

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05576

研究課題名(和文) 環境メタゲノム由来 ペプチド分解酵素の探索と ペプチド材料合成への応用

研究課題名(英文) Screening of novel beta-peptide hydrolases from metagenomic libraries and their applications for synthesis of functional beta-peptide materials

研究代表者

平石 知裕 (Hiraishi, Tomohiro)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・専任研究員

研究者番号：20321804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、環境試料から直接DNAを抽出してメタゲノムライブラリを作製し、分解活性を指標としたスクリーニングによる難培養微生物由来の新規分解酵素の獲得を目指した。効率的な分解酵素の獲得を可能とするため、採取した環境試料(土壌や河川水)で目的ポリマーの生分解実験を行い、得られたバイオフィームからライブラリを作製した。次いで、既知の分解酵素をポジティブコントロールとして用いて活性スクリーニング条件を検討し、最適条件下における環境メタゲノムスクリーニングを行ったところ、高い活性を示すクローンを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で標的としている ペプチド分解酵素は希少性が高く、現在得られている知見は限定的である。また、自然界には ペプチドのみで構成される化合物は存在しないため、ペプチド分解酵素の生理学的・進化的役割は不明である。従って、本研究で得られる知見により、特異な活性である ペプチド分解活性の発現メカニズムが解明されれば、学術的・社会的意義が非常に高いといえる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is the screening of novel β -peptide hydrolases from metagenomic libraries of environmental samples such as soil and fresh water. For effective screening of the enzymes, biodegradation of the polymer by the environmental samples was carried out and the resultant biofilms generated during the biodegradation were used for construction of metagenomic libraries. The optimum assay conditions for high-throughput-screening of the enzymes using multiple pNP substrates were examined. Functional screens were carried out under the optimum assay conditions and the hydrolysis activity of some clones was higher than that of the negative control cells.

研究分野：生物物理化学

キーワード：ペプチド分解酵素 環境メタゲノム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) β ペプチドの性質

β ペプチドは、天然の α ペプチドと構造的な類似性を有しながら、側鎖や官能基の置換により性質を変えることができ、特徴として①非常に高い酵素・代謝安定性、②低細胞毒性及び低溶血性、③正電荷 β ペプチドと核酸・細胞膜との強い相互作用、等を有する。これらの性質を利用することで、材料・医薬・生化学分野における応用が見込まれている。

(2) β ペプチド分解酵素

熱重合ポリアスパラギン酸(tPAA)は、70%の β ペプチドを含む代表的なバイオベース β ペプチド材料である。 β ペプチドを実際に使用する際、使用後の安定性、特に生分解性を考慮する必要がある。そこで我々は、tPAA 生分解機構の解明を目指した研究に取り組んできた。その結果、 β ペプチド連鎖のみを認識・分解する β ペプチド分解酵素(PahZ1)を世界で初めて発見した(①、②)。さらに、 β アスパラギン酸 3 量体を用いて本酵素の活性中心構造を評価する手法を確立した(③)。

(3) β ペプチド分解酵素を触媒とした β ペプチド合成

β ペプチドは固相合成や NCA 法で得られるが、高分子量化に伴う高コスト化・合成困難や有毒試薬の使用等のため新合成法の開発が望まれる。一方、酵素によるポリマー合成では、加水分解酵素を利用した系が提案されている。これらの視点から、我々は PahZ1 の基質特異性を利用した β -PAA 合成を行った(④)。その結果、得られたポリマーの構成成分は全て β ペプチドであったが、多量の酵素が必要な上、分子量は約 2,000 とあまり効率的ではなかった。

(4) 環境メタゲノム(難培養微生物)由来酵素

従来は、1%未満の培養可能微生物から目的酵素を取得する努力をしていたが、未使用である残り 99%の難培養微生物を利用できれば有用酵素の収集量は遥かに増大する。これまでにメタゲノムスクリーニングによる酵素獲得に関して数十報以上の報告があるが、 β ペプチド分解酵素に関する報告はない(⑤)。

2. 研究の目的

β ペプチドは、 α ペプチドの長所を維持しつつ易分解性を改良した材料であり、生体内などでの利用が期待される。我々が最近発見した β ペプチド分解酵素は、その反応可逆性によってバイオマス由来のアスパラギン酸から新奇な β ペプチドである β ポリアスパラギン酸(β -PAA)を合成できる。しかし、この系の反応効率が高くないため、合成に最適な酵素の獲得・創成が必要である。一方、現在使用可能な全ての酵素は、環境中の培養可能な 1%未満の微生物から得られたものであり、残り 99%の微生物資源の有効利用が望まれている。

