

平成 23年 4月 1日現在

研究種目：基盤研究（C）一般

研究期間：2008～2010

課題番号：20550158

研究課題名（和文）放線菌由来プロリルオリゴペプチダーゼの機能解析と応用

研究課題名（英文）Functional analysis of *Streptomyces* prolyl oligopeptidase family

研究代表者

畑中 唯史（HATANAKA TADASHI）

岡山県農林水産総合センター 生物科学研究所・酵素機能研究グループ・研究員

研究者番号：00344408

研究成果の概要（和文）：放線菌 *Streptomyces* 属ゲノム中にコードされる3種の Prolyl Oligopeptidase (POP) の酵素学的特徴を明らかにすることを目的とし、3種のPOPのうち、2種についてひとつがエキソ型アミノペプチダーゼ（AP）、もうひとつがエンド型ペプチダーゼであることを明らかにした。エンド型については、トリプシン様の基質特異性を示し、オリゴペプチダーゼBであることも明らかにした。さらに、APの活性中心であるセリンをシステインに置換することにより、野生型よりも著しくアミノリシス活性が上昇することも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The aim of present study was to reveal enzymatic properties of three types belonged to a family of prolyl oligopeptidase in *Streptomyces* genomes. The evidence presented in this study demonstrates that one is an exo-aminopeptidase, and the other is an endo-peptidase. The later shows an trypsin-like activity, and is belonged to a family of oligopeptidase B. Furthermore, by substitution of the active serine residue in the aminopeptidase with cysteine, its aminolysis activity is more enhanced than that of the wild-type enzyme.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：酵素化学、ペプチダーゼ、放線菌

1. 研究開始当初の背景

本課題で取り上げる Prolyl Oligopeptidase (POP) は、分子量約8万のタンパク質で、8枚の β シートがプロペラ状に並ぶ β -プロペラドメインと、 α/β ハイドロラーゼフォールドの2領域からなるセリンを活性中心にもつオリゴペプチド加水分解酵素であり、その基質特異性は、プロリンのカルボキシ末端側を切断するユニークな特徴をもつ(D. Rea *et al. Cell Biochem. Biophys.* 44, 349-365 (2006))。プロリンは、天然型アミノ酸20種の中でも、唯一のイミノ酸で、5員環構造を有するためプロリン含有ペプチドは、酵素消化を受けにくく難分解性とされる。また、ヨーロッパでは100から300人に一人の割合で、遺伝性の小児脂肪便症(Celiac disease)と呼ばれる病気がある。この病気は、小麦グルテン由来のプロリン含有ペプチドに対する小腸での炎症反応が原因で、衰弱・蒼白・発育停止・筋肉萎縮を伴う重篤な小児病である。バクテリア由来のPOPは、その基質特異性から、この病気の治療に有効とされ、近年POPをカプセル錠剤とした利用法の研究論文が発表されている(J. GAss *et al. Biotechnol. Bioeng.* 92(6), 674-684 (2005))。

また、POPは、プロリン含有ペプチドを分解できる能力を有することから、同様な活性をもつ *Aspergillus niger* 由来POPを用いて、タンパク質の加水分解に応用し、苦味の低減に役立てるといふ報告もある(L. Edens *et al. J. Agric. Food Chem.* 53, 7950-7957(2005))。さらに、セリン酵素特有の性質であるアミノリシス反応によるペプチド合成についても、*Flavobacterium meningosepticum* 由来POPを題材に行われている(F. Kreig *et al. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 844-852(1995))。アミノリシスは、水の代わりにアミノ酸のアミノ基がペプチド分解の際に使われ、その結果新たなペプチド結合を生成するという現象である。しかしながら、この *Flavobacterium* 由来のPOPは、安定性に乏しく、DNA shuffling により熱安定性を向上させた研究も報告さ

