

機関番号：15101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20780075

研究課題名 (和文) 新規 D-アミノ酸含有ペプチド合成酵素の創製

研究課題名 (英文) Construction of D-aminoacyl peptides synthetase

研究代表者

有馬 二郎 (ARIMA JIRO)

鳥取大学・農学部・講師

研究者番号：80393411

研究成果の概要 (和文)：

特異な生理活性を持つD-アミノ酸含有ペプチド (D-ペプチド) の効率的な酵素合成を目指し、D-アミド加水分解酵素を対象に、高機能D-ペプチド合成酵素の創製に試みた。スクリーニングにより高いアミノリシス活性を有するSer型D-アミド加水分解酵素が得られ、本酵素によるキチナーゼ阻害活性を有する環化ペプチドの1ポット合成に成功した。また193番目にあるAsn残基が基質認識に関わることが明らかになり、本残基を別の残基に置換することで、本酵素によるペプチド合成の幅が広がる可能性が示された。

研究成果の概要 (英文)：

Peptides incorporating D-amino acids are expected to increase the functional variety and applications of peptides. In this study, we constructed the mutant D-aminopeptidases as a convenient tool for synthesis of peptides incorporating D-amino acids. We obtained a serine D-stereospecific amidohydrolase that exhibit peptide bond formation activity by catalysis of aminolysis reaction. The enzyme utilizes D-Pro derivatives as acyl donor substrate, and exhibit efficient synthesis of cyclo (D-Pro-L-Arg) that has chitinase inhibitory activity in a one-pot reaction manner. In addition, we identified the residue, Asn193, which associates the recognition of side chain of acyl donor, from the mutation analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：タンパク質工学、D-アミノペプチダーゼ、アミノリシス、ペプチド合成

1. 研究開始当初の背景

(1) ペプチドの産業用途は広い— 近年、ペプチドの機能に関する研究が進み、単体アミノ酸にはない優れた機能を持つペプチド

が自然界から多数同定されてきた。その殆どがL-アミノ酸からなるペプチドであるが、中にはD-アミノ酸を含有し (D-ペプチド)、特異的な生理活性を示すものもある。従って、

ペプチドの食品・医薬産業への用途が広がりつつある。

(2) D-ペプチド合成法の必要性— ペプチド合成は化学合成が一般的であるが、劇薬の使用、有害廃液、特殊な技術・複雑な工程の必要性などの問題点を残している。従って安全でマイルドな条件で簡単に行える酵素合成に注目が集まっている。L-アミノ酸含有ペプチドの酵素合成は広く研究され、幾つかは市販にまで展開された。一方D-ペプチドは未同定の有用ペプチドが多数存在し、L-アミノ酸からの合成と同様 D-ペプチドの効率的且つ汎用性の高い合成法があれば、同定から産業利用まで、広範囲な応用が期待できる。

2. 研究の目的

D-ペプチド合成は、D-アミノ酸リガーゼを利用した数例の報告がある。しかし合成過程においてATPを要求し、その再生系が必要で経済性に難点をもつ。一方、D-アミノペプチダーゼのアミノリシスを利用した手法もこれまでに報告されているが、D-アミノ酸誘導体の置換基変換には優れている反面ペプチド合成における効率は平凡である。また、高い加水分解活性や厳格な特異性から、現在までに応用には至っていない。従って効率的且つ汎用性の高いD-ペプチド合成法開発には新たな工夫が必要となる。そこで本研究ではD-特異的アミド分解酵素を対象としたD-ペプチド合成酵素としての利用を目指し、反応機構の解明、反応条件の最適化、そしてタンパク質工学的手法を利用した、D-特異的アミド分解酵素の基質特異性改変に向けて研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 酵素の取得と性質及び構造の解析—すでに保有する土壌細菌2000株を培養し、培養上清のD-アミノ酸誘導体加水分解活性を測定することで、培養液中に分泌される酵素のスクリーニングを行った。酵素の構造・性質情報は、酵素精製を行った後、精製酵素の性質検討(熱安定性、Kinetics、溶媒安定性、基質特異性、阻害試験)、N末及び内部配列解析を行うことで取得した。

(2) 生産系の構築—N末端及び内部配列の情報を元に、得られた酵素の全長遺伝子を取得し、pET系ベクターにサブクローニング、大腸菌BL21(DE3)株への導入を経て、得られた酵素の大腸菌による発現系を構築した。また、発現条件(温度、時間、IPTG濃度)の検討を通し、得られたすべての酵素の効率的な発現条件を決定した。

