

B114

有機溶媒耐性 PST-01プロテアーゼを用いたアラニルアラニンの合成

(阪府大院工) ○水野ひなた・(正)松本拓也・(正)山田亮祐・
(武蔵野化学研) 富田健一・星野美奈子・(阪府大院工) (正)荻野博康*

1. 緒言

アミノ酸の一つであるアラニン (Ala) はアルコール代謝の促進、肝機能の改善、疲労回復作用などの効能を有する。また、ジペプチドは、アミノ酸より迅速に体内へ吸収されるため、アラニンを含むジペプチドであるアラニン含有ジペプチドを機能性食品や化粧品などに利用することにより、迅速な効能が期待できる。特に、アラニルアラニン (Ala-Ala) はアラニンだけで構成されたジペプチドであり、迅速かつ高い効能が期待される。

プロテアーゼは水溶液中でペプチド結合を加水分解する酵素であるが、有機溶媒などの非水系ではペプチド合成反応を触媒することが可能である。また、高価な補酵素を必要とせず、常温・常圧の温和な条件下で高純度にペプチド合成することができる。さらに、基質特異性により副生成物の生成も抑制できることから、プロテアーゼを用いたペプチド合成は環境負荷及び生産コストの低減につながる。

Pseudomonas aeruginosa PST-01 株が産生する PST-01 プロテアーゼは、有機溶媒存在下で高い活性および安定性を有する有機溶媒耐性酵素であり¹⁾、PST-01 プロテアーゼを用いることにより、Cbz-Arg-Leu-NH₂²⁾ やアスパルテム前駆体 (Cbz-Asp-Phe-OMe)³⁾ などのジペプチドの合成が可能である。

本研究では、種々の条件下で、PST-01プロテアーゼを用いたアラニルアラニン前駆体 (Cbz-Ala-Ala-NH₂) の合成反応を検討した。

2. 実験方法

PST-01 プロテアーゼ遺伝子を有するプラスミドで形質転換した *Escherichia coli* JM109 株を培養し、細胞内に蓄積された PST-01 プロテアーゼは、細胞の超音波破碎、活性化、硫酸アンモニウムを用いた塩析による分画、および精製し、凍結乾燥することで PST-01 プロテアーゼの精製粉末を得た。

0.1~0.3 g/L PST-01 プロテアーゼを用い、基質である 10 mM Cbz-Ala と 200 mM Ala-NH₂ を pH 7.0、30°C で保温することによりジペプチド Cbz-Ala-Ala-NH₂ を合成した。反応が平衡に達した時の収率を平衡収率とした。

反応溶液の組成は、HPLC を用い、波長 254 nm の吸収で検出した。

3. 結果

種々の有機溶媒存在下、pH 7.0、30°C で Cbz-Ala-Ala-

NH₂ を合成した時の平衡収率を図1に示す。種々の濃度のアルコールを用いた場合、60% (v/v) メタノール存在下で合成した時、平衡収率が比較的高く、37.6%であった。一方、60% (v/v) ジメチルスルホキシド (DMSO) 存在下で合成した時、平衡収率は66.7%に達した。また、60% (v/v)メタノール存在下、pH 7.0、種々の温度で合成した時の反応速度を図2に示す。Cbz-Arg-Leu-NH₂合成では、40°C で最大となったが²⁾、Cbz-Ala-Ala-NH₂合成では、30°C で最大となり、114.8 μmol・min⁻¹・g-enzyme⁻¹であった。

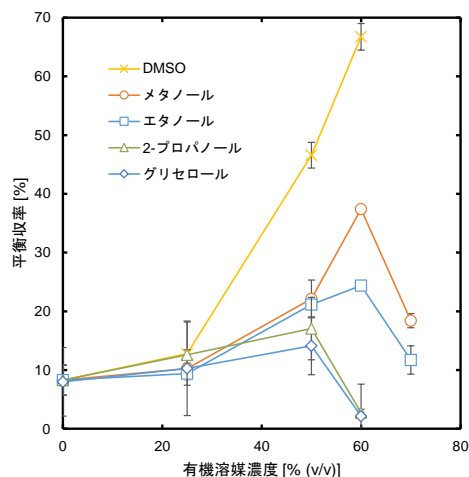


図1. Cbz-Ala-Ala-NH₂合成に及ぼす有機溶媒濃度の影響

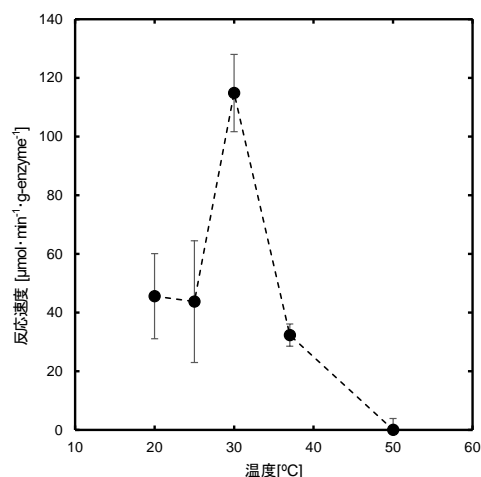


図2. Cbz-Ala-Ala-NH₂合成に及ぼす温度の影響

引用文献

- 1) Ogino, H. *et al.*; *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 61-68 (1999).
- 2) Ogino, H. *et al.*; *Biochem. Eng. J.*, **5**, 219-223 (2000).
- 3) Tsuchiyama, S. *et al.*; *Biotechnol. Prog.*, **23**, 820-823 (2007).

* ogino@chemeng.osakafu-u.ac.jp