

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：32629

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 年～2011 年

課題番号：22710231

研究課題名（和文） プロリルアミノペプチダーゼが触媒する  
ジペプチド合成反応機構の解明研究課題名（英文） Mechanism of dipeptide synthesis  
mediated by prolyl aminopeptidase

研究代表者

山本 幸弘 (YAMAMOTO YUKIHIRO)

成蹊大学・理工学部・助教

研究者番号：00549727

研究成果の概要（和文）：プロテアーゼは逆反応としてペプチド合成活性を有することが知られているが、活性中心にセリン残基を有するセリンプロテアーゼにおいて、セリンをシステインに置換した変異酵素は、合成活性が高まることも知られている。本研究では、プロリルアミノペプチダーゼの Ser/Cys 変異型酵素においても同様の結果が得られることを見出し、さらに近年ロコモティブシンドローム予防の観点から注目されているジペプチドであるプロリルヒドロキシプロリンの酵素的合成方法を確立した。

研究成果の概要（英文）：Protease hydrolyze protein and release corresponding peptides. It is known that protease also exert synthetic reaction of peptide. Especially, Ser/Cys substituted protease shows increased synthetic activity. In this study, we revealed that Ser/Cys modified prolyl aminopeptidase also exert increased synthetic activity of proline containing dipeptides. Furthermore we established the enzymatic synthetic method of prolyl hydroxylproline which has attracted attention to prevent locomotive syndrome.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2011 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：プロリルアミノペプチダーゼ・プロリン・ジペプチド・ジケトピペラジン・プロリルヒドロキシプロリン・アミノリシス・放線菌・合成

## 1. 研究開始当初の背景

ジペプチドの酵素的合成法としては、対象とする酵素によって大きく 3 つに大別出来る。すなわち、①金属プロテアーゼによる脱水縮合反応、②アミノ酸リガーゼによる ATP を介したジペプチド産生反応、③セリン型プロテアーゼの Ser/Cys 変異酵素によるアミノリシス反応である。

金属プロテアーゼに属するサーモライシンによる研究は古くから知られており、人口甘(苦)味料の製造に用いられている。しかし、この場合基質として、N 末端が保護されたアミノ酸を用いる必要があり、ペプチドを得るために脱保護工程を要する。一方、アミノ酸リガーゼとして、D-Ala-D-Ala リガーゼや、最近になって枯草菌由来 L-アミノ酸・-リ

ガーゼが報告されているが、高価な基質である ATP を要求する反応であるために、連続的なジペプチド合成には ATP の再生系を必要とし、実用性を考えると経済性に難点をもつ。上記のような問題点を解決する方策として、セリン型プロテアーゼの活性中心である Ser を Cys に変異導入した、Ser/Cys 改変酵素の利用が考えられる。Ser/Cys 改変酵素については、本来加水分解反応を触媒するプロテアーゼが、活性中心である Ser を Cys へ改変することで、アミノリシスが亢進することが見出されて以降、エンド型プロテアーゼを対象として良く研究されてきた。アミノリシスは水系での反応が可能となるが、エンド型酵素はその反応特性から、基質(アシルドナー)の N 末端を保護しなければならないという、金属プロテアーゼと同様の問題点が残されていた。そこで本研究では、エンド型プロテアーゼを用いた研究で得られた知見を、N 末端のプロリンを認識して触媒することが出来る、エキソ型プロテアーゼに応用しようと考えた。この方法によれば、遊離のアミノ酸、またはそのエステルを基質として利用出来るため、目的のジペプチドの精製が簡便であり、さらに反応に高価な ATP を必要としない。すでに研究代表者は、好熱性放線菌 (*Streptomyces thermoluteus* subsp. *fuscus* strain NBRC14270) から、PAP を取得し (Accession No. AB519645)、タンパク質工学的的手法により Ser/Cys 改変型 PAP を得ている。これまでに、Ser/Cys 改変型 PAP が様々なアミノ酸エステルを認識して Pro-Xaa を生産し得る事、Cyclo[ProPro]などの環化体をも生成すること、アクセプターは LogP 値が 0 以上の疎水度の高いものが優れていることを予備的ではあるが見出した。そのなかで、Ser/Cys 改変型 PAP では hydroxyproline-benzyl ester (Hyp-OBzl; Log P = 0.63) のみ例外的にアクセプターとして認識されないことが明らかとなった。このように、PAP のアミノリシスにおける諸性質を一部明らかにしたが、触媒メカニズムには未だ不明な点が多く、Pro-Xaa 生産法を確立する為には、更なる詳細な検討が必要である。以上の点で本研究を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