(3) ペプチド合成能、分解能の評価—組

換え酵素における、様々な誘導体やペプチドに対する分解活性は以下のように数値化した。ペプチドもしくはアミノ酸誘導体を基質とした反応系を組み、酵素反応を一定時間行わせた。その後D-アミノ酸酸化酵素とペルオキシダーゼをカップルさせた反応系を利用し、遊離したD-アミノ酸濃度を測定することで分解活性を決定した。ペプチド合成においては以下のようにして評価した。様々な条件(溶媒、基質濃度、温度等)のもとで酵素反応を行い、反応後のサンプルをESI-TOF-MSで生成ペプチドを同定した。更には最適条件下での合成における特異性を検討し、ペプチド分解での特異性と比較を行った。

(4) キメラ酵素の構築と加水分解にかかわる領域の同定—遺伝子工学的な手法を利用し、2種の酵素間でキメラを作成し、その加水分解能を評価することで、加水分解にかかわる領域の同定を行った。手法は両酵素遺伝子の中間領域にサイレント変異を施すことで同じ制限酵素部位を導入し、両酵素の領域を入れ替えることで、キメラを構築した。野生型とキメラ酵素を発現し、キメラ酵素の性質が2種の酵素のいずれの性質を有しているかを評価した。

(5) 活性部位付近の残基の機能解析—活性中心となる残基から5~8Å以内に存在する残基をすべてピックアップし、Quick Change Mutagenesisの手法を応用することで部位特異的変異を施した。それぞれの変異酵素について、ペプチド分解能、合成能を評価し、各残基の機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) D-特異的アミド分解酵素のスクリーニング—独自に保有する2000株の土壌細菌を培養し、培養上清からD-特異的アミド分解酵素をスクリーニングした結果、3種の酵素が得られた。一つは金属キレート剤で活性が阻害され、残りの2つはPMSFで活性が阻害されたことから、それぞれ金属型およびセリン型の加水分解酵素であることが考えられた。

(2) 金属型D-特異的アミド分解酵素の機能解析—金属キレート剤で活性が阻害される酵素を精製し、N末端配列及び内部配列を決定した。アミノ酸配列の情報を元に、各酵素遺伝子の全長を解読した結果、本酵素はM55ペプチダーゼファミリーに属する金属型加水分解酵素と同定された。本酵素遺伝子の全長をクローニングし、大腸菌による発現系の構築を行った結果、大量の組み換えタンパクの取得に成功した。そこで、様々な生化学的性質について検討した結果、本酵素はアミ

ノ酸誘導体の加水分解活性が非常に高く、ペプチド分解活性は低いことが明らかとなった。また、活性中心の金属を置換すると、ドラスティックな基質特異性の変化が見られた(表1)。しかし、本酵素は逆反応やアミノリシス反応の機能を有しておらず、ペプチド合成能を示すことはなかった。

表1. 金属置換による基質特異性変化

62E11 DppA: 金属型 D-特異的アミド分解酵素

Co-62E11 DppA: 活性中心が Co に置換された酵素

Substrate	Holo-62E11 DppA V ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) ^a	Co-62E11 DppA V ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	Velocity relative to holo-62E11 DppA (fold)
Gly-pNA	26 ± 7	1040 ± 70	40
D-Ala-pNA	848 ± 128	864 ± 123	1.0
D-Leu-pNA	126 ± 32	236 ± 49	1.9
D-Phe-pNA	6.7 ± 0.8	16 ± 2	2.4
D-Ala-Gly	ND ^b	0.7 ± 0.2	>70
D-Ala-Gly-Gly	0.03 ± 0.01	12 ± 2	400
D-Ala-D-Ala	ND	3.5 ± 0.6	>350
D-Ala-D-Phe	ND	0.9 ± 0.1	>90
D-Ala-D-Ala-D-Ala	ND	1.6 ± 0.3	>160
D-Ala-D-Ala-OMe	0.4 ± 0.01	120 ± 28	300
D-Ala-NH ₂	0.09 ± 0.01	41 ± 9	456
D-Ala-OMe	22 ± 4	177 ± 22	8.0
D-Phe-OMe	3.5 ± 0.3	12 ± 1	3.4
D-Ala-OBu	1.2 ± 0.1	108 ± 6	87
D-Ala-OBzl	480 ± 34	589 ± 13	1.2
D-Val-OBzl	114 ± 14	54 ± 14	0.5
D-Ile-OBzl	52 ± 2	57 ± 4	1.1
D-Leu-OBzl	71 ± 8	85 ± 12	1.2
D-Pro-OBzl	ND	13 ± 1	>1300
D-Phe-OBzl	19 ± 1	41 ± 3	2.2
D-Tyr-OBzl	21 ± 3	24 ± 7	1.1
D-Trp-OBzl	0.2 ± 0.1	3.7 ± 0.7	2.2
D-Ser-OBzl	2.5 ± 0.5	5.2 ± 0.6	2.1

