

機関番号：32689

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21880045

研究課題名（和文）酸性アミノ酸をN末端基質とする新規L-アミノ酸リガーゼの取得とその応用

研究課題名（英文）Screening of an L-amino acid ligase that recognizes acidic amino acids as N-terminal substrates and its application

研究代表者

新井 利信 (ARAI TOSHINOBU)

早稲田大学・理工学術院・助手

研究者番号：00547622

研究成果の概要（和文）：効率的なペプチド合成プロセスの確立を目的として微生物由来酵素であるL-アミノ酸リガーゼに着目し、酸性アミノ酸を基質とする新規リガーゼ酵素の探索を実施した。酸性アミノ酸を構成要素とする抗生物質の生産菌から、酵素精製ならびに遺伝子工学的手法を用いて目的酵素の取得を試みた。その結果、目的酵素の取得にまでは至らなかったが、本抗生物質の生合成に関与することが推定されるリガーゼ酵素の取得に成功した。

研究成果の概要（英文）：We searched for a novel L-amino acid ligase (Lal) possessing the activity toward acidic amino acids from a microorganism producing peptide antibiotics. A novel ligase that seemed to be involved in the biosynthesis of the antibiotics was obtained by enzyme purification and gene manipulation, but the search of the Lal showing the activity toward acidic amino acids has been under examination.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：応用生物化学

科研費の分科・細目：農芸化学、応用生物化学

キーワード：L-アミノ酸リガーゼ、ペプチド合成、抗生物質

## 1. 研究開始当初の背景

ペプチドはアミノ酸同士がアミド結合を介して複数個連結した化合物である。ペプチドはそれを構成するアミノ酸には無い有用な物性や生理活性を示すことから、合成高分子素材の代替としてや、機能性を活かした新たな用途開発研究が盛んに行われており、研究分野は非常に多岐にわたるものとなっている。また、商業利用の側面においては、輸液の成分として重要な「アラニルグルタミン (Ala-Gln)」、ならびに人工甘味料として世

界規模での需要が見込まれる「アスパルチルフェニルアラニンメチルエステル (Asp-Phe-OMe)、アスパルテム」の効率的生産プロセスの開発は長年様々な研究者によって検討が重ねられ、特に近年においては酵素法や発酵法を利用した環境負荷低減型のプロセス開発が切望される経緯がある。

我々はこれまで微生物由来の酵素であるL-アミノ酸リガーゼ (Lal) を用いた短鎖ペプチド合成の研究を推進してきた。Lal は2005年に協和発酵工業によって初めて報告され

た微生物由来酵素で、ATP の加水分解反応と共役する形式で無保護のアミノ酸同士を直接連結してジペプチドを合成可能である。そのため発酵法への応用展開も可能であり、ペプチドの大量合成を行うにあたって理想的な酵素であると考えた。これまでに我々のグループでは、協和発酵工業の成果に続いて、(a) 微生物のゲノム情報や各種データベースの活用、ならびに (b) 微生物からの酵素精製、によって複数種類の新たな Lal の取得に成功してきた。これらは各々に特徴的な基質特異性を示したが、酸性アミノ酸 (アスパラギン酸, Asp; グルタミン酸, Glu) を N 末端側の基質とする Lal は無かった。

## 2. 研究の目的

Lal を用いて合成可能なペプチドの種類を拡大することを目的として、酸性アミノ酸 (Asp, Glu) を N 末端に持つジペプチドを合成可能な酵素の探索を行う。本研究では、酸性アミノ酸である Asp を構成成分とするペプチド性抗生物質「プランベマイシン (A, Ala-Asp-APPA; B, Ala-Asn-APPA. APPA, L-2-amino-5-phosphono-3-*cis*-pentenoic acid)」のペプチド結合形成反応を Lal が担っているものと推察し、プランベマイシン生産菌 *Streptomyces plumbeus* NBRC13708 からの新規 Lal の取得を検討することとした。プランベマイシンは C 末端に配する APPA が Thr 合成酵素の活性を阻害することにより生育阻害を引き起こすことが知られており、これまでに、当該菌のゲノム DNA 情報、ならびにプランベマイシンの生合成に関わる酵素や遺伝子についての報告は無かった。そこで、当該 Lal 遺伝子を取得するにあたって、(a) 遺伝子工学的的手法ならびに (b) 酵素精製の 2 種類のアプローチで検討することとした。さらに、大腸菌を用いて組換え酵素を調製し、本酵素の諸性質についての検討も実施する。最後に、当該酵素を利用したペプチド合成の一例として、有用性の高い「アスパルテム (Asp-Phe-OMe)」の合成について試験を行い、Lal を用いた酵素法もしくは発酵法による効率的かつ環境負荷低減型ペプチド生産プロセスの開発へと展開することを予定している。