れている(N. Hamamatsu *et al. Protein Eng.* 18(6), 265-271(2005))。

放線菌 *Streptomyces* のゲノム情報は、2007年8月に *S. griseus* (SGR) の配列が公開となり、*S. coelicolor* (SCO), *S. avermitilis* (SAV) とともに3種のゲノム情報が利用できる。これらのゲノムには、POPファミリーに属すると思われる推定遺伝子が、3タイプ(本課題では仮にタイプA, B, Cと分類する)存在する。タイプA(ゲノムコード: SCO6488, SAV1898, SGR1153)は、既に相同性70%の遺伝子が *S. morookaensis* から取得され(M. Nishimura *et al. J. Biosci. Bioeng.* 101(1), 63-69 (2006))、ピューロマイシン不活化酵素と同定されている。本酵素は、エンド活性(すなわちオリゴペプチダーゼ活性)は有しておらず、面白いことにエキソ型のアミノペプチダーゼであることが報告された。タイプB(ゲノムコード: SCO3610, SAV4564, SGR3367)は、3菌株に相同遺伝子が存在し、タイプC(ゲノムコード: SGR1493)は、SGRのみに存在し、タイプB, Cともに推定遺伝子で機能は未確認である。3タイプはいずれもモノマーの分子質量が約7万であるが、相同性は互いに低い値を示す。

2. 研究の目的

放線菌 *Streptomyces* 属ゲノム中にコードされる3種のPOPの酵素学的特徴を明らかにし、中等度好熱性 *Streptomyces* 菌株から、それらの類縁酵素遺伝子を取得し、グルテン、コラーゲン分解への応用と、アミノリシス反応による機能性ペプチドの合成に有用な酵素の創製を最終目標とする。

3. 研究の方法

(1) 上記3タイプのPOP遺伝子をSCO, SAV, SGRからPCRにて取得し、我々が開発した接合伝達により簡便に形質転換が可能な *Streptomyces* 用の発現ベクターに挿入し、*Streptomyces lividans* に遺伝子導入し、組み換え酵素を取得する。

タイプA~Cの酵素学的特徴について、

1. ペプチダーゼであるか否か
2. エンド型 (オリゴペプチダーゼかプロテアーゼか) かエキソ型か
3. 基質特異性
4. 安定性

を明らかにする。

(2) 3タイプのうち、ペプチダーゼ活性が認められたものについて、中等度高熱性 *Streptomyces* のゲノムから縮重プライマーにより類似遺伝子を取得し、同様な方法により組み換え酵素を得、特長づけする。タイプAの類似酵素については、取得済みであり、SCO および SAV 由来酵素と比較し、熱安定性に優れていることを明らかにしている。

(3) ペプチダーゼ活性を有するものについて、市販のものあるいは我々が取得しているプロテアーゼと組み合わせ、プロリン含有率が高く、酵素消化を受けにくいとされるカゼイン・グルテン・コラーゲンを対象に酵素消化し、アミノ酸遊離率を指標に有効性を評価する。

(4) ペプチダーゼ活性を有するものについて、ジペプチド合成を対象にアミノ酸メチルエステルを基質として、アミノリシス反応を行う。この評価は、TLC あるいは LC-MS を用いて行う。

(5) (4) でペプチド合成に成功したもののについて、活性中心であるセリンを置換した変異酵素や、2種の類似遺伝子のキメラ酵素を作成し、アミノリシス反応における活性の変化を評価し、それらの結果をもとにアミノリシス活性向上型酵素を創製する。

4. 研究成果

2008年度：3種のPOPのうち、タイプAがエキソ型アミノペプチダーゼ (AP)、タイプBがエンド型ペプチダーゼであることを明らかにした。エンド型については、トリプシン様の基質特異性を示し、オリゴペプチダーゼB (OPD-B) であることも明らかにした。タイプCについては、活性型リコンビナント酵素が調整できず断念した。

2009年度：OPD-Bには、システイン残基が一つしか存在せず、チオール試薬依存性といわれるOPD-Bの研究材料として適した1次配列であることから、そのシステイン残基の役割を明らかにし

た。さらに、APの活性中心であるセリンをシステインに置換することにより野生型よりも著しくアミノリシス活性が上昇することも明らかにした。

2010年度：メロップス分類でS9ファミリーに属するエキソ型アミノペプチダーゼが放線菌 *Streptomyces* 属のみならず、同じく放線菌 *Acidothermus* 属にも存在することを明らかにした。本酵素について、放線菌 *Streptomyces* 属由来 APと同様に、活性中心であるセリンをシステインに置換することにより、野生型よりも著しくアミノリシス活性が上昇することも明らかにした。さらに放線菌 *Streptomyces* 属ゲノム中にコードされるS9ファミリーに属するとアノテーションされた酵素が、S9Bファミリーに属するX-prolyl aminopeptidase (X-PDAP) であることも明らかにし、中等度好熱性 *Streptomyces* 菌株由来X-PDAPは、分泌シグナルをもたず菌体内酵素であるにもかかわらず放線菌 *S. lividans* を宿主とした系を用いて、菌体外に大量発現に成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5件)

