

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 6 月 1 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580100

研究課題名（和文）微生物由来ペプチダーゼの機能解析とβ-アミノ酸含有ペプチド合成への応用

研究課題名（英文）Studies on microbial peptidases and synthesis of peptides containing β-amino acid

研究代表者

米田 英伸（KOMEDA HIDENOBU）

富山県立大学・工学部生物工学科・准教授

研究者番号：50285160

研究成果の概要（和文）：β-アミノ酸を含有するペプチドは医薬品との合成中間体等として重要な化合物である。β-アミノ酸を含有するペプチドを微生物酵素の触媒反応により合成する方法の開発を目的として、β-アミノ酸特異的なペプチダーゼを生産する微生物を探索した。その結果、得られた *Pseudomonas* 属細菌由来の新規ペプチダーゼを単離し、その酵素化学的諸性質を明らかにするとともに、遺伝子クローニングと大腸菌における大量発現を行い、組換え酵素を用いてβ-アミノ酸含有ペプチドの合成を行った。

研究成果の概要（英文）：β-amino acid-containing peptides (β-peptides) are important chemical compounds useful for the production of several pharmaceuticals. Several microorganisms that can produce peptidases acting on β-peptides were searched from soil samples and stock cultures to be used for the synthesis of β-peptides. A novel peptidase hydrolyzing β-peptides was isolated from one of the strains, *Pseudomonas* sp., and characterized. The gene encoding the enzyme was cloned and expressed in *E. coli*, and the recombinant enzyme purified from the transformant was used for the synthesis of β-peptides.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物酵素

1. 研究開始当初の背景

β-アミノ酸や D-アミノ酸は、生物がつくるタンパク質を構成するアミノ酸ではない

ため、従来自然界にはほとんど存在しない、非天然型のアミノ酸であると考えられてきた。しかしながら、近年の HPLC などの分析

技術の向上に伴い、従来知られている以上に、自然界に遊離型、あるいは結合型として存在し、生体内において重要な働きをしていることが判明しつつある。また、これらのアミノ酸を含有するペプチドは生体内における各種ペプチダーゼによる加水分解に対して抵抗性を示し、医薬品分野においてペプチド模倣化合物や特異的阻害剤、さらに医農薬合成の中間体として有用であり、その効率的な合成方法の開発が望まれていた。

研究代表者らは、土壌微生物である *Ochrobactrum anthropi* や *Bacillus cereus* 由来の D-アミノ酸特異的ペプチダーゼを用いた D-アミノ酸含有ペプチドおよび substrate mimetics 法による L-アミノ酸含有ペプチドやタンパク質の合成について、既に報告している。一方で、我々は *tert*-ブチルアミド化合物に立体選択的に作用するアミド加水分解酵素に関する研究の過程で、その酵素遺伝子近傍の塩基配列を決定した結果発見した遺伝子は、D-アミノ酸特異的ペプチダーゼではなく、 β -アラニンをもつペプチドや β -アラニンアミドを効率よく加水分解するペプチダーゼ、BapA をコードする遺伝子であることを新たに発見した。そして、大腸菌で発現させた酵素を用いて、その酵素化学的諸性質を明らかにしている。 β -ペプチド特異的酵素としては、従来カルノシン (β -Ala-L-His) を加水分解するペプチダーゼが *Pseudomonas aeruginosa* や *Lactobacillus delbrueckii* に見いだされていたが、いずれも微生物菌体の祖抽出液を用いた活性検出であり、酵素の単離は行われていなかった。我々は世界に先駆けて β -ペプチド特異的ペプチダーゼを *Pseudomonas* 属細菌に見出し、一次構造と機能解析を行った。その後、海外の研究グループが *Sphingomonas* 属や *Ochrobactrum* 属細菌由来

のペプチダーゼが β -アミノ酸含有ペプチド合成に利用可能であることを示しているが、それらの酵素と BapA とは低い相同性を有していた。

2. 研究の目的

本研究「微生物由来ペプチダーゼの機能解析と β -アミノ酸含有ペプチド合成への応用」(基盤研究 C) においては、特に β -アミノ酸を含有するペプチド (以下、 β -ペプチドと略す) を微生物酵素を用いた触媒反応により合成することを目的とした。

我々が既に保有している *Pseudomonas* sp. 等のペプチダーゼに加えて、自然界の微生物やゲノムデータベース情報より新規なペプチダーゼを探索し、選択された菌株からの酵素精製や、配列情報をもとにした遺伝子合成と組換え大腸菌からの酵素精製を行い、得られるペプチダーゼ標品の機能及び構造解析を行うとともに、分子進化学及びタンパク質工学的手法により、酵素機能の改良を行い、ペプチド合成への応用を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

