

## 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

# Eat Well, Live Well.

# AJINOMOTO®

味の素株式会社

### はじめに

1901年、E. Fischer による Gly-Gly の合成が初めて報告されて以来、ペプチド生産技術は飛躍的に発展してきた。不要ペプチド副生を抑制し効率的にペプチド鎖を延長するための保護基の導入技術の確立（1930年代）、必要な縮合エネルギーを得るための活性エステル法等によるカルボキシ成分の活性化方法の確立（1950年代）、固相ペプチド合成法の確立（1963年）等の優れた技術開発によって、ペプチド合成法の基盤技術が確立された。一方、Bergman らによるプロテアーゼを用いるペプチド合成法の発見（1937年）以来、化学合成法で問題となるアミノ酸のラセミ化を回避する方法として酵素法が開発されたが、生成ペプチドが沈殿して系外に除去される特殊な例を除き高い生産性は得られていない。また、我々が本ペプチド新製法を発見した直後に、ATP を要求する ligase を用いたジペプチド生産方法が報告された。優れた方法であるが、生産可能なジペプチドの種類が限定される点、トリペプチド以上のオリゴペプチド生産が不可能な点等、汎用性に乏しいという課題も有している。

このように、汎用性と生産性が高い方法として化学合成法を中心にペプチド合成技術が確立されたが、アミノ酸への保護基の導入・脱離工程が必須であるため、新たなブレイクスルーが求められていた。

### 1. ペプチド新製法の開発

#### 1-1. 新製法開発の考え方

従来の工業製法の欠点を克服すべく、アミノ酸への保護基の導入と脱離工程の省略、縮合エネルギーとして高価な活性エステルや ATP からの脱却を念頭に、化学合成法と同様に高い生産性と汎用性を有する安価な酵素的新製法の構築を目指した。活性化エステル法に相当する方法として安価なメタノールを縮合エネルギーとする方法、すなわちカルボキシ成分として N-無保護のアミノ酸メチルエステル（アミノ酸-OMe）、アミン成分としては無保護のアミノ酸を基質とする方法を採用した（図1）。このような考えでの報告は極めて少なく、一部のペプチド合成において、カルボキシペプチダーゼ Y (CPase Y) 等を用いる方法が特許報告されているのみで、多量の酵素量添加、反応速度の低さ、汎用性の低さ等多くの課題を残していた。

#### 1-2. 新規酵素の探索と新製法の構築

新規酵素の探索において、アミノ酸がアミノ酸-OMe に求核攻撃してペプチドを生成する条件はアルカリ性下と予想されたが、アミノ酸-OMe はアルカリ水溶液中で容易にアミノ酸とメタノールに自発的分解するという基質の不安定性を有するので、基質の自発的分解速度を圧倒的に凌駕するペプチド合成速度（比活性）を有する新規酵素を採取することが必須条件となった。目的酵素を生産する微生物のスクリーニングに用いた系は、輸液成分として有用であるが高価なために需要が拡大できないと

