

平成 22 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20780057

研究課題名 (和文) アミノ酸ホモポリマー合成酵素の機能解析と新規ポリマーの合成

研究課題名 (英文) Functional analysis of amino-acid-homopolymer synthetase

研究代表者

濱野 吉十 (HAMANO YOSHIMITSU)

公立大学法人福井県立大学・生物資源学部・講師

研究者番号：50372834

研究成果の概要 (和文)：微生物が生産する ϵ -ポリ-L-リジン (ϵ -PL) は、高い安全性が認められている抗菌物質であり、数少ない“天然”食品保存料として国内外で利用されている。 ϵ -PL は、アミノ酸であるリジンが直鎖状につながった単純なポリマー構造であるにも関わらず、微生物体内でどのように合成されるのかについては不明のままであった。本研究では、その合成酵素の詳細な機能と遺伝子を明らかにし、これまで全く報告のない極めて新奇性の高い構造と反応機構を有するペプチド合成酵素であることを明らかにした (*Nature Chemical Biology*, **4**, 766-772, 2008)。

研究成果の概要 (英文)：epsilon-Poly-L-Lysine (ϵ -PL) produced by microorganisms is a highly safe antibacterial substance used widely as one of the world's few natural food preservatives. Although ϵ -PL has a simple polymer structure consisting of a normal chain of lysine, an amino acid, how it is synthesized inside microorganisms had not been clarified. In this study, we characterized the ϵ -PL synthetase and its gene. We also revealed that the ϵ -PL synthetase has a highly unusual domain architecture and reaction mechanism (*Nature Chemical Biology*, **4**, 766-772, 2008).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

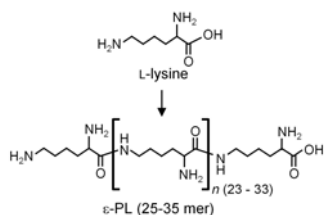
科研費の分科・細目：農芸化学

キーワード：アミノ酸ホモポリマー、ポリアミド、非リボソームペプチド合成酵素、ペプチド、放線菌

1. 研究開始当初の背景

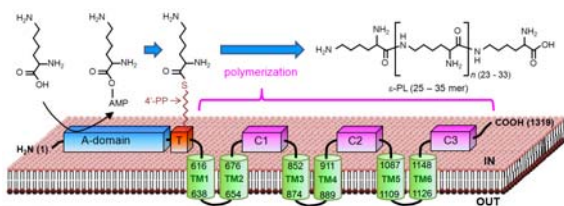
放線菌 *Streptomyces albulus* の二次代謝産物として生産される ϵ -PL は、L-リジンの ϵ -アミノ基と α -カルボキシル基がペプチド

結合でつながった 25~35 残基からなる直鎖状のアミノ酸ホモポリマーである。近年、本ポリマーの様々な生理学的・化学的機能が明らかになり、医療、産業の両面で期待されている。したがって、生合成工学による新規バイオポリマーの創製研究において、 ϵ -PL は興味深い研究素材である。しかし、 ϵ -PL は単一成分構造にも関わらず、生合成遺伝子は長年不明のままであった。



2. 研究の目的

研究開始当初、我々は、 ϵ -PL 生合成酵素 (Pls) とその遺伝子の同定に成功していた。塩基配列情報を基に、Pls のドメイン解析を行ったところ、チオテンプレート型非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) 様酵素であることが判明した。しかしながら、従来型 NRPS に存在するペプチド合成ドメイン (C-domain) と相同性を示すドメインは認められず、興味深いことに、6 ケ所の膜貫通ドメイン (TM-domain) によって分割される 3 つのドメイン (C1-, C2-, C3-domain) が存在していることを明らかにした。また、一つの酵素で複数のペプチドを合成する“繰り返し反応型”の NRPS であることを明らかにした。また、これまでに、4 mer 以上のペプチドを *in vitro* で“酵素”合成できた例は無く、“繰り返し反応型”であり、かつ、比較的小型 (約 140 kDa) である Pls は、長鎖ペプチドを“酵素”合成できる興味深い酵素と言える。そこで、本研究では、研究期間内にその基礎的な酵素機能について詳細を明らかにするとともに、本酵素の応用研究を行った。