自然界の微生物や研究室保存菌株、およびゲノム情報内に新規な β -ペプチド特異的ペプチダーゼを探索し、機能及び遺伝子構造解析を行うとともに、分子進化学及びタンパク質工学的手法により、高効率な β -ペプチド合成用酵素触媒として開発することを目的とした。

具体的には、我々がすでに保有している *Pseudomonas* sp. MCI3434 株由来 β -ペプチド特異的ペプチダーゼ BapA を大腸菌内で発現させ、精製酵素を調製し、各種反応条件による β -ペプチド合成を検討した。また、自然界の微生物や研究室保存菌株より各種 β -ペプ

チドの分解性を指標としたスクリーニングを行い、新規な β -ペプチド特異的ペプチダーゼ生産菌を探索した。また、各種微生物のゲノムデータベース内にBapA様配列を検索した。得られた微生物からの酵素精製や人工遺伝子合成と遺伝子組み換えの手法により当該酵素を単離し、その性能を評価した。さらに、得られた酵素を改良し、実用に適応できる酵素を創製することを目的として、分子進化工学的手法により変異酵素ライブラリーを作製し、安定性及び触媒活性が向上した変異酵素を探索した。

4. 研究成果

β -アミノ酸含有ペプチドは、生体内における各種ペプチダーゼによる加水分解に対して抵抗性を示し、医薬品分野においてペプチド模倣化合物あるいは特異的な阻害剤として有用な化合物である。この β -アミノ酸含有ペプチドを酵素法により合成することを目的として、*Pseudomonas* 属細菌株由来の β -Ala-Xaaジペプチダーゼ (BapA) をコードする遺伝子が大腸菌内で発現させ、精製酵素を調製し、基質である β -アミノ酸の種類、基質濃度、有機溶媒の添加、反応pHなどの各種反応条件や固定化酵素の使用を検討した。さらに、本酵素遺伝子にエラープローンPCRによるランダム変異を導入し、レプリカフィルター上の大腸菌コロニーを熱処理することにより、熱安定性または触媒活性が向上した変異酵素の取得を検討し、複数の変異酵素を取得するとともに、アミノ酸配列変異と酵素の機能向上との関連性を検討した。

また、自然界の土壌や研究室保存菌株から各種 β -ペプチドの分解性を指標としたスクリーニングを行い、 β -ペプチド特異的ペプチダーゼ生産菌を探索した。その結果、複数の候補菌を得ることができ、そのうち

Pseudomonas 属細菌が生産する酵素について、さらに検討を加えた。その結果、本ペプチダーゼは従来報告されていない基質特異性を示した。また、遺伝子クローニングにより一次構造を明らかにしたところ、本酵素は従来 β -ペプチド特異的酵素として知られている*Pseudomonas* sp. MCI3434株由来BapAや*Sphingomonas*属や*Ochrobactrum*属細菌由来のペプチダーゼとは相同性を示さず、一方でエステル加水分解酵素として報告されている酵素と30%程度の相同性を示すことが判明した。これらのことから、本酵素は新規な β -ペプチド加水分解酵素であると考えられた。得られた酵素遺伝子が大腸菌内で発現させ、組換え酵素を調製し、ペプチド合成への利用を検討した。

一方、データベース上の配列よりBapA様の配列を探索した後、選択した候補遺伝子についてGene assemblyによる人工遺伝子合成を行い、大腸菌での発現を検討した。無細胞抽出液のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による解析により大腸菌内での発現は確認されたものの、目的としたペプチダーゼ活性は検出されなかった。

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)

[学会発表] (計4件)

1. Hidenobu Komeda, Yasuhisa Asano, Discovery and application of new stereoselective amidases, 16th Japanese-German Workshop on Enzyme Technology, 2011.9.14 Toyama, Japan
2. 福田泰久、米田英伸、浅野泰久、 ω -ラウラクタムの「酵素的結晶変換法」による12-アミノラウリン酸の大量合成、第14回生体触媒化学シンポジウム、

2010.9.24 静岡市

3. 岡崎誠司、鈴木淳巨、米田英伸、浅野泰久、山根隆、 α -アミノ- ϵ -カプロラクタムラセマーゼの構造と機能、第6回D-アミノ酸研究会学術講演会、2010.9.17
富山市
4. 丸山沙都子、大塚稔、福田泰久、徳南宏祐、岡崎誠司、山根隆、米田英伸、浅野泰久、*Achromobacter obae*由来アミノ酸アミドラセマーゼの基質特異性の改変、日本農芸化学会2010年度大会、
2010.3.28 東京都目黒区

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米田 英伸 (KOMEDA HIDENOBU)

富山県立大学・工学部生物工学科・准教授

研究者番号：50285160