

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：37401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660067

研究課題名(和文) D体アミノ酸のみで合成したペプチド基質を分解する新規プロテアーゼ生産菌の探索

研究課題名(英文) Screening of microorganisms producing a novel proteinase, hydrolysing D-peptide substrate

研究代表者

新 隆志 (SHIN, Takashi)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：50179066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Dペプチド基質を分解するプロテアーゼ生産菌の取得を目的に自然界から微生物探索を実施した。新たな発想でモデルビルディングした短鎖ペプチド基質ならびに長鎖ペプチド基質(酸化インシュリンB鎖(30残基))を液相法、固相法で合成した。自然界から微生物探索を行った。その結果、C-末端にD-アスパラギン酸を含有する基質を分解する放線菌の分離ができた。分離菌株のD-アスパラギン酸特異的プロテアーゼについて、検討を進め粗酵素の性質を明らかにし所期の目的にかなう酵素であると明らかにした。しかしながら、長鎖ペプチド基質である酸化インシュリンB鎖(30残基)の分解は極めて低いものであった。

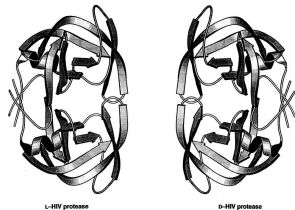
研究成果の概要(英文)：Screening for a novel proteinase of microbial origin, D-peptide specific enzyme, was carried out. For simple procedure of detection of proteinase, short chain and/or long chain (30 amino residues) peptides, comprising with D-amino acid, were newly synthesized by solid-phase method or convenient procedures. Employing these substrates enable the isolation of D-aspartic acid specific enzyme in the culture filtrate of a newly isolated actinomyces strain. Preliminary investigation of crude enzyme preparation, may prove the desirable enzyme characteristics. Another procedure for isolation of microorganism, assimilating D-amino acid for growth, was carried out, to establish a specific microorganism culture collection.

研究分野：応用微生物学

キーワード：D-ペプチド プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

プロテアーゼ研究の歴史を振り返ってみると、微生物起源のプロテアーゼは産業上有用であるばかりか、基礎研究材料として多くのタイプのもので動植物由来プロテアーゼと同様に発見されている。さて、プロテアーゼ研究のみならず生化学分野において衝撃的とも言える報告が1992年になされた。スクリプス研究所 Stephen Kent は既知酵素タンパクでは最小の分子量(99残基)のヒトエイズウイルス(HIV-1)酸性プロテアーゼをD体アミノ酸のみで化学合成することに成功した(Science, 256, 1445(1992))。この化学合成された酵素(以下D酵素と仮称)はCDスペクトルでは反対の旋光性を示すのみならず、L体アミノ酸よりなるペプチド基質にはまったく作用せず、D体アミノ酸のみで化学合成された基質を切断した。すなわち、D酵素



は上の図に示すように、天然の酵素(図の左)と鏡像関係にあるとの報告である。当時、申請者らはHIV-1酸性プロテアーゼの阻害剤や新規プロテアーゼを微生物に求めて探索していたが、この報告からD体アミノ酸で合成したペプチド基質を用いれば、これまでまったく存在が知られていないD酵素を見つけられるかもしれないと漠然と考えていた。

これまでに、D体アミノ酸を含有する基質に作用する酵素は知られているが、これら既知酵素はN末端あるいはC末端位にD体アミノ酸を持つ基質に作用するタイプの酵素である。本研究課題で取り上げた、D体アミノ酸のみで構成されたペプチド基質に作用する酵素は全く知られていなかった。

2. 研究の目的

本申請課題の最終目標は、前項で申し述べた通り、D体世界が微生物に存在するかを探るものである。その具体的探索方法は、長年、申請者らが取り組んできたプロテアーゼ研究を土台としたもので、以下に詳細を述べるが、スクリーニング基質のデザインと合成すなわち長鎖ペプチドの合成、

短鎖発色性基質の合成、微生物スクリーニングに申請者らが考案した「網羅的培養条件を備えた多次元培養法」の採用、そして、Dアミノ酸の微生物分布調査などを計画している。すなわち、スクリプス研究所 Stephen Kent らの HIV-1 プロテアーゼの化学合成の成果、坂口謹一郎氏の「こ

れまでの生物学はL体(アミノ酸)の世界だが、D体の世界があってもよいのではないか、それを探せ」の壮大なコンセプトを出発点として、新たに進める本研究課題は申請者らのプロテアーゼ研究の実績と確かなペプチド合成技術から計画したものである。

3. 研究の方法

短鎖発色性ペプチド基質の合成: 微生物起源のプロテアーゼはセリン、メタル、カルボキシルのものが知られている。本申請課題では標的としてセリンタイプのものを選択した。その理由は検出が容易な発色性のペプチド基質が多く開発されているからである。すなわち、右図に示す基質デザイン図で P_1 の位置に、 $P_4-P_3-P_2-P_1-NPhNO_2$ の一般式を持つ4種のスクリーニング基質 ($P_1=D-Phe, D-Leu, D-Ala, D-Arg; P_2, P_3, P_4= D-Ala$) を多量(10グラム規模)に液相法合成する。