そこで本研究では、環境試料から直接 DNA を抽出してメタゲノムライブラリを作製し、 β ペプチド分解活性を指標としたスクリーニングを行い、 β ペプチド骨格を有する機能性材料開発を指向した難培養微生物由来新規 β ペプチド分解酵素の獲得を目指す。

3. 研究の方法

(1) 環境 DNA メタゲノムライブラリの構築

様々な環境サンプルから DNA を抽出・増幅した後、数 kbp 程度に断片化した。次いで、断片化 DNA を発現ベクターに導入した後、大腸菌を形質転換してマイクロプレート上でライブラリを作製した。

(2) ハイスループットな活性スクリーニング系の構築

我々が有している β ペプチド分解酵素あるいは PHB 分解酵素をポジティブコントロールとして用いて酵素発現の条件検討を行った。さらに、分解酵素のスクリーニングに利用するハイスループットな分解活性評価法を検討した。

4. 研究成果

(1) 環境 DNA メタゲノムライブラリの構築

環境試料からメタゲノムライブラリを作製するには「DNA 取得・増幅・精製・断片化・ライブラリ化」の各ステップを最適化する必要がある。そこで、これらの各ステップにおいて条件検討を行った。まず、土壌あるいは河川水の環境試料から環境 DNA を抽出・増幅した後、断片化および断片化 DNA の精製条件を検討したところ、良質なライブラリ作製には低断片化 DNA の除去が肝要であることが示唆された(図 1(A))。また、DNA 増幅時による環境 DNA の質的劣化がライブラリ作製に負の影響を与えていることが予想された。

そこで、これらの問題点を解決するため、ライブラリ作製方法の改良を試みた。効率的な分解酵素遺伝子の獲得を可能とするため、採取した環境試料で目的ポリマーの生分解実験を行い、十分に生分解が進行した溶液中のバイオフィームから DNA を分離精製することとした。まず、生分解後の溶液からバイオフィームを遠心分離で回収し、得られたバイオフィームから DNA を精製した。また、DNA 増幅時による DNA の低品質化を避けるため、精製 DNA は増幅せずに用いた。さらに、制限酵素により断片化した後、低断片化 DNA を電気泳動で除去してライブラリ作製を行った。得られたライブラリから任意のコロニーを選択し、それらのクローンにおいて挿入された断片を PCR 増幅して解析した(図 1(B))。電気泳動による解析の結果、改良した手法により低断片化 DNA の挿入が抑制されていることがわかった。さらに、挿入された DNA 断片は、ほとんどが 2.5 kbp 以上であり、最も大きいもので 24 kbp 程度の長鎖 DNA であったことから、良質なライブラリの作製方法を構築できたことがわかった。

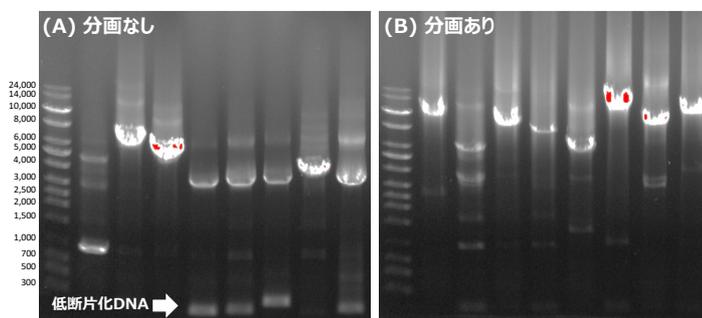


図1 環境メタゲノムライブラリにおける挿入断片の解析。(A) 分画なし (B) 分画あり

(2) ハイスループットな活性スクリーニング系の構築

分解酵素の同定・スクリーニングに利用する分解酵素活性評価法を検討した。ポジティブコントロールとして β 結合の連鎖を切断可能である *Rlastonia pickettii* T1 由来 PHB 分解酵素を、基質としてアルキル鎖長の異なる p-ニトロフェニルアルカノエート (アルキル鎖長: 2, 4, 6, 8) を用いた。培養条件、酵素濃度及び最適基質濃度をそれぞれ検討し、最適条件 (培養スケール: 1-2 mL、酵素濃度: 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、基質濃度: 0.5 mM each) を決定した(図 2)。