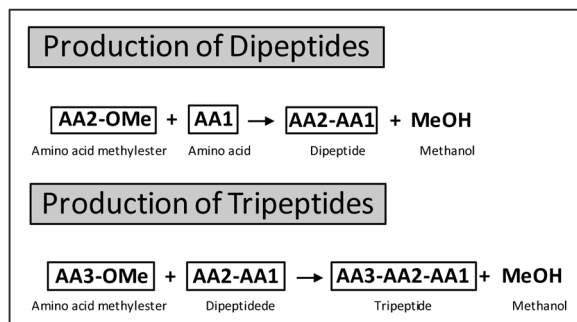


図1. 新規酵素によるペプチド生産様式

いう課題をもつ Ala-Gln に着目し、(Ala-OMe + Gln → Ala-Gln + メタノール) の系を選定した。生成 Ala-Gln を分解する菌体内プロテアーゼ活性を低下させ、ペプチド生成酵素が存在すれば菌体反応で Ala-Gln の蓄積が観察できる系を構築して微生物を広く検索した結果、Ala-Gln を微量生成する微生物は比較的多数見出されたが、高収率、高生産で Ala-Gln を生産する微生物の採取は困難を極めた。スクリーニング条件の変更等により最終的には *Empedobacter brevis* 等の数株の優良株を採取することができた。ペプチド合成の潜在能力を見極めるため、これら選抜株群から単離した精製酵素を用いてペプチド合成能を検討した結果、Ala-Gln の合成収率が 50% を超える酵素群と、10% 以下の酵素群に大別できた。精製酵素の分子量、これらの微生物からの目的酵素をコードする遺伝子の塩基配列決定により、高い合成収率を与える *Empedobacter brevis* 由来の酵素は約 70 kDa のモノマーからなる 2 量体のセリン酵素であった。既存酵素にはアミノ酸配列に高い相同性を示すものがないことより新規な酵素と推察された (amino acid ester acyl transferase と命名)。一方、低い合成収率しか得られない *Bacillus* 属細菌由来等の酵素はプロリンイミノペプチダーゼに高い相同性を示すことより、本酵素群によるペプチド合成はプロテアーゼによる転移反応により触媒され、そのため合成収率が低いものと考えられた。

最優良酵素として選出した *Empedobacter brevis* 由来の精製酵素を用いて、Ala-OMe (100 mM) と Gln (200 mM) からの Ala-Gln 合成反応を検討した結果、極めて短時間の反応で 80% 以上の高い合成収率が得られることが判明した。反応液には少量の Ala 副生が観察されたが、Ala-Ala, Gln-Ala, Ala-Ala-Gln 等のペプチド副生は観察されなかった。Ala-OMe は本反応系において短時間で完全に自発的に加水分解されるので、上記結果は、本酵素が Ala-OMe の自発的分解を圧倒的に凌駕するペプチド合成速度を有していることを示唆している。また、生成 Ala-Gln の分解、Ala, Gln のラセミ化も全く観察されず、目的とした能力をそなえている転移酵素であることが確認された。

本酵素の能力を検証するため、Ala-Gln 生産性を、既知酵素

の中で最も能力の高いと報告されているカルボキシペプチダーゼ Y と比較した結果, CPase Y の Ala-Gln 生産の比活性は,  $0.042 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$  protein と極めて微弱であるのに対し, 本酵素の比活性は,  $220 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$  protein と極めて高い値を示し, CPase Y の約 5000 倍という圧倒的なペプチド合成能力を示した (分子量当りの比活性は約 6000 倍).

### 1-3. 新製法の長所

本酵素の利点は, 高収率, 高生産性に加え, Ala-Gln 以外の種々のジペプチド合成に汎用的に応用できる点にある. 本酵素は, カルボキシ成分, アミン成分の双方に広い基質特異性を有しており, 種々のジペプチド生産に利用可能である.

本法の更なる利点は, 上記ジペプチド生産に加え, 鎖長 3 以上のオリゴペプチドの生産も可能な点にある. 本酵素は, N 成分としてジペプチド以上のペプチドも基質として認識でき, 種々のオリゴペプチド生産に応用可能である (図 1). 例えば, Thr-OMe と Gly-Gly, Gly-OMe と Gly-Tyr-Ala からの Thr-Gly-Gly, Gly-Gly-Tyr-Ala 生産収率は, それぞれ 83%, 44% に達する. また, 本酵素は種々の非天然型アミノ酸-OMe, 非天然型アミノ酸も基質として認識できるので, 非天然型アミノ酸を含むジペプチド合成にも応用可能であり, 汎用性に優れた安価なオリゴペプチド新製法として期待される.