3. 研究の方法

(1) Pls の翻訳後修飾部位の同定

従来型 NRPS の T-domain は、4'-ホスホパンテイン (4'-PP) 化され (翻訳後修飾)、活性型のホロ酵素となる。Pls の T-domain においても、その相同性から 4'-PP 化されることが強く示唆され、その部位の特定を試みた。

(2) 組換え Pls 発現系の構築

S. albulus からの Pls の精製収率は高く

ない。従って、Pls の機能解析において、活性型組換え酵素の構築は重要である。そこで、汎用されている大腸菌発現系の検討を行い、さらに、他種微生物による発現の検討、あるいは、無細胞系での組換え酵素の構築を試みた。

(3) *pls* 遺伝子へのランダム変異導入による触媒アミノ酸残基の同定および鎖長決定機構の解明

Pls は新規酵素であり、バイオインフォマティック的手法では、本酵素の機能解析、および、鎖長決定機構を推定することは不可能であり、生化学的手法に頼らざるを得なかった。そこで、*pls* 遺伝子にランダム変異を遺伝子工学的に導入した変異解析にて解析を試みた。

(4) Pls によるリジン構造アナログのホモポリマー創製

リジン構造アナログにおいてアデニル化活性が認められた化合物を数種見出している。そこで、Pls あるいはその変異酵素を用いて、これらアナログポリマーの合成を試みた。

(5) A-domain 置換型合成酵素 (キメラ酵素) の構築と任意アミノ酸のポリマー創製

これまでに各種アミノ酸をアデニル化する NRPS の A-domain および T-domain が既に報告されている。そこで、これらドメインと Pls のタンデムドメインとのキメラ酵素を作製し、新規アミノ酸のポリマー創製を試みた。

(6) 基質特異性超低下ペプチド合成酵素の構築とランダム配列および任意配列ペプチドの創製

部位特異的変異、ランダム変異導入によって、本戦略に適した変異酵素の構築を試みた。

4. 研究成果

(1) Pls の翻訳後修飾部位の同定

^{14}C ラベルされた L-リジンを利用し、また Pls の精製酵素を用いることで基質である L-リジンが 4'-PP を介して Pls に共有結合することを明らかにした。さらに、(2) で成功した組換え Pls 発現系を用いることで、553 番目のセリン残基が 4'-PP 化される部位であることを明らかにした。

(2) 組換え Pls 発現系の構築

汎用される大腸菌を用いた発現系では Pls の組換え酵素の構築に成功しなかった。そこで、本来の宿主である *S. albulus* を用

いた発現系を開発し、Pls 組換え酵素の構築に成功した（特許出願中）。

(3) pls 遺伝子へのランダム変異導入による触媒アミノ酸残基の同定および鎖長決定機構の解明

種々検討したところ、Pls は本来の宿主である *S. albulus* 以外の宿主では機能発現しないことが判明した。さらに、本菌株における形質転換頻度は極めて低く、ランダム変異導入による変異解析は不可能であった。そこで、手法を変更し部位特異的変異により Pls の変異解析を行った。本法では鎖長決定機構の解明には至らなかったが、酵素の立体構造維持に関与するアミノ酸残基を数カ所特定できた (R724/962/1199、L726/964/1201、G727/965/1202)。

これまでに、短鎖長の ϵ -PL を生産する数種の放線菌が報告されている。そこで、これら菌株から Pls ホモログ遺伝子を取得し、Pls とこれらホモログ酵素の各ドメインを変換したキメラ酵素を構築し、 ϵ -PL の鎖長に関与するドメインの同定を試みた。その結果、鎖長は TM-domain、C1-、C2-、C3-domain によって制御されていることを明らかにし、特に、TM1、TM2-domain と C1-domain が関与していることが示唆された。