## 3. 研究の方法

我々の研究において、これまでにペプチド性抗生物質「リゾクチシン (図 1)」の生産菌 *Bacillus subtilis* NBRC3134 から、Lal によるヒドロキサム酸合成を指標とした一連の精製作業により、N 末端基質としてアルギニン (Arg) に特異性を示す Lal (RizA) の単離精製に成功している。RizA は Arg と APPA の縮合反応を担っていることが強く示唆され、さらに RizA をコードする遺伝子の周辺領域

解析からリゾクチシンの生合成に関与する一連の遺伝子群 (14 個の ORF) を見出すことにも成功している。本遺伝子クラスターからは、自己耐性への関与が推定される Thr 合成酵素 (リゾクチシン中の APPA が Thr 合成酵素を阻害し抗真菌性を示す) や、リゾクチシン A に分岐鎖アミノ酸を縮合する活性を担うことが示唆される新規 Lal (RizB) の取得にも成功している。

本研究では、新たに放線菌 *S. plumbeus* NBRC13708 が生産するペプチド性抗生物質「プランベマイシン (図 2)」に着目した。プランベマイシン A は構造内に酸性アミノ酸である Asp を含んでおり、さらにはリゾクチシンと同様に C 末端に非タンパク質構成性アミノ酸である APPA を有している。そこで、我々は先のリゾクチシンの例と同様に、プランベマイシンにおけるペプチド結合形成にも 2 種類の Lal が関与していることを推察し、かつリゾクチシンの場合と同様の反応機構によって APPA が合成されていることを考えた。

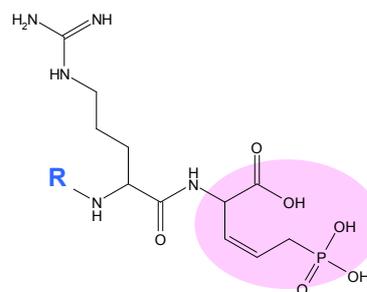


図 1. リゾクチシン

リゾクチシン A, R = H  
 リゾクチシン B, R = Val  
 リゾクチシン C, R = Ile  
 リゾクチシン D, R = Leu

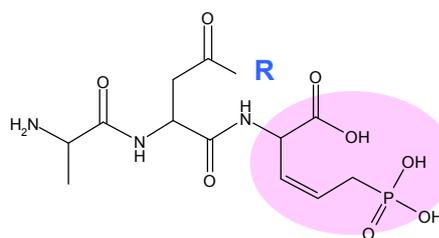


図 2. プランベマイシン

プランベマイシン A, R = OH  
 プランベマイシン B, R = NH<sub>2</sub>

### (1) 遺伝子工学的的手法による新規 Lal 遺伝子の探索

前述の通りプランベマイシンとリゾクチシンは共通して C 末端に APPA を有しており、リゾクチシンについては既に生合成遺伝子クラスターの特定および生合成経路の推定

