



協和発酵バイオ

ジペプチド発酵技術の開発と工業化

協和発酵バイオ株式会社

はじめに

二つのアミノ酸が結合したジペプチドは、構成するアミノ酸と同等の栄養生理機能を持つだけでなく、溶解性や安定性などで構成アミノ酸より優れた物性を示したり、ジペプチドの構造に起因した生理機能を発現するものもあり、その潜在機能の発掘や、多様な機能を持つ新素材として用途開発が進められている。しかしながら一般的にジペプチドの経済的な工業製法はなく、安価に供給できないことがその進展の大きな障害となっていた。従来ジペプチドはアミノ酸を原料に保護基の導入、ペプチド結合形成、保護基の脱離を経る化学合成法（または化学酵素合成法）で生産されており（図1）、その技術の改良と最適化の結果、ジペプチド誘導体である人工甘味料アスパルテームは唯一の例外として商業生産されている。しかしながら技術の汎用性が乏しいため、その他のジペプチドについてこの製法では経済的に製造することは難しい。理想的なジペプチド製法は、二種の無保護のアミノ酸を直接意図する一定の順序で酵素的に結合させることである（図1）。そこで発酵法を目標としたジペプチドの抜本的な製法革新を最終目標として、この新規活性酵素の探索から取り掛かることにした。以下に各論を紹介する。

1. 新規ジペプチド合成酵素の探索と単離¹⁾

新規酵素探索の定石として活性（目的産物の生成）を指標とするスクリーニングを思い浮かべるが、対象産物のジペプチドは容易に生分解されるために、細胞を含む試料を用いた活性評価系では感度良く遂行する事は困難であると考えられた。そこでゲノム情報より候補遺伝子を絞り込み、該当遺伝子の組換え型精製酵素を用いることで細胞由来分解活性を排除し、高感度に活性を評価する手法を採用した。そこで問題となるのは候補遺伝子の絞り込みの方法である。目的活性を有する酵素およびその遺伝子情報が皆無であることから、目的酵素が潜在するという前提において、その構造的特徴の仮説を設定することで選抜することにした。そして以下の三つの条件を設定して机上での探索を実施した。①既知のペプチド結合形成活性を有する各種酵素に共通する反応におけるATP依存性からATP結合配列を持つこと、②当然ながら未だ見出されていない酵素のため機能未知遺伝子として分類されていること、③最も理想に近い

反応を有する酵素としてD-Ala-D-Ala ligase (Ddl) [EC 6.3.2.4]を挙げて（DdlはD-アミノ酸同士ではあるが α -ジペプチド形成活性を有していることから）、それに類似する構造を持つこと。その結果、最有力候補遺伝子として枯草菌*Bacillus subtilis* 168株由来の機能未知として登録されている*ywfE*が見出された。本遺伝子は枯草菌が生産するジペプチド抗生物質バシリシン(bacilysin)の生合成クラスター中に存在するものであった。大腸菌で発現した組換え型酵素を用いて活性評価した結果、遊離アミノ酸からATP依存的にジペプチドを合成する活性が確認された。本酵素はその構造的特徴からATP-dependent carboxy/thiol ligaseファミリーに属し、L-アミノ酸のみを基質に（D-アミノ酸とは反応しない）、 α -ジペプチドを特異的に合成する（ジペプチド以上のオリゴペプチドは合成しない）と同時に広いアミノ酸に対する基質特異性を有する（図2）という全く新規の性質を有することが分かったので、新たにL-アミノ酸 α -リガーゼ：L-amino acid α -ligase (Lal) [EC6.3.2.28]と命名した。

その後本酵素の結晶構造解析が兵庫県立大学との共同研究で進められ、基質結合部位を含む構造が明らかになっており²⁾、それらの情報を利用して変異型酵素を誘導し、合成可能なジペプチドの種類を増やせるような、より望ましい性質を有する酵素の創出が可能になってきている。

2. ジペプチド直接発酵法の構築と工業化³⁾

ジペプチドを構成するアミノ酸は、「発酵法」という技術革新によって安価供給を実現し用途開発を急拡大させた経緯がある。いわばジペプチドを取り巻く状況は、発酵法が確立する前のアミノ酸を思い浮かばせる。そこでジペプチド製法を革新すべく新たに発見したLalの酵素活性を活かして最終目標とするジペプチドの直接発酵プロセスの構築に取り組んだ。

前述のアミノ酸発酵によれば微生物は増殖しながらアミノ酸を合成できることから、今回発見したLalの活性を組み合わせれば、ジペプチドが安価な原料（グルコースやアンモニア）から微生物の増殖・代謝を通じて直接発酵生産できるものと想像できる。すなわち従来製法で必須であったアミノ酸を出発原料とすることはおろか、煩雑な工程操作も不要になりジペプチド

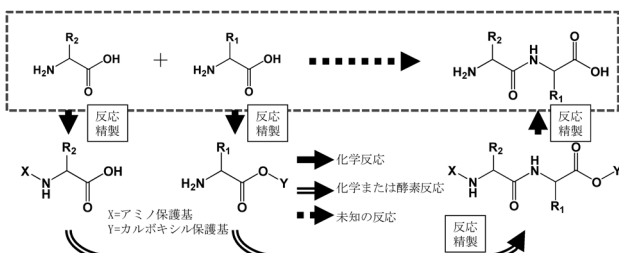


図1 ジペプチドの合成方法（化学合成法，化学酵素合成法）と理想的な合成反応（破線部分）

N末端L-アミノ酸	C末端L-アミノ酸														
	Gly	Ala	Ser	Cys	Thr	Val	Leu	Ile	Met	Phe	Tyr	Trp	Gln	Asn	His
Gly	●														
Ala	●	●													
Ser	●	●	●												
Thr	●				●										
Met								●	●	●					
Cys			●	●	●			●	●	●					●