また、 ϵ -PL 生産菌である *S. albulus* は ϵ -PL を分解する機能を有することから、Pls が生産する ϵ -PL の本来の鎖長については不明であった。そこで、*S. albulus* における ϵ -PL 分解酵素を同定し、25-35mer が Pls が生産する ϵ -PL の本来の鎖長である実験的証拠を得た。

(4) Pls によるリジン構造アナログのホモポリマー創製

Pls の基質特異性を検討したところ、リジン構造アナログであるアミノエチルシステインとアミノエチルセリン (AES) を基質として利用できることが判明した。また、AES についてはそのホモポリマー合成に成功した。しかし、その生産量は低く、現在、その効率的な生産と生理活性について評価している。

(5) A-domain 置換型合成酵素 (キメラ酵素) の構築と任意アミノ酸のポリマー創製

抗生物質ストレプトスリシン (ST) はその構造に β リジンのホモオリゴマーを有している。そこで、ST 生合成遺伝子クラスターより β リジンを活性化する NRPS の A-domain 遺伝子を同定した。この A-domain と Pls の A-domain を置換したキメラ酵素を構築し、 β リジンホモポリマーの創製を試みたが、目的のポリマーは得られなかった。そこで、本酵素の基質特異性についてさらに検討したところ、C1-、C2-、C3-domain の基質特異性は

極めて高く、L-リジン以外のアミノ酸は基質として認識されないことが判明した。

(6) 基質特異性超低下ペプチド合成酵素の構築とランダム配列および任意配列ペプチドの創製

前述のように、C1-、C2-、C3-domain の基質特異性は極めて高い。そこで、ランダム変異導入による基質特異性の改変を目的に、形質転換効率の高い異種放線菌を用いた組換え Pls 発現系の構築を試みた。種々放線菌を宿主として用いたところ、*Streptomyces lividans* TK23 株が利用できることが判明し、現在、本菌株を宿主として用い、Pls 遺伝子のランダム変異導入による基質特異性の改変を行っている。

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 10 件)

1. Kazuya Yamanaka, Naoko Kito, Yuuki Imokawa, Chitose Maruyama, Takashi Utagawa, and Yoshimitsu Hamano. Identification and analysis of an ϵ -poly-L-lysine-degrading enzyme reveal the mechanism of ϵ -poly-L-lysine production and accumulation. *Appl. Environ. Microbiol.* In press.
2. Yoshimitsu Hamano. Biochemistry and enzymology of ϵ -poly-L-lysine biosynthesis, *Microbiology Monographs* (Springer), In press.
3. Kazuya Yamanaka and Yoshimitsu Hamano. Biotechnological production of ϵ -poly-L-lysine for food and medical applications, *Microbiology Monographs* (Springer), In press.
4. 濱野吉士, バイオプラスチック合成技術に利用可能な微生物由来酵素, 加工技術, Vol. 45, No. 4, p27-34 (2010)
5. 濱野吉士, アミノ酸のホモポリマー化を触媒する新奇ペプチド合成酵素を発見, 科研費 NEWS, Vol. 1, No. 7, p17 (2009)
6. 濱野吉士, ϵ -ポリ-L-リジン合成酵素の反応メカニズムの解明, バイオサイエンスとインダストリー (財団法人バイオインダストリー協会), Vol. 67, No. 7, p338-341 (2009)
7. 山中一也, 丸山千登勢, 高木博史, 濱野吉士, アミノ酸ホモポリマーを合成する新たなペプチド合成酵素, 蛋白質・核酸・酵素 (共立出版), Vol. 54, No. 11, p1382-1388 (2009)

8. 濱野吉土, アミノ酸のホモポリマー化を触媒する新規ペプチド合成酵素, 酵素工学ニュース (酵素工学研究会), No. 61, p26-31 (2009)
9. 濱野吉土, 抗菌物質の合成酵素を新たに発見!, 化学 (化学同人), Vol. 64, No. 2, p72-73 (2009)
10. Kazuya Yamanaka*, Chitose Maruyama, Hiroshi Takagi, and Yoshimitsu Hamano*. ϵ -poly-L-lysine dispersity is controlled by a highly unusual non-ribosomal peptide synthetase. *Nat. Chem. Biol.*, 4, 766-772 (2008). *These authors contributed equally to this research