1. Putative “acylaminoacyl” peptidases from *Streptomyces griseus* and *S. coelicolor* display “aminopeptidase” activities with distinct substrate specificities and sensitivities to reducing reagent
H. Usuki, Y. Uesugi, M. Iwabuchi and T. Hatanaka
Biochim. Biophys. Acta - Proteins and Proteomics **1794**: 468-475 (2009)
2. Activation of oligopeptidase B from *Streptomyces griseus* by thiol-reacting reagents is independent of the single reactive cysteine residue
H. Usuki, Y. Uesugi, M. Iwabuchi and T. Hatanaka
Biochim. Biophys. Acta - Proteins and Proteomics **1794**: 1673-1683 (2009)
3. Engineered transaminopeptidase, aminolysin-*S* for catalysis of peptide bond formation to give linear and cyclic dipeptides by one-pot reaction
H. Usuki, Y. Uesugi, J. Arima, Y.

- Yamamoto, M. Iwabuchi, and
T. Hatanaka
Chem. Comm. **46**(4):580-582 (2010)
4. Extracellular production and characterization of *Streptomyces* X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase
T. Hatanaka, A. Yamasato, J. Arima, H. Usuki, Y. Yamamoto, and Y. Kumagai
Appl. Biochem. Biotechnol. In press
 5. Peptide bond formation by aminolysin-A: A simple approach for the enzymatic synthesis of diverse short oligopeptides and biologically active puromycins.
 H.Usuki, Y. Yamamoto, J. Arima, M. Iwabuchi, S. Miyoshi, and T. Hatanaka
Org. Biomol. Chem. **9**(7): 2327-2335 (2011)

[学会発表] (計 9 件)

1. *Streptomyces griseus* 由来 prolyl oligopeptidase の酵素学的諸性質の検討
 臼木博一、畑中唯史、上杉佳子、岩淵雅樹
 日本農芸化学会 2008 年度大会
2. 放線菌 *Streptomyces griseus* 由来 oligopeptidase B に唯一存在するシステイン残基の役割
 臼木博一、畑中唯史、上杉佳子、岩淵雅樹
 第 8 回蛋白質科学会年会(2008)
3. 放線菌 *Streptomyces griseus* 由来 oligopeptidase B に唯一存在するシステイン残基の役割
 臼木博一、上杉佳子、岩淵雅樹、畑中唯史
 日本農芸化学会 2009 年度大会
4. Family S9 アミノペプチダーゼのトランスアミノペプチダーゼへの機能変換と生理活性ペプチドの酵素合成
 臼木博一、上杉佳子、岩淵雅樹、畑中唯史
 第 9 回蛋白質科学会年会(2009)
5. Family S9 アミノペプチダーゼのトランスアミノペプチダーゼへの機能変換
 臼木博一、山本幸弘、岩淵雅樹、畑中唯史
 日本農芸化学会 2010 年度大会
6. 放線菌由来 X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase の菌体外発現および諸性質検討
畑中唯史、臼木博一、山本幸弘、岩淵雅樹
 日本農芸化学会 2010 年度大会
7. *Acidothermus cellulolyticus* 由来 family S9 アミノペプチダーゼのトランスアミノペプチダーゼへの機能変換
 臼木博一、山本幸弘、岩淵雅樹、畑中唯史
 第 10 回蛋白質科学会年会(2010)
8. Aminolysin の反応メカニズムの解明と環状ジペプチド類の効率的酵素合成
 臼木博一、山本幸弘、山里 明弘、熊谷 祐也、向原 隆文、畑中唯史
 日本生物工学会 2010 年度大会
9. Peptide bond formation by engineered transaminopeptidase aminolysins
 H. Usuki, Y. Yamamoto, and T. Hatanaka
 2010 環太平洋国際化学会議

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: アミノ酸転移酵素

発明者: 畑中唯史、臼木博一、山本幸弘、西本幸史

権利者: 岡山県、長瀬産業

種類: 特許

番号: 特願 2009-058505

出願年月日: 2009 年 3 月 11 日

国内優先権主張: 2010 年 3 月 4 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

http://www.pref.okayama.jp/soshiki/kakuka.html?sec_sec1=203

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畑中 唯史 (HATANAKA TADASHI)

研究者番号: 00344408

(2) 研究分担者

該当なし。

(3) 連携研究者

該当なし。