

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450124

研究課題名(和文) 新奇物質探索ツール構築に向けたセリンペプチダーゼの構造生物学的解析

研究課題名(英文) Structural analysis of serine peptidase for construction of screening tool for novel biologically active substances

研究代表者

有馬 二郎 (Arima, Jiro)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：80393411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：D-体特異的アミノ酸アミド加水分解酵素(DAH)は“アミノリシス”を触媒するセリンペプチダーゼであり、新奇機能物質の探索ツールへの応用が可能である。DAHのX線結晶構造解析を行った結果、1.6 Åの解像度で結晶構造が決定され、活性中心を擁する大きなくぼみと、活性中心に小さなポケットが存在していた。ポケットを構成する残基をAla置換し、アミノリシスへの影響を調べた結果、Ile336をAlaに置換することで、アミノリシスにおけるアシル受容体特異性の幅が広がり、アミノリシス活性の増強に効果的であることが明らかとなり、ポケットの形状の変化がアミノリシス活性を向上させている要因であることが予測された。

研究成果の概要(英文)：Serine peptidases that exhibit the catalytic ability of “aminolysis” are capable of utilizing biocatalyst for peptide synthesis. Therefore, such enzymes are considered to be useful as screening tool for novel biologically active substances. To clarify the mechanism of aminolysis function of D-stereospecific amino acid amide hydrolase (DAH) that exhibits high aminolysis function, the crystal structure of the enzyme was determined at a resolution of 1.6 angstrom. DAH possesses a large cavity that leads to the catalytic center, and there is a small pocket close to the catalytic center. By substitution of the residues that constitute the catalytic pocket, we found that the structural modification of Ile338 enhanced the aminolytic ability and were broaden the acyl acceptor specificity. The modification of pocket shape by the mutation is considered to be related to the increase in aminolysis activity of DAH

研究分野：農芸化学

キーワード：アミノリシス D体特異的アミノ酸アミド加水分解酵素 結晶構造解析 基質結合部位 アシル受容体 ペプチド結合形成反応

1. 研究開始当初の背景

(1) 酵素の本来の機能と特異な機能 酵素は生体内では、生命を維持するための化学反応を触媒する生体高分子の精密機械である。しかし生体内の反応条件から外れた場合、その機能の限界を超える特異な触媒能を発揮することがある。我々はそのような現象を、次の2つの視点「なぜそのような現象が起こるのか?」「その機能を利用できないか?」を基に、いくつかの酵素を対象に研究を進めてきた。中でもペプチダーゼからは、本来の機能からはずれた触媒能の報告が多く、我々は、この機能には強く視点を注ぎ、現在も研究を進めているところである。

(2) ペプチダーゼが示す特異な機能“アミノリシス” ペプチダーゼはタンパク質やペプチド系化合物の加水分解を触媒する酵素の総称であり、生体内での本来の機能は加水分解である。しかし、活性中心に Ser を有する“セリンペプチダーゼ”は、基質濃度や pH によっては、加水分解と拮抗して“アミノリシス”を触媒する。これは、加水分解の水に代わり、アミンが求核することでアミド結合が形成される比較的単純な反応である(図1)。アミノリシスは水溶液中でも進む反応であり、調節が容易であることに加え、本来の機能である加水分解とは比較にならないほどの生成物の多様性をもたらす。特に短いペプチド類やアミノ酸誘導体の合成が可能であるため、その多様性の拡大と効率の向上は、ものづくりへの応用や、新奇物質/新奇機能の探索研究における可能性を広げることにも繋がり、将来的には創薬や食品への応用も可能であると考えられる。

