

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06551

研究課題名(和文)新規D-ペプチド分解酵素の同定とその酵素科学的諸性質の解明

研究課題名(英文) Identification and characterization of an unprecedented D-peptide degrading enzyme

研究代表者

山中 一也 (Yamanaka, Kazuya)

関西大学・化学生命工学部・准教授

研究者番号：30756870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、放線菌 *Streptoalloteichus hindustanus* に見出した天然酵素としては初の例となるD-アミノ酸のみから構成されるペプチド(D-ペプチド)分解酵素の同定と、その酵素学的諸性質の解明を目指した。候補遺伝子の異種放線菌への導入実験を通して、D-ペプチド分解酵素の実態が細胞膜結合型の β -ラクタマーゼ様セリンプロテアーゼ(Dpd)であることを明らかにした。この酵素は難発現性であったため機能解析は難航したが、そのホモログ酵素の機能解析を通して、Dpdがエキソ型のペプチダーゼであること、鎖長の長いD-ペプチドを特異的に分解することなど、その酵素学的諸性質を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で見出したDpdは、鎖長の長いD-ペプチドを好んで分解する初の酵素である。本研究で得た知見を基に、タンパク質工学的手法による当該酵素の機能拡張や、逆反応を利用した非天然型生理活性D-ペプチドの創生など創薬分野への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we successfully identified the first enzyme that is capable of degrading a peptide solely consisting of D-amino acid from *Streptoalloteichus hindustanus*. Through the *in vitro* biochemical assays, we revealed that the enzyme, Dpd, showing quite low level of similarity to β -lactamase-like serine hydrolases is an exo-peptidase with strict specificity to D-amino acid residues. This demonstration could open new avenue in creation of bioactive peptides with D-configuration using the reverse reaction of Dpd.

研究分野：農芸化学

キーワード：D-アミノ酸 生理活性ペプチド 分解酵素

1. 研究開始当初の背景

D-アミノ酸は、細菌ペプチドグリカンの構成成分など極めて限られた生体成分と考えられてきた。しかし近年の分析技術の進展に伴い、微生物、植物を始め、哺乳動物にも様々な遊離 D-アミノ酸が存在し、多様な生理機能を果たしていることが明らかになっている。一方、生体内でリボソーム依存的に合成されるタンパク質やペプチドを構成する 20 種類のアミノ酸は、グリシンを除いてすべて L-アミノ酸である。例外的に、リボソーム非依存的に生合成されるペプチド性抗生物質の中には D-アミノ酸を含有するものも見出されており、その多くは、遊離 D-アミノ酸と同様に重要な生理活性を示すことが知られている。従って、D-アミノ酸から成る生理活性ペプチドの新規創生技術や量産プロセスの構築は医薬品産業分野における重要な技術課題である。

これまでに数例のアミノ酸リガーゼを利用した D-アミノ酸含有ペプチドの合成法が報告されている。しかしその合成反応には高価な補酵素 ATP を必要とすることから、持続的な生産には補酵素再成系とカップリングさせる必要があり、経済性及び操作性の面で量産プロセスへの適応は困難である。また、鎖長の長いペプチドを合成することもできない。一方、ペプチドの分解反応を触媒するアミノペプチダーゼの逆反応を利用した D-アミノ酸含有ペプチド合成は、これらの技術課題の解決を導くものと期待できる。しかしながら、これまでに見いだされた D-アミノ酸残基にも作用し得る γ -ラクタマーゼ様ペプチダーゼは、何れも基質認識が厳密であり、ペプチド基質の N-末端に位置する D-アミノ酸残基を遊離する又は 4 残基程度の D-“オリゴ”ペプチドに対して微弱な活性を示すのみであり、残念ながら D-アミノ酸のみから成る鎖長の長いペプチド(D-ペプチド)を好んで分解するものは見出されていないことから、その逆反応を利用した D-ペプチド合成も未だ実現していない。従って、D-ペプチドを分解し得る新規ペプチダーゼを探索し、その機能を解析することは、学術的にも産業応用の観点からも大変意義深い知見を与えるものと期待される。