プロリンを含むペプチドは、優れた生理活性が見出されているものがあるにもかかわらず、酵素触媒による生産法が確立されていない。標準アミノ酸のなかで唯一イミノ基をもつ特徴的構造が、従来の酵素的ペプチド合成法の適用を困難なものにしている。本研究では新規プロリルアミノペプチダーゼ (PAP) を放線菌より取得し、さらに酵素工学的的手法によりペプチド合成活性を高めた改変型 PAP を作成する。得られた酵素を用い、特にプロ

リン含有ジペプチド (Pro-Xaa) に焦点を絞り、それらの簡易生産法の確立ならびに、触媒メカニズムの解明を図ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、先に述べたように、PAP が触媒するアミノリシスに関して、環化及び合成反応特性について検討した。Ser/Cys 変異体の作成は、市販のキットを用い、クイックチェンジ法により作成した。

合成反応は、Pro-OBzl を基質として、基質濃度や pH といった条件を検討することで、環化反応や鎖長延長が起きる条件について検討した。得られた情報を基に Pro-Xaa の合成反応の検討を行い、詳細な反応条件の検討のほか、生成物の構造決定ならびに合成率の算出、単離方法を確立した。なお、構造決定は、LC-MS/MS 並びに NMR 分析にて行った。

## 4. 研究成果

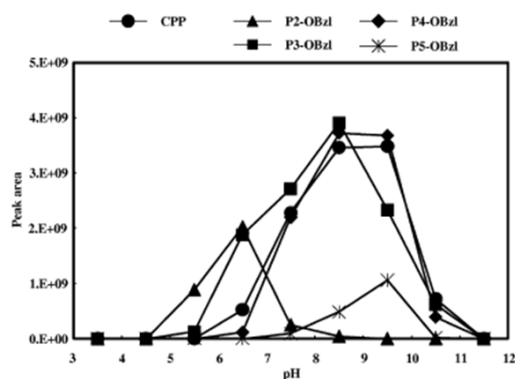
(1) Ser/Cys 改変型プロリルアミノペプチダーゼを用いたプロリン含有ペプチドの合成

中等度高熱性放線菌 (*Streptomyces thermoluteus* subsp. *fuscus*) より、新規に得られた PAP 遺伝子をクローニングし、さらにクイックチェンジ法により Ser/Cys-pap 遺伝子を得た。得られた遺伝子を大腸菌 Rosseta Gami に形質導入し、Over night expression 培地にて酵素を産生させた。この酵素は His-tag が付加されるように設計したため、コバルトアフィニティー樹脂によりほぼ単一に精製できた。

酵素 8.7 mg、プロリンベンジルエステル (Pro-OBzl) 5 mM を含む緩衝液中での反応を基本として合成反応に及ぼす pH の影響やアシルアクセプターの種類の影響を調べた。

