Mol Pain.* **3**, 24
56. Surburg H, Panten J. (2006) Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses, 5th ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
57. Takamine J. (1902) The blood-pressure raising principle of the suprarenal gland. *JAMA.* **38**, 153–155
58. Takehara M, Yoshimura I, Takizawa K, Yoshida Y. (1972) Surface active *N*-acylglutamate: I. Preparation of long chain *N*-acylglutamic acid. *J Am Oil Chem Soc.* **49**, 157–161
59. Tosa T, Mori T, Fuse N, Chibata I. (1966) Studies on continuous enzyme reactions. I. Screening of carriers for preparation of water-insoluble aminoacylase. *Enzymologia.* **31**, 214-224
60. Ullah I, Khan AL, Ali L, Khan AR, Waqas M, Hussain J, Lee IJ, Shin JH. (2015) Benzaldehyde as an insecticidal, antimicrobial, and antioxidant compound produced by *Photorhabdus temperata* M1021. *J Microbiol.* **53**, 127-133
61. Unilever (2021) Unilever Annual Report and Accounts 2021
62. Vandamme P, Goris J, Chen WM, de Vos P, Willems A. (2002) *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Syst Appl Microbiol.* **25**, 507-12
63. Wada E, Handa M, Imamura K, Sakiyama T, Adachi S, Matsuno R, Nakanishi K. (2002) Enzymatic synthesis of *N*-acyl-l-amino acids in a glycerol-water system using acylase I from pig kidney. *J Am Oil Chem Soc.* **79**, 41–46
64. Wang W, Xi H, Bi Q, Hu Y, Zhang Y, Ni M. (2013) Cloning, expression and characterization of D-aminoacylase from *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* ATCC 15173. *Microbiol Res.* **168**, 360-366

65. Willcock EG. (1906) The importance of individual amino-acids in metabolism: Observations on the effect of adding tryptophane to a dietary in which zein is the sole nitrogenous constituent. *J Physiol.* **35**, 88-102
66. Xiang DF, Patskovsky Y, Xu C, Fedorov AA, Fedorov EV, Sisco AA, Sauder JM, Burley SK, Almo SC, Raushel FM. (2010) Functional identification and structure determination of two novel prolidases from cog1228 in the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry.* **49**, 6791-6803
67. Xiang DF, Patskovsky Y, Xu C, Meyer AJ, Sauder JM, Burley SK, Almo SC, Raushel FM. (2009) Functional identification of incorrectly annotated prolidases from the amidohydrolase superfamily of enzymes. *Biochemistry.* **48**, 3730-3742
68. Xiang DF, Xu C, Kumaran D, Brown AC, Sauder JM, Burley SK, Swaminathan S, Raushel FM. (2009) Functional annotation of two new carboxypeptidases from the amidohydrolase superfamily of enzymes. *Biochemistry.* **48**, 4567-4576
69. Yokoigawa K, Sato E, Esaki N, Soda K. (1994) Enantioselective synthesis of *N*-acetyl-l-methionine with aminoacylase in organic solvent. *Appl Microbiol Biotechnol.* **42**, 287-289
70. Zhao CJ, Schieber A, Gänzle MG. (2016) Formation of taste-active amino acids, amino acid derivatives and peptides in food fermentations - A review. *Food Res Int.* **89**, 39-47
71. Zou TD, Deng CX, Wang ZR, Ye YL, You JM. (2019) Dietary alanyl-glutamine improves growth performance of weaned piglets through maintaining intestinal morphology and digestion-absorption function. *Animal.* **13**, 1826-1833
72. 押村英子 (2013) ヒトと地球にやさしく洗う-低刺激性・天然系洗浄用界面活性剤の開発と応用-, 日本化粧品技術者会誌、**46**、183-187
73. 横関健三 (1999) アミノ酸生産—発酵法と酵素法を中心として、化学と教育、**47**、478-482
74. 吉田良之助、竹原将博 (1975) アミノ酸および脂肪酸を原料とする新しい界面活性剤について、有機化学合成、**33**、671-678
75. 坂本一民 (1995) アミノ酸系界面活性剤、油化学、**44**、18-27
76. 太陽化学株式会社 (2009) L-テアニンの工業的生産技術の確立と機能性食品としての研究開発、農芸化学技術賞 受賞者講演要旨、11-14
77. 池田菊苗 (1908) グルタミン酸塩を主要成分とする調味料製造法、特許第 14805 号
78. 中森茂 (2008) アミノ酸発酵技術の系統化調査、国立科学博物館 技術の系統化調査報告 第 11 集
79. 中森茂 (2009) 酵素の生産と利用技術の系統化、国立科学博物館 技術の系統化調査報告 第 14 集

80. 徳永裕司（2021）香粧品概論、秦野研究所年報、**44**、7-13
81. 堀内哲嗣郎（2005）香り作りの材料を知る、におい・かおり環境学会誌、**36**、187-192
82. 味の素株式会社（2017）新規酵素による汎用的ペプチド新製法の開発とアスパルテームの工業生産、農芸化学技術賞 受賞者講演要旨、9-10

謝辞

本研究を遂行し博士論文をまとめるにあたり、研究指導教員として御指導、御助言いただきました、筑波大学生命環境系教授 中村顕先生に心より御礼申し上げます。また、副指導教員である、筑波大学 生命環境系教授 高谷直樹先生、生命環境系准教授 橋本義輝先生、生命環境系助教 榎尾俊介先生に深く御礼申し上げます。

本研究の推進にあたり多大なご協力、ご指導を賜りました、味の素株式会社 野崎博之氏、檀上景子氏、小野拓人氏、富山県立大学教授 浅野泰久先生に、御礼申し上げます。

博士課程への進学に際してご理解、ご協力いただきました、味の素 AGF 株式会社 萩野武史氏に感謝申し上げます。