

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25年 5月22日現在

機関番号：32604

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22603013

研究課題名（和文） 任意配列オリゴペプチド合成を目指した新規ポリアミノ酸合成酵素の機能解析

研究課題名（英文） Funactional Analysis of a novel poly-amino acid synthesizing enzyme for synthesis of a desired oligopeptide.

研究代表者

石井 義孝（ISHII YOSHITAKA）

大妻女子大学・社会情報学部・准教授

研究者番号：70339688

研究成果の概要（和文）：(200字程度)

ペプチドは近年注目を集めている機能性食品や医薬品原料として期待されている。本研究では、ポリアミノ酸合成酵素の機能解析を目指して、種々の新規なポリアミノ酸生産菌の取得とライブラリー化、ならびに合成機構に関する検討を行った。

色素排除を指標としたスクリーニングとMALDI-TOF MS解析により、新規な塩基性ポリアミノ酸生産菌を含む種々の生産菌を取得した。また、NRPS様配列の取得と発現解析を通してNRPS様遺伝子の解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

Recently, peptides are expected as materials of functional foods or medicine. In this research, we aim to analyze the poly-amino acid synthesizing enzymes and their synthesizing mechanisms, isolation and characterization of various new poly-amino acid producing microorganisms were performed. And then a gene encoding poly-amino acid synthesizing enzyme was characterized.

Through the screening with a charged dye and MALDI-TOF MS analysis, various new poly-amino acid producing microorganisms containing a new basic poly-amino acid producing microorganism were obtained. Moreover, a gene encoding NRPS-like enzyme was analyzed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：応用生物化学

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：微生物、酵素、NRPS、ポリアミノ酸、生体機能利用

1. 研究開始当初の背景

ペプチドは近年注目を集めている機能性食品や医薬品原料として期待されている有機素材である。例えば、ジペプチドでも血圧降下、抗潰瘍、鎮痛などといった様々な生理活性が明らかとなっている。ジペプチド以外にも、トリペプチド、 β -アミノ酸ジペプチド、ポリデブシペプチドやポリアミノ酸といったペプチドに抗菌活性、抗ガン活性など多様な生理活性が報告されはじめている。しかし、生理活性が報告されているペプチドの多くは 10 残基以上のオリゴペプチドであり、効率的な任意配列オリゴペプチド合成プロセスが求められている。有機合成法では、アミノ酸の官能基の保護・脱保護という煩雑さを伴い、キラリティーのコントロールが困難である。また、酵素法では、キラリティーの高い合成が可能となるが、ペプチダーゼなど分解酵素の逆反応を利用する従来の方法では、官能基の保護が必要であり、また近年開発されたエステラーゼの転移反応系においても原料として高価な D-アミノ酸や非天然型アミノ酸のエステル体が必要であるなど、依然として効率やコスト面で問題がある。一方、微生物では、納豆の糸の主成分である Poly- γ -glutamic acid (PGA, 平均分子量 2,000,000) に代表されるように、極めて長鎖のペプチドがリボソーム翻訳系を介さずに効率良く合成している。

リボソーム翻訳系を介さずにペプチドを合成する代表例として、ペプチド系抗生物質の合成によく見られる非リボソーム型ペプチド合成酵素 (NRPS, non-ribosomal peptide synthetase) があり、任意配列ペプチドの合成に向けて盛んに研究が行われているが、一般に NRPS はその分子量が大きくペプチド生産と言う観点では取扱が容易ではない。一方、PGA に代表されるポリアミノ酸には、食品添加物に利用されている ϵ -Poly-L-lysine (ePL) や窒素貯蔵物質と考えられている Cyanophycin (multi-L-arginyl-poly (L-aspartic acid)) があり、その合成機構が近年明らかとなりつつある。最新の報告では、ePL は分子量の小さい繰り返し型の NRPS (Hamano et al, *Nat. Chem. Biol.*, 4, 766-772 (2008))、PGA と Cyanophycin はアミドリガーゼであることが報告され (Ashiuchi et al, *Biochem Biophys Res Commun.*, 263, 6-12 (1999))、リボソーム翻訳系を介さずにペプチドを合成する分子量の小さい酵素として、その応用研究が盛んに行われている。