## 2. ペプチド新製法の工業化

### 2-1. アスパルテームの工業化

アスパルテーム (Asp-Phe- $\alpha$ -OMe) は通常のジペプチドとは異なり, 構成成分の Asp は 2 つのカルボキシ基を有しアミン成分の Phe はメチルエステル化されているため, その製法には工夫が必要であった. まず Asp をメチルエステル化し Asp のジメチルエステル体 (MeO- $\beta$ -Asp- $\alpha$ -OMe) に変換し, 酵素反応でこの Asp ジメチルエステルに Phe を縮合させて OMe- $\beta$ -Asp-Phe を生産する. 生成された OMe- $\beta$ -Asp-Phe のメチルエステルは塩酸酸性化で自発的にアミン成分の Phe のカルボキシ基に転移するとともに, 転移生成した Asp-Phe- $\alpha$ -OMe (アスパルテーム) は難溶性の塩酸塩となって晶析するため, 酵素反応で得られた OMe- $\beta$ -Asp-Phe は全量アスパルテーム塩酸塩に転移晶析される. 本転移晶析技術は, 味の素(株)の従来の合成法において開発され工業化に大いに貢献した特徴ある技術である (図 2).

新規酵素として *Empedobacter brevis* から見出されたペプチド生成酵素のアミノ酸配列に相同性を有する酵素ホモログを広く検索し, 更に工業化に適した性質を有する酵素を生産する微生物として *Sphingobacterium* 属に属する細菌を選出した. 更にアスパルテームの効率生産に適した変異型酵素の取得に成功

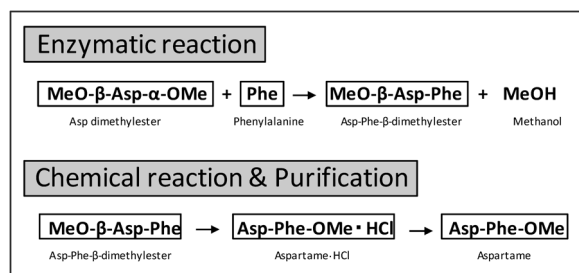


図 2. アスパルテームの生産方法

し, 変異型酵素を高発現させた微生物の培養条件, 本微生物を用いた酵素反応条件を種々検討し, 従来の化学合成法と同等の高生産性, 短時間反応のアスパルテーム生産を達成した. この反応液からのペプチドの効率的精製条件も確立し, 2012年7月にアスパルテームの工業生産を開始した. 現在も順調に稼働している (図 2).

### 2-1. おわりに

本技術は, 現在, 輸液成分として有用なアラニルグルタミンと高甘味度甘味料として広く利用されているアスパルテームの工業生産に使用されている. アラニルグルタミンはその輸液成分としての有効性は高く評価されているものの, 未だ市場規模は小さい. 一方, アスパルテームは世界規模で年間約 2 万 5 千トンという巨大な市場を形成しており, 味の素(株)のシェアはその 30% 程度を占めている (味の素(株)IR 資料 2016 年). 現在, 味の素(株)で生産するアスパルテーム全量が本技術で工業生産されるに至っている.

### (引用文献)

- 1) A Novel and Efficient Enzymatic Method for the Production of Peptides from Unprotected Starting Materials. K. Yokozeki and S. Hara, *J. Biotechnol.*, **115**, 211–220 (2005)
- 2) Gene Cloning and Characterization of  $\alpha$ -Amino Acid Ester Acyl Transferase in *Empedobacter brevis* ATCC 14234 and *Sphingobacterium siyangensis* AJ2458; Isao Abe, Seiichi Hara and K. Yokozeki, *BioSci. Biotechnol Biochem.* **75**, 2087–2092 (2011)
- 3) A Powerful New Tool for Peptide Production; Kenzo Yokozeki, *Specialty Chemicals Magazine*, **March**, 42 (2005)
- 4) 新規酵素を用いる工業的ペプチド新製法の開発; 横関健三, バイオサイエンスとインダストリー, **64**, 75–81 (2006)

謝 辞 研究を終始温かく見守ってくださった京都大学名誉教授 山田秀明先生, 京都大学名誉教授 清水昌先生, 東北大学および東京農工大学名誉教授 一島英治先生に心より感謝いたします.