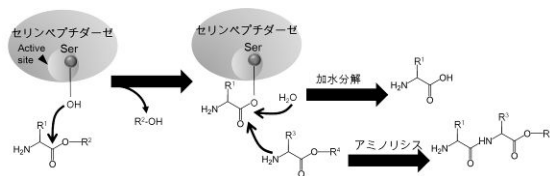


図1. Ser ペプチダーゼのアミノリシスと加水分解の反応過程

2. 研究の目的

(1) DAH が触媒するペプチド結合形成反応 我々はこれまでに、D-アミノ酸誘導体を認識し、アミノリシスによるペプチド結合形成反応を触媒する酵素、D-アミノ酸特異的アミド加水分解酵素(DAH)を放線菌から見出し、その反応特性の解析と利用に向けた研究を行ってきた。本酵素は MEROPS peptidase Data-base 上 family S12 に分類され、活性中心に Ser を持ち、そのそばには Ser の水酸基を活性化させる残基として Lys と Tyr を持ち合わせる少し特徴的な酵素である。また、本酵素のアミノリシス反応は非常に特徴的であり、アシル受容体(水の代わりに求

核攻撃する基質)を 10 mM 仕込むと、水濃度(約 55 M)の 1/5,500 の濃度のアミノ基を認識し、アミノリシスを触媒する。更には、アシル受容体基質であるジアミノアルカンを結晶化の際に添加すると、正四面体やロッド状の結晶が得られた(図2)。これは、本酵素がジアミノアルカンを積極的に認識して結合し、構造の揺らぎを解消したことを示唆するものである。

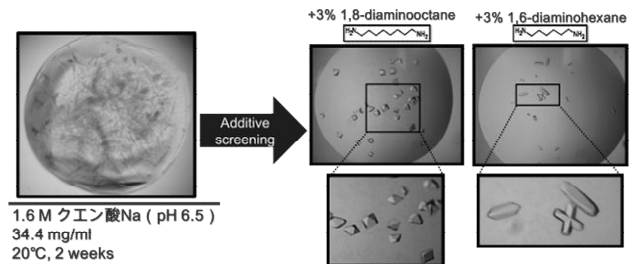


図2. DAH の結晶化

(2) DAH の立体構造解析を通じた生体触媒のデザイン 本研究では、アミノリシス触媒における酵素-基質相互作用/反応機構解明に向け、この結晶を基にした立体構造解析や、変異スクランニングを通じた構造生物学的視点からの解析を行うと共に、様々なペプチドの合成を可能とする、効率の良い「ものづくり・もの探し」ツールとしての生体触媒のデザインを行った。

3. 研究の方法

(1) DAH 立体構造解析 DAH の結晶化は、クリスタルスクリーンキットを使用し、塩濃度、緩衝液、pH、温度、添加剤等の条件を探索した。得られた結晶は、Spring-8 の X 線照射装置に供し、その結果として取得された回折データと既知の類似酵素の構造を基に、分子置換法によって DAH の全体構造を決定した。

(2) Ala スクランニングによるアミノリシス活性に関わる残基の同定 DAH の立体構造情報を基に、活性部位として機能する位置とその近辺に存在する基質結合部位を予測した。そして、それらに関わる残基を抽出した上で、触媒機能に直接かわらないと考えられる残基をその中から選抜き、それらを Ala に置換した1残基変異酵素を構築した。大腸菌の発現系を使用して生産したそれぞれの変異酵素を精製した後に、それぞれについてアミノ酸-pNA のみを基質として使用したときの pNA 遊離活性(アシル 酵素中間体形成反応)、アミノ酸エステル(アシル供与体)とジアミノアルカン(アシル受容体)を基質として使用したときのアルコール遊離活性(アシル酵素中間体形成反応)、C-free のアミノ酸遊離活性(加水分解反応) そし

てアミノ酸とジアミノアルカンの縮合重合体の合成活性(アミノリシス反応)を測定し、アミノ酸置換による活性への変化を検証・比較した。

(3) 構造置換による特異性改変酵素の構築
 更なる基質特異性の変化やアミノリシス触媒能の向上を期待して、方法の項目で顕著に変化が見られた残基について、Ala以外の残基に置換した1残基変異酵素や変異を組み合わせた2残基変異酵素を構築し、それらの精製酵素について、酵素化学的視点からの性質検討(比活性、pHに対する活性への影響、pHや温度に対する安定性等)を行い、基礎的なデータを取得したと共に、アシル供与体・受容体基質に対する選択性を調べ、構造変化がどのように活性に影響するのかについての基礎データを取得した。また、このデータを基にして、基質選択性の幅が広がった酵素については、いくつかの基質セットを選択し、これまでに不可能であったペプチド合成への応用が可能かどうかについて、検証した。