が完了している。したがって、プランベマイシンの生合成に関わる酵素をコードした各種の遺伝子構成もリゾクチシンの場合と類似である可能性が高く、同様の生合成機構によって生成していることが推察される。そこで、各種酵素において保存性の高い配列部分を基に DNA プライマー（縮重プライマー）を設計し、*S. plumbeus* NBRC13708 のゲノム DNA を鋳型とした PCR 法を用いてプランベマイシンの生合成に関わる遺伝子群の特定を試みた。その後、クラスターの配列を精査し、目的の Lal 遺伝子の取得を検討した。なお、Lal は ATP-grasp superfamily に属することが明らかとされているため、取得した PCR 断片の配列から Pfam などのデータベースを利用することで Lal をコードした遺伝子の推定を行った。また、これら以外にも、プランベマイシンの耐性機構の一つとなることが推定される Thr 合成酵素をコードした遺伝子をショットガンクローニングによって探索した。スクリーニングには大腸菌 ThrC 株を宿主として栄養要求性の相補を利用した。さらに、プランベマイシンの生合成に Lal ではなく、NRPS (nonribosomal peptide synthetase) が関与する可能性を考え、A-ドメイン保存領域を用いた NRPS 遺伝子断片の取得を行い、Asp を基質とするリガーゼ酵素の存在についても検証を行った。

#### (2) 酵素精製による新規 Lal の探索

初めに *S. plumbeus* NBRC13708 の培養菌体から無細胞抽出液を作成し、プランベマイシンの構成アミノ酸である Asp, Asn, Ala を基質としたペプチド合成活性の有無を検証した。活性の検証には先のリゾクチシン合成に関わる RizA の精製でも使用した比色分析法を利用した。本法では、アミノ酸とヒドロキシルアミンを基質に酵素反応を行い、反応によってペプチド結合が形成されるとヒドロキサム酸が生成する。ここに鉄 ( $\text{Fe}^{3+}$ ) を添加すると、ヒドロキサム酸と鉄 ( $\text{Fe}^{3+}$ ) との錯体形成によって反応液が赤色を呈するため、Lal 活性を呈色の有無によって視覚的に判断することができる。次いで、ÅKTA explorer 10S (GE Healthcare) を使用して、各種クロマトカラムを組み合わせることで、目的とするリガーゼ酵素の精製を行った。また、各精製段階における活性フラクションの選別方法については、上述したヒドロキシルアミン比色分析法を利用した。精製したタンパク質はエドマン分解法による N 末端アミノ酸配列分析を行った後、PCR 法を用いた定法に従って当該酵素をコードする遺伝子の取得を検討した。取得した遺伝子は BLAST や Pfam などの各種データベースを活用することで機能アノテーションを行った。

精製したタンパク質の遺伝子をクローニ

ングし、大腸菌を用いた組換え酵素を調製した。組換え酵素の調製においては、pET システム (Novagen) を利用して、His-tag 融合酵素として生産した。生産した酵素は Ni-アフィニティーカラムを用いることで精製し、反応に用いた。基質特異性の検証としてタンパク質を構成する 20 種のアミノ酸およびペプチドを 1 種類もしくは 2 種類の組み合わせで反応を行った。反応液は MS や NMR、HPLC を用いて詳細な解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 遺伝子工学的手法による新規 Lal 遺伝子の探索

プランベマイシンはペプチド性抗生物質リゾクチシンと同様に APPA を構成中に含むことから、リゾクチシンと同様の生合成機構によって生産されていると推察した。既に我々が取得しているリゾクチシン生合成遺伝子クラスター中の 14 個の ORF から該当する類似酵素との保存領域を推定し縮重プライマーを作成した。*S. plumbeus* NBRC13708 のゲノム DNA を鋳型とし、プライマーの組み合わせとして総当り的に PCR を行い、プランベマイシン生合成遺伝子クラスター断片の増幅を試みた。様々な遺伝子断片の取得に成功し塩基配列解析を行ったが、生合成遺伝子クラスターならびに推定 Lal 遺伝子を取得するには至らなかった。

また、リゾクチシンにおいては通常のスレオニン合成酵素とは別に、APPA に耐性を示すことが推定される Thr 合成酵素が遺伝子クラスター内に存在していたことから、プランベマイシンの生合成遺伝子クラスター内にも耐性機構として本遺伝子が存在することを推定した。本遺伝子をスレオニン要求株を利用したショットガンクローニングにより取得した後、周辺領域を解析することで目的とするリガーゼ酵素の取得を試みることを考えた。しかしながら、スクリーニングにて陽性反応を示す遺伝子断片の取得には成功したが、最終的に目的とする遺伝子を取得するには至らなかった。さらに、NRPS の A ドメイン保存領域を用いた遺伝子断片の取得も試みた。幾つかの遺伝子断片の取得に成功し、塩基配列解析の結果から基質認識について推定して結果、酸性アミノ酸を基質とする NRPS 断片は取得されてこなかった。

