



# Thermostable ATP Regeneration System Using Polyphosphate Kinase from *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 for D-Amino Acid Dipeptide Synthesis

*Thermosynechococcus elongatus* BP-1 由来ポリリン酸キナーゼを利用した耐熱性ATP再生系とD-アミノ酸ジペプチド合成への応用

(JBB, Vol.103, No.2, 179–184, 2007)

佐藤 大・増田 雄介・桐村光太郎・木野 邦器\*

ATP依存性酵素の触媒する反応は、生理学的だけでなく工業的にも有用な反応が多い。しかし、工業生産において、著量のATPを原料として使用することは不可能である。そのため、反応で消費されたATPを他のエネルギー物質を利用して再生するATP再生系が多く報告されている。なかでもポリリン酸キナーゼを利用した再生系は、安価で容易に入手できるポリリン酸をエネルギー物質とするシステムで、工業的利用にも適している。

著者らは、ATP依存性酵素であるアミノ酸リガーゼを用いた無保護D、L-アミノ酸からのペプチド合成を検討しており、D-アミノ酸ジペプチド合成プロセスにおいて有用な好熱性細菌 *Thermotoga maritima* 由来のD-アラニン-D-アラニンリガーゼ (TmDdl) を見いだしている<sup>1)</sup>。TmDdlは、60°Cの高温反応にて多くのD-アミノ酸を基質としたペプチド合成が可能であるが、従来のATP再生系には、このような高温域で利用可能な耐熱性システムは報告されていなかった。そこで、TmDdlのような耐熱性酵素の反応にも利用可能なシステムの開発を目的に、好熱性細菌由来の耐熱性ポリリン酸キナーゼを利用した耐熱性ATP再生系の構築を検討した。

本再生系に必要な耐熱性ポリリン酸キナーゼの取得のため、好熱性細菌のゲノム情報の中から、*Thermosynechococcus elongatus* BP-1が有するホモログ遺伝子の生産するタンパク質 (TePpk) に着目した。大腸菌組換え酵素として調製したTePpkは、期待通り70°Cまで安定なポリリン酸キナーゼ活性を有していた。また、TePpkとTmDdlによる精製酵素反応系でのペプチド合成 (60°C) においては、ATP濃度をペプチド合成反応の量論的必要量の1000分の1に削減しても有意な合成量が得られた。これらのことから、TePpkを利用した耐熱性ATP再生系が有効に機能することが明らかとなった。次に、プロセスの簡便化のため、休止菌体反応系によるペプチド合成を検討した。休止菌体を用いた反応においても、耐熱性ATP再生系は効率的に機能しており、初発の

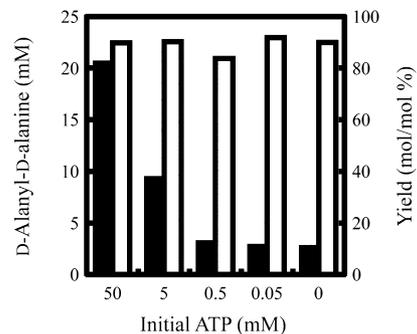


図1. 休止菌体反応におけるTePpkとTmDdlによるD-alanine-D-alanine合成。TmDdlのみの反応 (黒)、TePpkとTmDdlによる反応 (白)。

ATP添加量に関わらず高収率でのペプチド合成が可能であった (図1)。さらに予期せぬ結果として、反応系に外部からATPを添加しない条件下でも、80%を超える収率でペプチドが生成することが明らかとなった。これは、菌体内に微量残存していたATPとADPが再生サイクルに取り込まれ反応に利用されたものと考えられる。また、従来、休止菌体法では膜透過性の問題から、ATPなど核酸を必要とする物質反応系には困難があった。しかし、本研究によって、高温反応では常温菌宿主由来の夾雑酵素の失活による副反応の抑制に加え、菌体膜に損傷を与えることで、ATPやポリリン酸などの物質移動が容易になるという副次的な効果が示された。

本研究で開発した耐熱性ATP再生系は高温かつ休止菌体反応系でも利用可能であり、ペプチド合成に限定せず、多くのATP依存性酵素を用いた物質生産において汎用性の高いプロセスになるものと期待される。

- 1) Zhao, H. and van der Donk, W. A.: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**, 583 (2003).
- 2) Sato, M. et al.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **70**, 2790 (2006).

\* 著者紹介 早稲田大学理工学術院先進理工学部応用化学科 (教授) E-mail: kkino@waseda.jp