(4) 「もの探しツール」としての利用：酵素反応で構築される機能物質の探索
 多様な酵素反応生成物をもとにして、新たな機能物質探索研究が可能かどうかについて、評価を行った。具体的には基質の組合せが異なる酵素反応液を2000種類作成し、これをライブラリーとして、使用した。続いて予備的検討の対象として、培養細胞による抗体医薬生産を選抜し、培養細胞(CHO細胞株)の培地に0.5%となるよう酵素反応液を添加して、CHO細胞の生育と抗体生産への影響をWST法及びELISA法により検定した。

4. 研究成果

(1) DAH立体構造 DAHの結晶化条件を探索したところ、1.6Mクエン酸Na(pH6.5)の条件下で3%となるよう1,8-ジアミノオクタン(1,8-DAO)を添加し、20℃で2週間インキュベートすることで、ピラミッド状の結晶が得られた。この結晶を基に、X線結晶構造解析を行ったところ、解像度1.6ÅでDAHの全体構造が決定された(図3A)。

DAHの立体構造からは、大きくくぼみ(Cavity)の底に、活性中心Serが存在し、その活性中心Ser付近にポケット状の空間が観察された(図3B)。また、活性中心Serから少し離れた位置に、結晶化時に添加剤として使用した1,8-DAOと思われる電子密度が見られた。1,8-DAOはDAHのアシル受容体基質として利用されることから、DAHは積極的に1,8-DAOを認識して活性部位付近に取り込み、得られた構造はその認識の一部を反映しているものであることが考えられた。

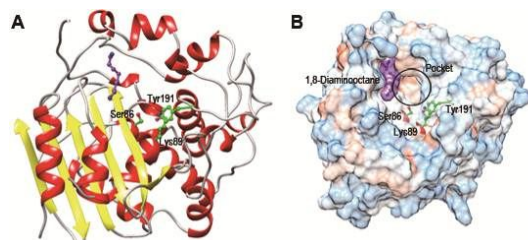


図3.DAHの全体構造 A:リボンモデル、B:空間充填モデル。

(2) アミノリシスに重要な残基の同定
 基質ポケットを構成する17残基(図4)と、1,8-DAOとの相互作用に関わっていると考えられる残基を選別し、それぞれのうち、Gly及びAla残基以外をAlaに置換し、アミノリシス活性への影響を調べた。その結果、Ile266及びIle338をAlaに置換すると野生型DAHと比較してアミノリシスにおけるアシル受容体特異性の幅が広がり、I338Aにおいて、より大きな分子や疎水性が高い分子をアシル受容体として認識できるようになった。特にIle338でのAla置換による影響は大きく、野生型の3倍以上の生成物増加が確認された。