2. 研究の目的

天然から D-アミノ酸のみで構成される長鎖ペプチドを分解するペプチダーゼが見出された例はなく、やみくもに D-アミノ酸含有合成ペプチドに対して分解活性を示す微生物を探索しても、これを見出すのは至難の業と考えられる。しかし、本研究代表者らは「D-アミノ酸のみを構成残基とする“抗菌性ペプチド”を生産する微生物を見出すことができれば、その微生物は自己耐性機構として D-ペプチドを特異的に分解する酵素も同時に有しているのでは？」という予想に基づく探索を通して、放線菌 *Streptoalloteichus hindustanus* NBRC15115 が、天然物としては極めて稀な D-アミノ酸のみから構成される γ -ポリ-D-ジアミノブタン酸(poly-D-Dab)を著量生産すること、更に本菌細胞表層には poly-D-Dab の分解酵素が局在していることを見出した。この結果は、長鎖 D-ペプチドの分解酵素が天然にも存在することを示す最初の例である。この新規 D-ペプチド分解酵素の構造機能相関を明らかにすることができれば、ゲノム情報に基づくホモログ酵素の探索や、タンパク質工学的手法による当該酵素の機能拡張、更には逆反応を利用した非天然型生理活性 D-ペプチドの創生など創薬分野への応用も期待できることから、その学術的意義は高く、発展性も極めて大きい。そこで *S. hindustanus* が有する新規長鎖 D-ペプチド分解酵素の同定と、その酵素学的諸性質を明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) D-ペプチド分解酵素反応基質 (poly-D-Dab) の調製及び休止菌体反応による分解活性の検出
poly-D-Dab 生産菌 *S. hindustanus* を 1L スケールのミニジャーファーメンターで培養した。培養液上清にメタノール-アセトン混合溶液を加えてカチオン性高分子を晶析し、これを弱塩基性緩衝液に溶解した後、陽イオン交換クロマトグラフィーに供して poly-D-Dab を分離精製した。LC-MS 及び MALDI-TOF/MS を用いて精製標品の純度を確認した後、純水に溶解して基質溶液とした。

1 mg/ml の Poly-D-Dab を含む緩衝液に、生理食塩水で洗浄した各種 D-ペプチド分解酵素発現菌体を懸濁して休止菌体反応を行った。経時的にサンプリングした反応液上清の一部を TLC プレートにスポットして展開した。基質 Poly-D-Dab 及び分解反応産物の L-Dab はニンヒドリンにて検出した。

(2) D-ペプチド分解酵素の同定

本菌の poly-D-Dab 生合成 (*pdd*) 遺伝子クラスター (全長 45-kbp) には細胞膜結合型 Peptidase M50B ファミリーのメタロプロテアーゼ、及び γ -ラクタマーゼ様酵素がコードされていることから、これらの何れかが poly-D-Dab 分解酵素であると予想された。

そこでまず初めに、*pdd* 遺伝子クラスター全長を BAC ベクターにクローニングし、このベクターを導入した異種放線菌 *Streptomyces lividans* TK23 株の休止菌体反応における poly-D-Dab 分解活性を指標として *pdd* 遺伝子群に D-ペプチド分解酵素遺伝子がコードされている否かを検証した。次に *pdd* 遺伝子群にコードされている D-ペプチド分解酵素候補遺伝子を、それぞれの

プロモーター領域と共に染色体導入型ベクターpSET152 にクローニングした。これらを *S. lividans* TK23 株に導入し、導入株の休止菌体反応における poly-D-Dab 分解活性を指標に poly-D-Dab 分解酵素の絞り込み及び同定を行った。

(3) D-ペプチド分解酵素の異種発現

D-ペプチド分解酵素遺伝子全長又は N-末端シグナル配列コード領域を除いた遺伝子領域を各種 pET 系ベクターにクローニングし、これらの大腸菌 BL21(DE3) 又はその誘導体株への導入を経て、組み換え酵素発現系を構築した。

N-末端シグナル配列コード領域を除いた遺伝子領域を PCR 増幅し、これを Sec/SP1 型分泌シグナルを含む pNCM02 ベクターにクローニングした。これを *Brevibacillus choshinensis* HPD31-SP3 株へ導入し、定法に従いタンパク質発現を試みた。

pSET152 ベクターを骨格とする独自の発現ベクターに、N-末端シグナル配列コード領域を含む D-ペプチド分解酵素遺伝子全長をクローニングした。この発現ベクターを異種放線菌 *S. lividans* TK23 株へ導入し、組み換えタンパク質の発現を誘導した。