##### (2) 酵素精製による新規 Lal の探索

*S. plumbeus* NBRC13708 の無細胞抽出液を用いて、プランベマイシンの構成アミノ酸である Asp, Asn, Ala を各々基質にペプチド結合形成活性を検証した。その結果、Asp では活性が微弱であったが、Ala において有意な活性を検出した。なお、Asn を基質とした場合は、側鎖のアミド部分に作用する共雑酵素

の存在により、 $\alpha$ -位カルボキシル基でのペプチド結合形成を正確に測定することができなかった。ここで、我々は同じく APPA を構造中に含むリゾクチシンの生合成遺伝子がクラスターを形成し、かつ2種類のLalが合成に関与することを強く示唆する結果を得ていたことから、Alaを基質とするリガーゼ酵素を同定した後、Aspとの結合を作る酵素を取得することとした。

酵素の精製では各種精製カラムに対する目的タンパク質の吸着具合を検証した後、(1) DEAE (anion exchange column)、(2) Q sepharose (anion exchange column)、(3) Bio-scale CHT5- I (hydroxyl apatite column)、(4) Superdex (gel-filtration column) の連続的なカラムクロマトグラフィー操作によりAlaを基質とするペプチド合成酵素(約95 kDa)を均一に精製することに成功した(図3)。

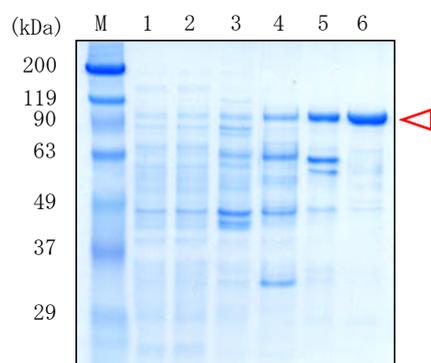


図3. 精製画分のSDS-PAGE解析

Lanes: M, Marker protein; 1, whole cell; 2, cell-free extracts; 3, DEAE TOYOPEAL; 4, Q sepharose; 5, Bio-scale CHT5-1; and 6, Superdex.

ここで取得したタンパク質のN末端アミノ酸配列をエドマン分解法により解析し、これと相同な配列を有するタンパク質をBLASTによって検索した結果、リボソームでのペプチド合成に関与する valyl-tRNA synthetase (ValS) と相同性を示すことを明らかとした。そこでゲノム情報が既知の *Streptomyces avermitilis* から同様の配列を持つ組換え ValS を調製し、ペプチド合成活性を検証した結果、Ala と Asp-Val および Asn-Val (Asp-APPA, Asn-APPA の代替として利用) から Ala-Asp-Val, Ala-Asn-Val を合成可能であることを明らかとした。また、今回見出したタンパク質はプランベマイシンに類似のペプチドを合成可能であるだけでなく、血圧降下作用を示すAla-Proの合成も可能であり、さらには、微弱ではあるがAsp-Valを連結してAsp-Val-Asp-Valを合成する従来のリ

ガーゼにはなかったジペプチド同士を連結する極めて新奇な活性を見出すことにも成功している。

プランベマイシンを構成するアミノ酸の縮合反応には、リゾクチシンと同様に2種類のLalが関与することを想定して研究に着手したが、Alaの縮合反応を行うタンパク質として aminoacyl-tRNA synthetase が取得された。aminoacyl-tRNA synthetase が抗生物質の生合成に関与している例も報告 (FEBS Letters 584, 366-375, 2010) されていることから、今回精製によって取得したタンパク質がプランベマイシン生合成を担う一つの酵素である可能性は十分あり得るものと考えている。今後は、今回取得したタンパク質をコードした遺伝子の周辺を探索することで、プランベマイシンの生合成遺伝子クラスターならびに当初目的としたAspを基質とするLalの取得につなげていくことができるものと考えている。

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

新井 利信 (ARAI TOSHINOBU)  
早稲田大学・理工学術院・助手  
研究者番号: 00547622