長鎖ペプチドの合成: これまでのプロテアーゼ研究で使用されているペプチド基質に酸化インスリンB鎖(InsBox)がある。プロリン以外のアミノ酸をすべて含む30残基からなるオリゴペプチドであり、各種のプロテアーゼの定量的ならびに定性的切断様式が明確にされている。検出に迅速性が要求される一次スクリーニングに、InsBoxは不向きな基質であるが、あらゆるプロテアーゼの加水分解を受ける汎用基質として、すべてD体アミノ酸からなるInsBoxを固相法合成する。申請者らは全自動ペプチド合成機(9050型、旧Miligen Biosearch社)を2台保有し、L体ペプチドの化学合成経験を豊富に蓄積している。本機で0.2ミリモル規模の基質を合成する、すなわち一度の合成運転でInsBoxを理論収量で0.7グラム得ることができる。

微生物スクリーニングに申請者らが考案した「網羅的培養条件を備えた多次元培養法」の採用: 申請者らはまったく知られていないプロテアーゼ生産菌の分離実績がある。また、最近、申請者らが考案した「網羅的培養条件を備えた多次元培養法」(萌芽研究・採択課題番号1765804、特許公開2010-161979、特許第5066537号)、「温度勾配・酸素濃度勾配培養法」(挑戦的萌芽研究・採択課題番号21658036、特許公開2010-161978、審査中)など新しい観点から微生物スクリーニング系の理論的構築を進めてきた。申請者らの研究機関では、寄附講座を中心にして設立した「応用微生物研究所」をキャンパス外に設立運営している。バイオリソース立国を目指す国家的プロジェクトNBRPには未加入であるが、放線菌を中心に微生物バンクの構築を進め、現在1万余株の微生物コレクション(未特定菌株)を、保存菌株と同時にその培養上清も収集保存している。これらの実績を生

かし、新たな戦術から自然界より D 体ペプチド基質分解微生物の探索を進めるとともに、当該研究所所蔵の培養上清をサンプルに検索を行う。

D-アミノ酸の微生物分布調査：微生物細胞壁には D-Ala や D-Glu が恒常的に含有されていることは古くから知られている。最近、黒酢やアサリなどの食品に D-Asn が含まれていることが明らかにされるとともに、D 型セリンと筋萎縮性側索硬化症の関連などが知られるようになり、身近な生物の世界に D 体アミノ酸の世界が見え隠れするようになった。本申請課題では、微生物菌体をサンプルとして LD-判定の試みを計画している。放線菌分類では全菌体をサンプルとしてジアミノピメリン酸の光学対掌性を TLC で調べるが、同じように全菌体加水分解物でアミノ酸の DL 判定を試みる。アミノ酸のアミノ基をペンタフルオロプロピル化、カルボキシル基をイソプロピルエステル化後、DL 判定はキャピラリー GLC で容易におおよそ 40 分で分析でき、申請者らは合成ペプチドの光学純度判定をルーチンに分析している。

4. 研究成果

短鎖発色性ペプチド基質の合成：液相法にて 4 残基の D ペプチド発色性基質合成を実施した結果、満足できる合成収率で標的化合物を得た。

長鎖ペプチドの合成：固相法にて 30 残基よりなる D ペプチドの合成を実施した結果、0.2 ミリモルスケールで標的ペプチドを合成収率約 30% で得ることができた。合成短鎖および長鎖ペプチドは各種機器分析で構造確認した。

微生物スクリーニングに申請者らが考案した「網羅的培養条件を備えた多次元培養法」の採用：新規プロテアーゼ生産菌のスクリーニング：新たな発想でモデルビルディングした上記の基質を使用、申請者らが確立した「網羅的培養条件を備えた多次元培養法」で自然界から微生物探索を行った。その結果、C-末端に D-アスパラギン酸を含有する基質を分解する放線菌の分離ができたが、その他の構造のペプチドを分解する酵素生産菌を得る事はできなかった。分離した D-アスパラギン酸特異的プロテアーゼについて、検討を進め粗酵素の性質を明らかにし所期の目的にかなう酵素であると明らかにした。しかしながら、長鎖ペプチド基質である酸化インシュリン B 鎖 (30 残基) の分解は極めて低いものであり、今後、酵素の精製が完了した後の検討課題となった。

また「網羅的培養条件を備えた多次元培養法」で、同一培養プレート上で D-アミノ酸と L-アミノ酸を対向して濃度勾配を作成し微生物分離を実施したところ、それぞれに配向した微生物を分離した。これら微

生物の特性を今後明らかにしたい。

D-アミノ酸の微生物分布調査：D-アミノ酸を蓄積している微生物の分離に至らなかった。今回採用した GLC 法でなく、迅速な DL 同定法の導入が必要である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新 隆志 (SHIN, Takashi)
崇城大学・生物生命学部・教授
研究者番号：50179066

(2) 研究分担者

浴野 圭輔 (EKINO, Keisuke)
崇城大学・生物生命学部・准教授
研究者番号：30310030

野村 善幸 (NOMURA, Yoshiyuki)
崇城大学・生物生命学部・教授
研究者番号：40133566

土橋 和之 (DOBASHI, Kazuyuki)
崇城大学・工学部・教授
研究者番号：90587833

(3)連携研究者 ()

研究者番号：