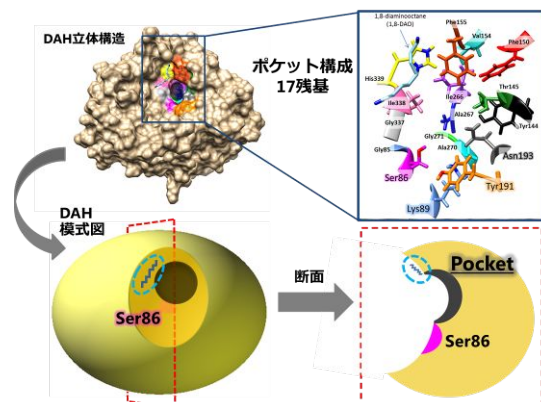


図4.DAHの全体構造の模式図とポケットを構成する残基

Alaへの置換によるIle266とIle338側鎖の電気的な性質に大きな変化は少ないと考えられる。従って、上記変異によるアミノリシス触媒能への影響は、基質ポケットの形状変化もしくはポケット体積の広がり大きく関係していることが考えられた(図5)。そこで、両残基をAlaに置換した変異酵素I266A/I338A DAHを構築し(図5)2残基変異酵素のアミノリシス活性とそれぞれの1残基変異酵素と比較したところ、I266A/I338A DAHはI338A DAHのアミノリシス触媒能とほぼ同等であることが分かった。これらの結果から、ポケットの広さとアミノリシス活性との関係は薄いことが考えられ、Ile338の位置の形状にアミノリシス活性は大きく影響することが示唆された。

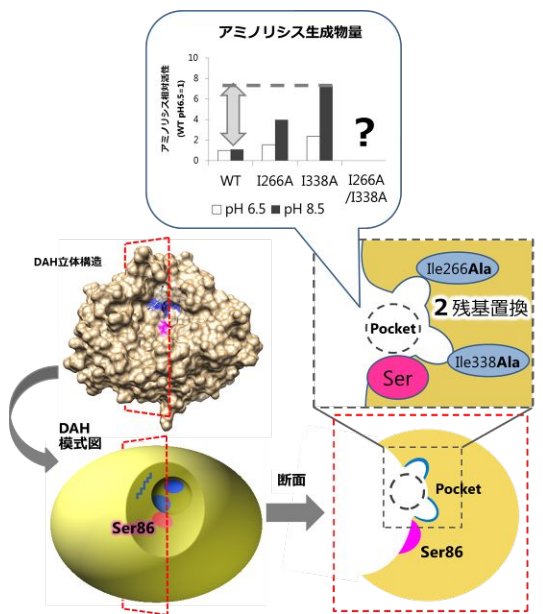


図5 .DAH の基質ポケットの広さとアミノリシス触媒能との関係

(3) DAH 活性部位ポケット形状置換とアミノリシス活性 DAHのIle338にGly、Ser、Asp、Pheに置換した1変異酵素を構築し、アミノリシス活性への影響とポケット形状との関連を調べた。その結果、いずれの変異酵素もアミノリシス活性が上昇し、ペプチド結合形成能の向上が観察された。特にGlyやSerに置換した酵素では、I338A変異酵素より高いアミノリシス活性が見られた。本酵素立体構造を基に、各変異酵素の活性部位ポケットの形状を予測した結果、いずれの変異酵素においてもポケットの体積が大きくなっていったことから、これがアミノリシス活性を向上させている要因であることが予測された。

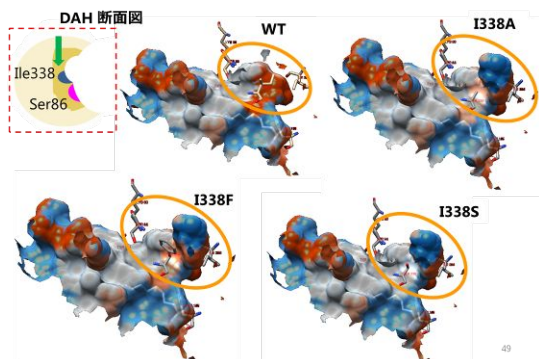


図6. DAH の各変異酵素における基質ポケットの広さ

(4) 短鎖ペプチドの酵素合成と機能物質の探索 基質の組合せが異なる酵素反応液を2000種類作成し、これをライブラリーとして抗体医薬生産に使用されるCHO細胞の培養液に添加し、抗体生産への影響を評価した。その結果、L-Tyrをアシル受容体として使用

した酵素反応液やD-Pro誘導体をアシル供与体として使用した酵素反応液を培地に少量添加することで、約1.4倍の抗体生産の向上が確認された。

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11件)