[学会発表] (計 29 件)

招待講演

1. ホモポリアミノ酸の生合成に関する研究: 濱野吉土, 日本農芸化学会 2010 年度大会 (奨励賞受賞講演), 2010 年 3 月, 東京都
2. アミノ酸のホモポリマー化を触媒する新規ペプチド合成酵素: 濱野吉土, 日本農芸化学会 2010 年度大会 (シンポジウム), 2010 年 3 月, 東京都
3. アミノ酸のホモポリマー化を触媒する新規ペプチド合成酵素~新規ホモポリアミノ酸合成への挑戦~: 山中一也, 丸山千登勢, 高木博史, 濱野吉土, 日本農芸化学会 2009 年度大会 (シンポジウム), 2009 年 3 月, 福岡市
4. アミノ酸ホモポリマー ϵ -Poly-L-lysine を合成する新奇非リボソームペプチド合成酵素: 山中一也, 丸山千登勢, 高木博史, 濱野吉土, 第 60 回日本生物工学会大会 (シンポジウム), 2008 年 8 月, 仙台市

一般講演

5. ϵ -Poly-L-lysine (ϵ -PL) 合成酵素の変異解析: 鬼頭奈央子, 山中一也, 喜多彰洋, 丸山千登勢, 濱野吉土, 日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010 年 3 月, 東京都
6. ϵ -PL 合成酵素 (PLs) におけるペプチド鎖長制御機構の解析: 山中一也, 鬼頭奈央子, 喜多彰洋, 丸山千登勢, 濱野吉土, 日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010 年 3 月, 東京都
7. 組換え PLs 大量発現系の確立: 喜多彰洋, 丸山千登勢, 鬼頭奈央子, 山中一也, 濱野吉土, 日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010 年 3 月, 東京都
8. Streptothricin (ST) 生合成遺伝子群の機能解析: 丸山千登勢, 豊田順也, 矢野愛佳, 濱野吉土, 日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010 年 3 月, 東京都

9. ST 生合成に關与する L-lysine 2,3-aminomutase の機能解析と β -リジン合成: 豊田順也, 丸山千登勢, 矢野愛佳, 濱野吉土, 日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010 年 3 月, 東京都
10. ポリアミド系バイオプラスチックの新ツール ϵ -Poly-L-lysine 合成酵素の変異解析: 鬼頭奈央子, 山中一也, 丸山千登勢, 濱野吉土, 第 61 回日本生物工学会大会, 2009 年 9 月, 名古屋市
11. Streptothricin 生合成遺伝子群のクローニングと機能解析: 丸山千登勢, 豊田順也, 矢野愛佳, 濱野吉土, 第 61 回日本生物工学会大会, 2009 年 9 月, 名古屋市
12. Streptothricin 生合成遺伝子群のクローニングと機能解析: 丸山千登勢, 豊田順也, 矢野愛佳, 濱野吉土, 2009 年度日本放線菌学会, 2009 年 7 月, 秋田市
13. Streptothricin 生合成遺伝子群における β -リジンホモポリマー合成酵素遺伝子の同定: 豊田順也, 丸山千登勢, 濱野吉土, 2009 年度日本放線菌学会, 2009 年 7 月, 秋田市
14. ϵ -Poly-L-lysine 分解酵素遺伝子の同定および機能解析: 山中一也, 鬼頭奈央子, 濱野吉土, 2009 年度日本放線菌学会, 2009 年 7 月, 秋田市
15. ϵ -Poly-L-lysine 合成酵素の変異解析: 鬼頭奈央子, 山中一也, 丸山千登勢, 濱野吉土, 2009 年度日本放線菌学会, 2009 年 7 月, 秋田市
16. 組換え ϵ -poly-L-lysine 合成酵素 (膜酵素) の発現系と簡易精製法の確立: 山中一也, 喜多彰洋, 鬼頭奈央子, 丸山千登勢, 濱野吉土, 2009 年度日本放線菌学会, 2009 年 7 月, 秋田市
17. 放線菌 *Saccharopolyspora erythraea* における ϵ -Poly-L-lysine 合成酵素ホモログの機能解析: 鬼頭奈央子, 山中一也, 濱野吉土, 日本農芸化学会 2009 年度大会, 2009 年 3 月, 福岡市
18. ϵ -Poly-L-lysine 生合成における分解酵素の生理機能: 山中一也, 鬼頭奈央子, 濱野吉土, 日本農芸化学会 2009 年度大会, 2009 年 3 月, 福岡市
19. Streptothricin (ST) 生合成遺伝子群のクローニングおよび機能解析: 丸山千登勢, 濱野吉土, 日本農芸化学会 2009 年度大会, 2009 年 3 月, 福岡市
20. ホモポリアミノ酸 ϵ -Poly-L-lysine を合成する新奇非リボソームペプチド合成酵素: 山中一也, 丸山千登勢, 高木博史, 濱野吉土, 第 50 回天然有機化合物討論会 (口頭発表), 2008 年 10 月, 福岡
21. Streptothricin 生合成遺伝子群のクローニングおよび機能解析: 丸山千登勢,