その結果、反応 pH が酸性側ではジペプチドが主に生成され、アルカリ側では鎖長延長反応ならびに、環化反応が亢進することが示された (Fig. 1)。

Fig. 1. ペプチド合成反応における pH の影響



また、Cyclo[ProPro]に焦点をあて、基質と

してPro-OBzl、-OMe、-NH<sub>2</sub>を用い、野生型、Ser/Cys型の両酵素を用い、反応特性を調べた。その結果、野生型ではCyclo[ProPro]の合成率はpHの上昇と共に増加することがわかり、さらに基質としてPro-OBzlを用いた時、pH 9以上のアルカリ域下、合成率40%を得ることができた。一方、Ser/Cys改変型では至適pHは中性域にあり、合成率は野生型と同様40%を得た。また、どちらの酵素でも基質に対する親和性は同じであった(-OBzl>-OMe>-NH<sub>2</sub>)。これらの結果より、Cyclo[ProPro]は基質が触媒ポケットにトラップされたのちpHに依存せず、安定な構造を形成すべく化学的に生成されることが示唆された。

さらに、アクセプターの種類と、アミノリシスとの関係性を調べるため、アシルドナーとして、Pro-OBzl、アシルアクセプターとして種々のアミノ酸、アミノ酸エステル誘導体を用い、アミノリシス反応を試みたところ、アクセプターのもつLog Dが0より大きい疎水性アミノ酸・アミノ酸誘導体でペプチド合成反応が行われることを見出した(Fig. 2.)。

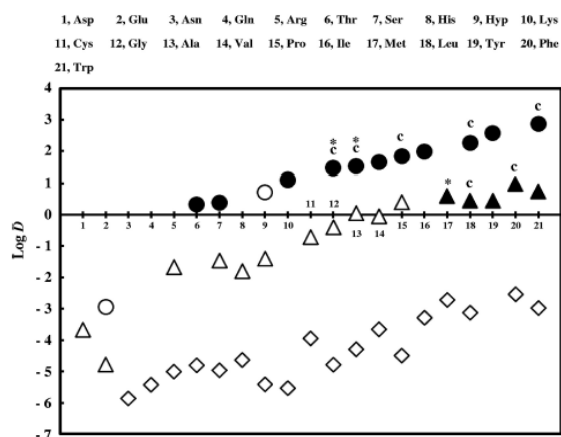


Fig. 2. アミノリシス反応における、基質特異性とアクセプターの Log D 値との関係

このなかで、ヒドロキシプロリンベンジルエステル(Hyp-OBzl)が Log D 値が1付近を示すにも関わらず、唯一例外的にアクセプターとして認識されないことが判った。ヒドロキシプロリン分子上のヒドロキシル基が立体障害となり、本条件(5 mM)ではペプチドが形成されないと推察した。

## (2) 野生型 PAP による Pro-Hyp 合成

先の研究では一定の条件ではPro-Hypが合成できないことが判明したため、反応条件を詳しく検討し、さらに野生型放線菌(*Streptomyces aureofaciens* TH-3)を用い、Pro-Hyp合成を試みた。

まず、これまでの検討では、アシルドナー(Pro-OBzl)、アシルアクセプター濃度がともに5 mMであったため、ドナーの濃度を50 mM

とし、アクセプターの濃度を1 Mまで上げ、さらに反応温度を4°Cに設定し、反応を行った。その結果、Pro-Hypが合成されることが判り(Fig. 3.)、さらに反応pHがアルカリ側で更新されることが判明した(Fig. 4.)。さらに緩衝液の濃度や、アシルドナーの種類、ドナー・アクセプター比、酵素添加量、反応時間等、詳細に検討したところ、30%のPro-Hyp合成率を得ることが出来た。

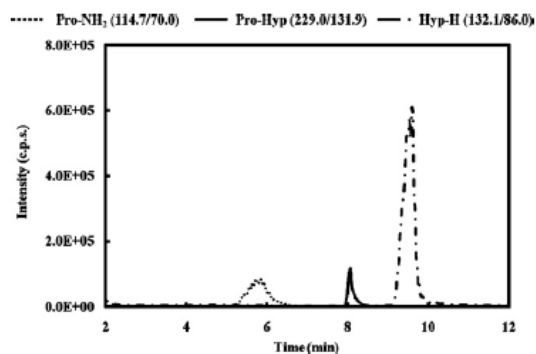


Fig. 3. 反応生成物の LC-MS/MS クロマトグラム。反応条件：PAP 10 · g, 5 mM Pro-NH<sub>2</sub>, 1 M Hyp-H, pH 11.0, 3 h, 4°C