^a Aminoacyl peptides, D-alaninamide, D-Ala-tBu, D-aminoacyl methyl esters, and D-aminoacyl benzyl esters were used as substrates. Chemicals used in this investigation were purchased from Bachem AG. All assays were performed at a final substrate concentration of 5.0 mM. All data are expressed as the mean ± standard deviation of three independent experiments.

^b V, velocity of hydrolytic activity.

^c ND, not detectable (the velocity was less than 0.01 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$).

(3) セリン型 D-特異的アミド分解酵素の機能解析— PMSF で活性が阻害される2つの酵素を精製し、N 末端配列及び内部配列を決定した。アミノ酸配列の情報を元に、各酵素遺伝子の全長を解読した結果、両酵素ともに S12 ペプチダーゼファミリーに属するセリン型加水分解酵素と同定された。本酵素遺伝子の全長をクローニングし、大腸菌による菌体外分泌型発現系の構築を行った結果、大量の組み換えタンパクの取得に成功した。そこで、様々な生化学的性質について検討した結果、本酵素は、疎水アミノ酸誘導体に対して優先的に加水分解活性を示し、反応中の pH をアルカリ側に寄せることで、アミノリシスによるペプチド合成活性を示した。

両酵素の性質は類似したものであったが、その特徴は非常に得意であり、D-アミノ酸誘導体をアシル供与体、L-アミノ酸及びその誘導体をアシル受容体として優先的に利用し、立体選択的に D, L-配列を持つペプチドを合成できることが明らかとなった。また、有用ジペプチド合成への可能性を検証した結果、両酵素ともに D-Pro を N 末に持つジペプチドの合成能に長けており、L-Arg と組み合わせることで、キチナーゼ阻害剤であるシクロ

(D-Pro-L-Arg) の高収率な 1 ポット合成に成功した(図1)。

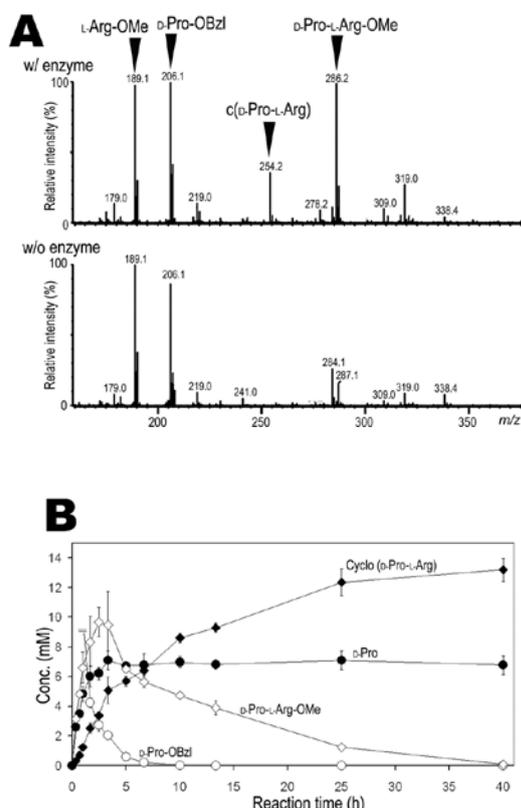


図1. セリン型 D-特異的アミド分解酵素による c(D-Pro-L-Arg) 合成

A: MS 解析, B: 反応におけるタイムコース

(3) キメラ解析による加水分解活性にかかわる領域の同定— 2つのセリン型 D-特異的アミド分解酵素はともに同程度のアミノリシス活性を示したが、一方は、加水分解活性が高く、もう一方は、加水分解活性が低いことが明らかとなった。そこで、加水分解活性を決める領域を同定するため、両酵素のキメラを構築し、キメラ酵素における加水分解活性とアミノリシス活性の詳細を野生型と比較した。その結果、これらの酵素の活性中心は前半部位に存在していることは、既に明らかとされていたが、加水分解活性の強さを決める領域は酵素構造上の後半に位置することが明らかとなった。また、部位特異的変異による加水分解活性に寄与する残基の同定を行ったところ、酵素構造上の後半に位置する2つの残基が、加水分解活性に大きく関わっていることが明らかとなった。