- 濱野吉十, 第 60 回日本生物工学会大会, 2008 年 8 月, 仙台市
22. 放線菌 *Saccharopolyspora erythraea* における epsilon-Poly-L-lysine 合成酵素ホモログの機能解析: 鬼頭奈央子, 山中一也, 濱野吉十, 第 60 回日本生物工学会大会, 2008 年 8 月, 仙台市
 23. *Streptomyces albulus* における epsilon-Poly-L-lysine 分解酵素遺伝子の同定: 山中一也, 鬼頭奈央子, 濱野吉十, 第 60 回日本生物工学会大会, 2008 年 8 月, 仙台市
 24. 抗菌性ホモポリアミノ酸 ϵ -Poly-L-lysine 生合成酵素の精製, クローニング及び機能解析: 山中一也, 丸山千登勢, 高木博史, 濱野吉十, 2008 年度日本放線菌学会, 2008 年 7 月, 山梨市
 25. 放線菌 *Saccharopolyspora erythraea* における ϵ -Poly-L-lysine 合成酵素ホモログの機能解析: 鬼頭奈央子, 山中一也, 濱野吉十, 2008 年度日本放線菌学会, 2008 年 7 月, 山梨市
 26. Streptothricin(ST) 生合成遺伝子群のクローニングおよび機能解析: 丸山千登勢, 濱野吉十, 2008 年度日本放線菌学会, 2008 年 7 月, 山梨市

国際学会

27. ϵ -poly-L-lysine dispersity is controlled by a highly unusual non-ribosomal peptide synthetase: Kazuya Yamanaka, Naoko Kito, Chitose Maruyama, Hiroshi Takagi, Yoshimitsu Hamano, 15th International Symposium on the Biology of Actinomycetes (ISBA), Shanghai (CHINA), August 2009
28. Biosynthesis of streptothricin: Chitose Maruyama, Junya Toyoda, Aika Yano, Yshimitsu Hamano, 15th International Symposium on the Biology of Actinomycetes (ISBA), Shanghai (CHINA), August 2009
29. A highly unusual non-ribosomal peptide synthase producing an amino-acid homopolymer: Kazuya Yamanaka, Chitose Maruyama, Hiroshi Takagi, Yoshimitsu Hamano, 7th US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products, Enzymology, Structural Biology, Drug Discovery, La Jolla, California, June 2008.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 遺伝子組換え *Streptomyces* 属放線菌による有用物質生産法

発明者: 山中一也、濱野吉十
権利者: チッソ株式会社、福井県立大学
種類: 国内特許
番号: 特許出願 2010-046781
出願年月日: 2010 年 3 月 3 日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.s.fpu.ac.jp/hamano/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱野吉十 (HAMANO YOSHIMITSU)

福井県立大学・生物資源学部・講師

研究者番号: 50372834