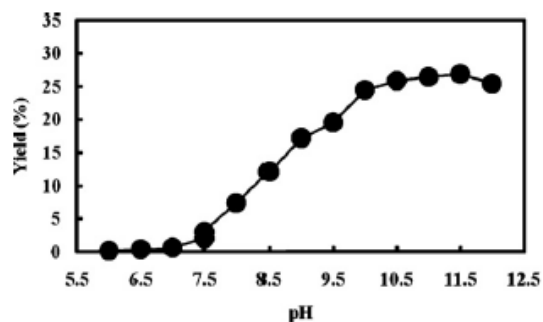


Fig. 4. Pro-Hyp 合成における pH の影響

野生型 PAP を用いた Pro-Hyp 合成反応は、加水分解反応との拮抗反応であるため、加水分解反応をいかにして抑制するかが、合成率向上のポイントとなる。そのためアルカリ領域側かつ低温で合成反応が亢進したのは、加水分解反応における至適 pH・温度からずらし、加水分解活性が下がった条件であったからと推察される。このような条件では、エステル結合は加水分解されやすいため、ドナーとしては Pro-OBzl、-OMe のようなエステルよりも、プロリンアミド(Pro-NH<sub>2</sub>)が適していたと考えた。

以上、これまでエンド型プロテアーゼの Ser/Cys 改変酵素の研究で得られた知見を、エキソ型プロリルアミノペプチダーゼに適用することで、数多くのプロリン含有ペプチドを合成することに成功した。このなかで、

これまで酵素的合成例のない Cyclo[ProPro]が生成されることも明らかにした。Cyclo[ProPro]はまだその機能が明らかにされていないジケトピペラジン類の一つであり、機能性評価が課題である。さらに、詳細に反応条件を検討、工夫することで、Pro-Hyp を 30%の合成率で得ることに成功した。Pro-Hyp は近年、コラーゲン産生を刺激するジペプチドとして注目され、これから社会的問題として位置づけられると考えられるロコモティブシンドロームを予防するうえで重要な素材である。有機溶媒を使わず、野生型酵素により合成できる利点は大きく、さらなる合成系簡便化が期待される。

#### 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 2 件)

① Yukihiro Yamamoto, Hirokazu Usuki, Yuya Kumagai, Takafumi Mukaiharu, Akihiro Yamasato, and Tadashi Hatanaka. Synthesis of prolyl-hydroxyproline using prolyl aminopeptidase from *Streptomyces aureofaciens* TH-3. *Process Biochem.*, **46**, 1560-1564 (2011)  
DOI: 10.1016/j.procbio.2011.04.009

② Yukihiro Yamamoto, Hirokazu Usuki, Masaki Iwabuchi, and Tadashi Hatanaka. Prolyl aminopeptidase from *Streptomyces thermoluteus* subsp. *fuscus* strain NBRC14270 and synthesis of proline-containing peptides by its S144C variant. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 6180-6185 (2010)  
DOI: 10.1128/AEM.01242-10

以上、2 報とも査読あり。

[学会発表] (計 1 件)

① Yukihiro Yamamoto, Hirokazu Usuki, Masaki Iwabuchi, Tadashi Hatanaka. "Proline containing peptide synthesis by using wild type and engineered prolyl amino peptidases"  
2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies  
2010/12/15-2010/12/20 Hawaii USA.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山本 幸弘 (YAMAMOTO YUKIHIRO)  
成蹊大学・理工学部・助教  
研究者番号：00549727