(1) S. Tokai, T. Bito, K. Shimizu, J. Arima*: Effect of oxidation of the non-catalytic γ -propeller domain on the substrate specificity of prolyl oligopeptidase from *Pleurotus eryngii*. Biochemical and Biophysical Research Communications (査読有), 487(2), 2017, 356-361

(2) J. Arima*, K. Shimone, K. Miyatani, Y. Tsunehara, Y. Isoda, T. Hino, S. Nagano*: Crystal structure of D-stereospecific amidohydrolase from *Streptomyces* sp. 82F2: insight into the structural factors for substrate specificity. FEBS Journal (査読有), 283, 2016, 337-349

〔学会発表〕(計27件)

Shota Tokai, Tomohiro Bito, Jiro Arima: Eryngase, a serine aminopeptidase of *Pleurotus eryngii*, the substrate specificity of which is changed by oxidation. The International Joint Symposium between Japan and Korea (AFELiSA) 2016, Nov. 9-10, 2016, Daejeon, Korea

Yasmeen Elyas, Kazusa Miyatani, Tomohiro Bito, Jiro Arima: D-stereospecific amidohydrolase from *Streptomyces* sp. 82F2 that exhibits peptide bond formation activity. The International Joint Symposium between Japan and Korea (AFELiSA) 2016, Nov. 9-10, 2016, Daejeon, Korea

東海彰太、有馬二朗: エリンギ由来セリンアミノペプチダーゼ: 非触媒ドメイン残基の酸化による基質特異性の変化、2016年度日本生物工学会大会 2016年9月28日 30日、富山国際会議場(富山県富山市)

宮谷一紗、有馬二朗: D-アミノ酸アミド加水分解酵素の活性部位ポケットを形成する残基と副反応“ペプチド結合形成能”との相関、2016年度日本農芸化学会大会 2015年3月27日 30日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Kazusa Miyatani, Ayaka Ota, Jiro Arima: Cavity size of D-stereospecific amidohydrolase relates to its side reaction “aminolysis”. The International Chemical Congress of

PACIFIC BASIN SOCIETIES (PACIFICHEM) 2015, Dec. 16-21, 2015, Honolulu, Hawaii, USA
Yuka Tsunehara, Akira Tamura, Yoshitaka Isoda, Jiro Arima: Construction of non-natural dipeptide library by peptide bond formation reaction catalyzed by D-stereospecific amidohydrolase. The International Chemical Congress of PACIFIC BASIN SOCIETIES (PACIFICHEM) 2015, Dec. 16-21, 2015, Honolulu, Hawaii, USA

有馬二郎：ペプチド分解酵素のアミノリシスによるペプチド結合の形成とその応用、日本農芸化学会中四国支部例会 2015年6月13日、鳥取大学(鳥取県鳥取市)(招待講演)
宮谷一紗、森信寛、有馬二郎：D-アミノ酸アミド加水分解酵素の構造と誤作動「ペプチド結合形成能」との相関、2015年度日本農芸化学会大会 2015年3月26日 29日、岡山大学(岡山県岡山市)

有馬二郎：酵素反応生成物の利用可能性を探る ~ペプチド分解酵素の誤作動によるアミノ酸同士の結合とその応用~、日本農芸化学会中四国支部若手シンポジウム 2014年9月20日、愛媛大学(愛媛県松山市)(招待講演)

有馬二郎、太田朱香、宮谷一紗、森信寛：構造からみたD体特異的アミド加水分解酵素の誤作動反応、2014年度日本生物工学会大会 2014年9月09日 11日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

有馬二郎、太田朱香、森信寛、日野智也、永野真吾：ペプチド結合形成反応を触媒する放線菌由来D体特異的アミド加水分解酵素、第6回日本生物物理学会中四国支部大会 2014年5月17日 18日、とりぎん文化会館(鳥取県鳥取市)

〔図書〕(計 0件)

該当なし

〔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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://staff.muses.tottori-u.ac.jp/arima/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有馬 二郎 (ARIMA, Jiro)
鳥取大学・農学部・准教授
研究者番号：80393411