図2 *YwfE* が合成可能なジペプチド

縦軸；生成するジペプチドのN末端になりえるアミノ酸、
横軸；生成するジペプチドのC末端になりえるアミノ酸。
●で示すジペプチドの生成が確認された。

の生産が一貫した酵素反応すなわち細胞内代謝で完結して生産できるということである。しかしながら本想定を単純に実践するだけではジペプチドの生成は確認できなかった。そこで種々の考察と検討の結果、ジペプチド発酵を成立させるための必要条件を明らかにした。それは [1] Lal を安定に発現強化させること (過剰な強化は生育を悪化また不安定化させる)、[2] 宿主細胞のジペプチドの分解活性および取り込み活性を欠失させること (安定なジペプチドの蓄積のため)、[3] 目的のジペプチドを構成するアミノ酸の供給を適度に強化すること (アミノ酸発酵の育種技術を応用する) である。これら多面的な育種による厳密な代謝改変を組み合わせることで、ジペプチドの効率的な直接発酵生産プロセスを構築することができた。しかしながらこの基本プロセスからスケールアップを進める工業化検討において、新たな課題が見えてきた。それは目的とは別の配列のジペプチドの副生が際立ってくる現象であり、これは元々基質特異性が広い Lal の特性を考えれば納得できることでもある (図2)。しかし副生ジペプチドは精製工程で産物と分離除去することが困難であるため培養工程での低減が望まれた。その対策として宿主細胞内における目的ジペプチドの構成アミノ酸濃度を最適に高める⁴⁾と同時に副生物を構成するアミノ酸濃度を下げるといった繊細で複雑な代謝改変の組合せによる解決法を見出した。また生産性向上と副生低減のために特定のジペプチドを能動的に排出できる膜タンパクの遺伝子を探索・同定し、その活性強化により目的ジペプチドを優先的に排出する育種方法も確立した⁵⁾。このようにして工業生産スケールでも目的産物を効率的に純度高く発酵生産できる生産菌および培養技術を完成できた。続く培養液からの単離精製・結晶化に関しては、従来のアミノ酸発酵における精製ノウハウを踏襲し最適化することで、特別な操作・装置を用いることなく低コストで高収率なプロセスを構築できた。現在ジペプチドの発酵法での工業的製造は国内工場 (山口事業所) にて実施している。

3. ジペプチド製品紹介

今回紹介する製品は、アミノ酸単体の物理化学的性質により、その使用が制限されてきたアミノ酸の代表例であるグルタミン (Gln) とチロシン (Tyr) に関して、アラニン (Ala) と連結させたジペプチドであるアラニルグルタミン (AlaGln) およびアラニルチロシン (AlaTyr) である。Gln および Tyr は水に対する溶解度が低く、またさらに Gln は溶液状態での安定性が低い (熱や高低 pH による易分解) 使用用途が制限されている。しかしながらそれらをジペプチドにすることで、前述の

表 1 ジペプチドによる Gln および Tyr の物性改善効果

アミノ酸	ジペプチド	溶解性 (g/L) (水, 25℃)	安定性
グルタミン Gln		53.7	不安定
	アラニルグルタミン AlaGln	550	安定
チロシン Tyr		0.62	安定
	アラニルチロシン AlaTyr	17.8	安定

自社データ

物理化学的な欠点を改善できることが知られており (表1)、特に AlaGln については Gln 成分の液状添加を強く望まれてきた医療用の輸液用途として、また米国健康食品市場においては協和発酵 USA から「SUSTAMINE™」というブランドでスポーツドリンク等、各種飲料用途で販売されている。その他 AlaGln と AlaTyr の双方において、急速な技術の進展とともに注目を集めているバイオ医薬品の製造用途 (動物細胞培養用培地) において適性があり需要が増え始めてきている。

従来技術との製品価格に対するメリットという点では、既存の化学合成法に比べて製造コストは 1/10 程度になっていると推定され、より使いやすい価格での供給が可能となり、新たな用途での需要喚起が期待される。

(引用文献)

- 1) K. Tabata, H. Ikeda & S. Hashimoto: *J. Bacteriol.*, **187**, 5195-5202 (2005).
- 2) Y. Shomura, E. Hinokuchi, H. Ikeda, A. Senoo, Y. J. Saito, H. Komori, N. Shibata, Y. Yonetani & Y. Higuchi: *Protein Sci.* **21**, 707-716 (2012).
- 3) K. Tabata & S. Hashimoto: *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 6378-6385 (2007).
- 4) M. Hayashi & K. Tabata: *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 3033-3039 (2013).
- 5) M. Hayashi, K. Tabata, M. Yagasaki & Y. Yonetani: *FEMS Microbiol. Lett.* **304**, 12-19 (2010).

謝 辞 Lal の結晶構造解析を行うにあたり、兵庫県立大学樋口芳樹先生ならびに研究室の方々にご指導、ご尽力いただきました。ここに深く感謝の意を表します。