上記の何れの発現系においても、D-ペプチド分解酵素はヘキサヒスチジンタグ融合タンパク質として発現する。従って、組み換え酵素は Ni-アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。

(4) D-ペプチド分解酵素の機能解析

精製した D-ペプチド分解酵素を pH5~9 の緩衝液中で 1 mg/ml の Poly-D-Dab と反応させ、分解反応の進行に伴って遊離する D-Dab を、Merfey 法を用いて定量的に解析した。また、分解による基質 Poly-D-Dab の減少はメチルオレンジを用いた比色定量により、更に Poly-D-Dab 鎖長の変化は LC-MS 解析により評価した。

4. 研究成果

(1) D-ペプチド分解酵素の同定

S. hindustanus 由来の poly-D-Dab 生合成 (*pdd*) 遺伝子クラスター (全長 45-kbp) を導入した *S. lividans* TK23 株は、非導入株には見られない顕著な poly-D-Dab 分解活性を示したことから、D-ペプチド分解酵素は *pdd* 遺伝子クラスター内にコードされることを確認した。当該遺伝子群には細胞膜結合型 Peptidase M50B ファミリーのメタロプロテアーゼ、及び α -ラクタマーゼ様酵素がコードされていたことから、これらの何れかが poly-D-Dab 分解酵素であると予想された。そこで次にそれぞれの遺伝子をプロモーター領域と共に染色体導入型ベクターpSET152 にクローニングして *S. lividans* TK23 株に導入したところ、 α -ラクタマーゼ様酵素遺伝子の導入株が poly-D-Dab 分解活性を示したことから、本研究で機能解明を目指す D-ペプチド分解酵素の実体が、 α -ラクタマーゼ様の新奇酵素 (Sh-Dpd) であることが明らかになった。

これまでに、D-アミノ酸含有ペプチドに作用する α -ラクタマーゼ様セリンプロテアーゼが数例報告されている。しかしながら、Sh-Dpd は既報の α -ラクタマーゼ様セリンプロテアーゼとは極めて弱い相溶性しか示さない一方で、触媒残基及びその周辺には一定の保存性が認められることが分かった (図 1)。また、当該酵素は N 末端には細胞表層局在型のタンパク質に特有の Sec/SP11 型のシグナル配列を有していることが分かった。これは、*S. hindustanus* において細胞表層に poly-D-Dab 分解が検出されるという事実ともよく一致するものであった。