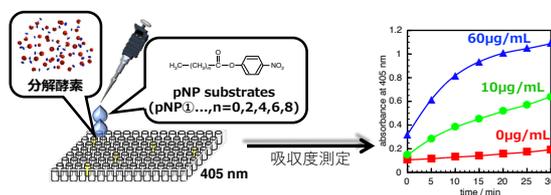


図2 分解酵素活性評価法

次いで、(1)で作製した環境 DNA メタゲノムライブラリを用いて、最適条件下における活性スクリーニングを行った。現在までに約 1 万クローンについて分解活性によるスクリーニングを行った。その結果、明確に高活性を示すクローンはみられなかったものの、ネガティブコントロールに比べ比較的高い活性を示すものが得られた(図 3)。これまでのメタゲノムスクリーニングによる酵素獲得に関する報告から、エステラーゼやリパーゼなどの加水分解酵素の獲得には、およそ 1 万~10 万クローンに対するスクリーニングが必要であることが経験的に知られている(⑤)。したがって、今後、今回得られたポジティブクローンを詳細に解析するとともに、メタゲノムライブラリのスクリーニング数を増加させていくことで、新規分解酵素遺伝子の獲得につながることを期待される。

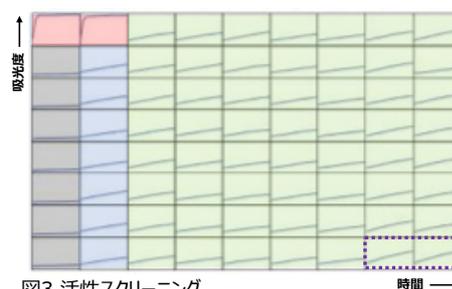


図3 活性スクリーニング
赤: 酵素溶液, 灰色: 基質のみ, 青: ネガコン, 緑: 試料
紫点線: 高活性クローン

<引用文献>

- ① T. Hiraishi et al., "Genetic analysis and characterization of poly(aspartic acid) hydrolase from *Sphingomonas* sp. KT-1", *Biomacromolecules*, 2003, 4, 80-86.
- ② T. Hiraishi et al., "Cloning of poly(aspartic acid) (PAA) hydrolase-1 gene from *Pedobacter* sp. KP-2 and hydrolysis of thermally synthesized PAA by its gene product", *Macromol. Biosci.*, 2009, 9, 10-19.
- ③ T. Hiraishi et al., "Substrate stereoselectivity of poly(Asp) hydrolase-1 capable of cleaving β -amide bonds as revealed by investigation of enzymatic hydrolysis of stereoisomeric β -tri(Asp)s", *AMB Express*, 2015, 5, 31.
- ④ T. Hiraishi et al., "Enzymatic synthesis of poly(α -ethyl β -aspartate) by polyethylene glycol-modified poly(aspartate) hydrolase-1", *Macromol. Biosci.*, 2011, 11, 187-191.
- ⑤ Brady et al., "Biocatalysts and small molecule products from metagenomic studies", *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2012, 16, 109-116.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 平石知裕	4. 巻 73
2. 論文標題 ポリアスパラギン酸分解酵素の構造と機能：非天然型 -ペプチドの酵素分解	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学と工業	6. 最初と最後の頁 852-854
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 平石知裕、阿部英喜、前田瑞夫
2. 発表標題 大腸菌由来ラッカーゼ変異体の性質
3. 学会等名 第9回 JACI/GSCシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平石知裕、久野玉雄、阿部英喜、前田瑞夫
2. 発表標題 ポリアスパラギン酸分解酵素の基質認識メカニズム
3. 学会等名 第68回高分子討論大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Hiraishi; H. Abe; and M. Maeda
2. 発表標題 Recombinant expression of E. coli laccase and its characteristics
3. 学会等名 IUPAC 47th World Chemistry Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大槻拓馬、竹中康将、平石知裕、阿部英喜、朝倉則行
2. 発表標題 QCMと電気化学測定を用いた生分解性ポリマーの分解過程の解析
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 平石知裕	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 291
3. 書名 「生分解性プラスチックの環境配慮設計指針 第5章 ポリアスパラギン酸分解酵素の構造と機能」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立研究開発法人理化学研究所 研究紹介 環境資源科学研究センター バイオプラスチック研究チーム https://www.riken.jp/research/labs/csrs/bioplasic/index.html
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------