(4) 基質特異性にかかわる残基— 立体構造が既知である同種酵素の立体構造を参考に、放線菌由来 D-アミノペプチダーゼの活性中心 Ser 残基から、5~8Å 内にある残基を4つピックアップした(図2)。これらの残基

について部位特異的変異による機能解析を行ったところ、193番目にあるAsn残基が、基質認識に関わることを明らかにした。本酵素によるペプチド合成は、D-アミノペプチダーゼのアミノリシス反応の触媒能を利用するものであるが、Asn残基をAspに置換することにより、アミノリシス反応によって得られる生成物(ジペプチド)のN側のアミノ酸の認識が大きく変わった(図2)。これにより、本酵素によるペプチド合成の幅を広げる結果となった。

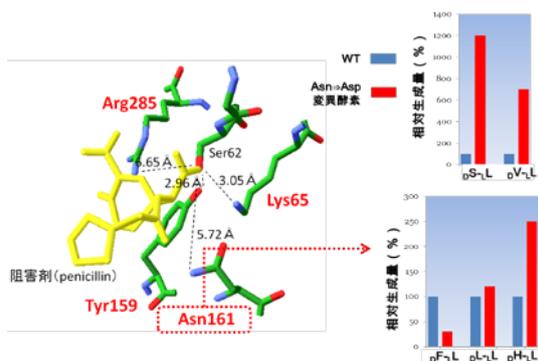


図2. セリン型D-特異的アミド分解酵素の活性中心付近の残基と変異による特異性の改変

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3件)

- ① J. Arima*, H. Ito, T. Hatanaka, and N. Mori: Aminolytic reaction catalyzed by D-stereospecific amidohydrolases from *Streptomyces* spp. *Biochimie* (査読有), in press
- ② J. Arima*, M. Morimoto, H. Usuki, N. Mori and T. Hatanaka: Aminolysis reaction of *Streptomyces* S9 aminopeptidase promotes the synthesis of diverse prolyl dipeptides. *Applied and Environmental Microbiology* (査読有), 76(2010), 4109-4112
- ③ J. Arima*, Y. Uesugi, and T. Hatanaka: *Bacillus* D-stereospecific metallo-amidohydrolase: Active-site metal-ion substitution changes substrate specificity. *Biochimie* (査読有), 91(2009), 568-576

[学会発表] (計5件)

- ① 橋崎泰明、森信寛、有馬二朗: 放線菌由来D-アミノペプチダーゼの基質特異性に関わる残基 2011年度農芸化学会大会 2011. 3. 27-30 京都
- ② 森本正純、森信寛、有馬二朗: 放線菌由来S9アミノペプチダーゼを用いた多様なプロリルジペプチドの合成 2010年度生物工学会大会 2010. 10. 27-30 宮崎
- ③ 有馬二朗、橋崎泰明、森信寛: 放線菌由来ファミリーS12アミノペプチダーゼの加水分解活性に関わる残基 2010年度生物工学会大会 2010. 10. 27-30 宮崎
- ④ 伊藤瞳、森信寛、有馬二朗: 放線菌由来S12ファミリーペプチダーゼの加水分解活性を決める領域の同定 2010年度農芸化学会大会 2010. 3. 27-30 東京
- ⑤ 有馬二朗、伊藤瞳、森信寛: 放線菌由来ファミリーS12アミノペプチダーゼによるD-L-配列をもつペプチドの合成 2010年度農芸化学会大会 2010. 3. 27-30 東京

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: D-, L-ペプチドの立体選択的合成法
 発明者: 有馬二朗、伊藤瞳
 権利者: 鳥取大学
 種類: 特許
 番号: 特願 2010-015713
 出願年月日: 2010年1月27日
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 取得年月日:
 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：