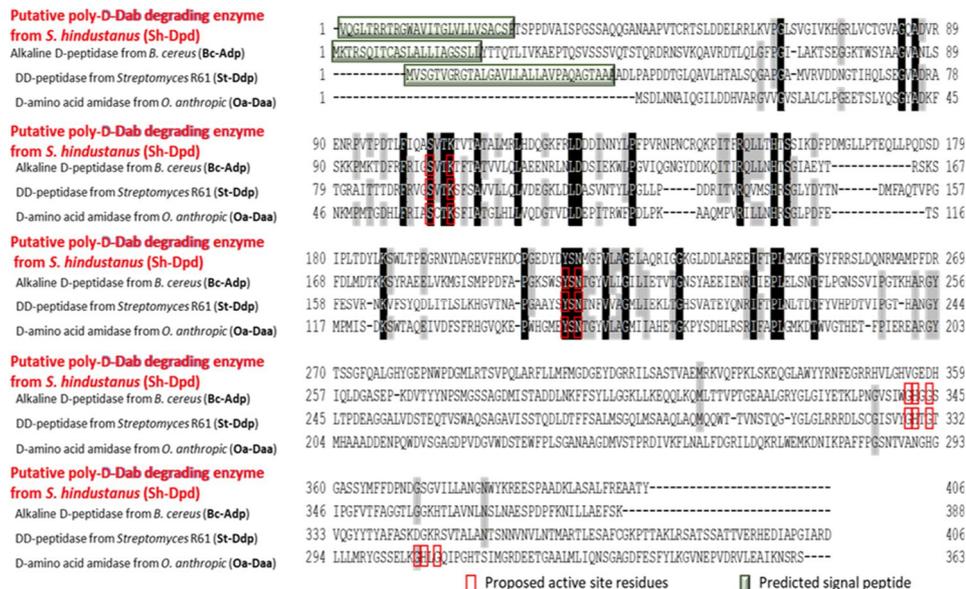


図1. poly-D-Dab分解酵素とD-アミノ酸残基に作用する α -ラクタマーゼ様セリンプロテアーゼのアミノ酸配列アライメント

(2) Sh-Dpd の機能解析に向けた組み換え酵素の構築

大腸菌を宿主として Sh-Dpd 全長又は N-末端シグナル配列コード領域を除いた領域を組み換えタンパク質として発現させたところ、何れもその殆どが不溶性封入体として発現し、機能的な組み換え酵素の構築は困難を極めた。また、マルトース結合タンパク質などの各種可溶性発現促進タグとの融合発現も試みたが、何れも発現タンパク質は不活性であった。唯一、僅かながら可溶性タンパク質として取得することができた N 末端シグナル配列に替えてヘキサヒスチジンタグを融合させた Sh-Dpd も、*in vitro*において微弱な poly-D-Dab 分解活性を示したものの、精製後まもなく失活するという不安定性を抱えることが分かった。*Brevibacillus choshinensis*を宿主とした発現系においても、組み換え Sh-Dpd を取得することは困難であった。*S. lividans* TK23 株を宿主とした独自の発現系においては、微量ながら精製 Sh-Dpd を取得することが可能であったが、やはり精製酵素は数時間で失活し、*in vitro*での詳細な機能解析を進めることは困難であった。

(3) Sh-Dpd ホモログを用いた D-ペプチド分解酵素の機能解析

機能解析に耐え得る組み換え Sh-Dpd を取得することが困難であったことから、当該酵素のホモログ酵素を用いた機能解析を行うべく、Sh-Dpd のアミノ酸配列をクエリーとして微生物ゲノムデータベースを探索したところ、グラム陰性細菌 *Skemanella aerolata* に 65% の同一性を示すホモログ酵素 (Sa-Dpd) を見出した。この Sa-Dpd には、Sh-Dpd における推定触媒残基及びその周辺配列は高度に保存されていたことから、Poly-D-Dab 分解活性を発現するものと期待できた。また、Sa-Dpd は Sh-Dpd とは異なり、N 末端にシグナル配列を有しておらず、更に大腸菌発現宿主内である程度の可溶性発現も可能であった。そこで、当該ホモログ酵素を用いた機能解析を進めることにした。

Sa-Dpd は、酵素活性を保ったまま Ni-アフィニティークロマトグラフィー精製することが可能であった。本酵素は Poly-D-Dab 良好な基質として受容し、鎖長の長い Poly-D-Dab (35 ± 7 残基) も D-Dab モノマーにまで完全分解した。また、その分解過程では D-Dab オリゴマーは生じず、D-Dab のみが蓄積したことから、Dpd はエキソ型のペプチダーゼであることが分かった。本酵素は L 体のジアミノ酸 (リジン、オルニチン、及びジアミノプロパン酸) からなる各種合成イソペプチドや、Poly-D-Dab と鏡像関係にある Poly-L-Dab は基質として受容せず、D-アミノ酸残基特異的であることが分かった。また、その分解反応の至適 pH は 7~8 付近であることも明らかとなった。

以上の研究を通して初の例となる長鎖 D-ペプチド分解酵素を同定し、その酵素学的性質の一端を明らかにすることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yamanaka Kazuya, Fukumoto Hibiki, Takehara Munenori, Hamano Yoshimitsu, Oikawa Tadao	4. 巻 15
2. 論文標題 The Stereocontrolled Biosynthesis of Mirror-Symmetric 2,4-Diaminobutyric Acid Homopolymers Is Critically Governed by Adenylation Activations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1964 ~ 1973
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acscchembio.0c00321	査読の有無 有
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮脇大輝, 福本響, 濱野吉十, 老川典夫, 山中一也
2. 発表標題 ポリ-D-ジアミノブタン酸生産放線菌 <i>Streptoalloteichus hindustanus</i> に見出した新規D-ペプチド分解酵素の同定
3. 学会等名 日本生物工学会大会 2019年9月18日 岡山大学 津島キャンパス（岡山県 岡山市）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
---------	---------