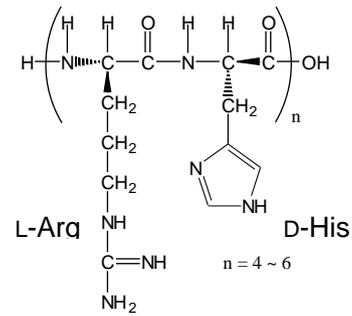


図 1 PRH の構造

他方、近年 ePL 生産菌の中から新規な塩基性ポリアミノ酸である Poly(L-arginyl-D-histidine) (PRH) を生産する子囊菌 *Verticillium kibiense* E18 株が報告された (Nishikawa et al, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48, 229-235 (2004))。PRH は生理活性を有し、 α -ペプチド結合により L 体と D 体のアミノ酸が交互に繰り返すポリアミノ酸で、その重合度の幅が 4 ~ 6 という狭いという構造的な特長を有する (図 1 参照)。これまで盛んに研究されてきた PGA や ePL は、それぞれ γ -ペプチド結合、 ϵ -ペプチド結合であるとともに、重合度に幅があり、生理活性を有する任意配列オリゴペプチド合成には不向きである。したがって、 α -ペプチド結合を有する PRH の合成酵素は、任意配列オリゴペプチド合成に好適な研究対象である。しかしながら、PRH 合成機構については全く報告がない。したがって、PRH 合成機構の解明は生理活性を有する任意配列オリゴペプチド合成への途を拓く意義のある研究である。

2. 研究の目的

本研究では、任意配列オリゴペプチドの合成を可能とする生体触媒の開発を最終目標に、その要素技術となりえるポリアミノ酸合成酵素の機能解析を目指して、その第 1 段階である種々の新規なポリアミノ酸生産菌の取得とライブラリー化、ならびに合成機構に関する知見を得ることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 新規ポリアミノ酸生産菌のスクリーニング

微生物の二次代謝産物の生産を促進するため、スクリーニングにはグルコース、リン酸ナトリウム、硫酸、微量金属塩を成分とする最少培地である BSM 培地を使用することとし、1.5% の Bacto Agar を加えた BSM 固体培地に、0.002% の methylene blue を添加した培地 (塩基性ポリアミノ酸選択用) および 0.02% の Poly R-478 を添加した培地 (酸性ポリアミノ酸選択用) を使用した。

土壌試料を生理食塩水で懸濁後、10 分程度

静置し、上清の一部をスクリーニング用の固体培地に塗布した。ハロを形成したコロニーを単離し、再度スクリーニング用固体培地で評価を行い、色素排除あるいは色素濃縮を示したコロニーを候補株として選定した。

(2) ポリアミノ酸の分析

得られた候補株を液体培養し、培養液に分泌された生成物を分析した。培養液を固相抽出カラム Sep-pak CM にて精製した後、HPLC にて分析を行った。HPLC 分析条件は既報に従った (Biochem. Eng. J., 42, p270, 2008)。

また、分子量の測定には、マトリックスとして CHCA あるいは DHB を使用して MALDI-TOF MS 分析により行った。

(3) NRPS 様遺伝子の取得

NRPS 様遺伝子の取得には、NRPS の A ドメイン保存配列情報を基にして行った。NRPS の A ドメインの保存配列のうち、フォワード側として A2、A3、および A4 領域を、リバース側として A5 および A8 領域の配列情報を基にした縮重プライマーを用いた PCR により、A ドメインの部分断片を取得した。取得した部分断片の塩基配列情報を基に、プライマーウォーキング法や RACE 法を利用して NRPS の周辺領域の塩基配列の決定および解析を行った。

4. 研究成果

(1) 新規ポリアミノ酸生産菌の取得とライブラリー化

本研究では塩基性色素を利用した塩基性および酸性ポリアミノ酸生産菌のスクリーニングを行った。塩基性色素であるメチレンブルーを利用して、1063 の土壌サンプルから 622 種類のハロ形成菌を得た。ハロ形成菌の内、色素を排除する排除ハロ形成菌 30 種類および色素を濃縮する濃縮ハロ形成菌 11 種類を取得した。

排除ハロ形成菌を液体培養して、固相抽出を用いた生成物の濃縮精製物の分析を HPLC と MALDI-TOF MS により行った。排除ハロ形成菌のうち、262 株、397 株、449 株、ALC-1 株、ALH-1 株、APG-2 株、BBC-1 株、BEE-1 株で特異的なピークが MALDI-TOF MS 分析で確認された。これらの株には繰り返し構造を持つピークはなく、ペプチド性物質を含む何らかの塩基性物質を産生しているものと考えられる。一方、352 株、367 株、428 株、および 448 株では分子量約 128 の繰り返し構造をもつピークを MALDI-TOF MS 分析で確認し、リジンの繰り返し構造を有するポリアミノ酸と推定した。同様に、CEB-1 株では分子量約 137 と 156 が交互に繰り返す構造を持つピークを MALDI-TOF MS 分析で確認し、ヒスチジンとアルギニンが交互に繰り返す構

造を有するポリアミノ酸と推定した。BKE-1 株では分子量約 114 の繰り返し構造を持つピークを MALDI-TOF MS 分析で確認し、タンパク質性の 20 種のアミノ酸には該当するものがなく、オルニチンの繰り返し構造を有するポリアミノ酸と推定した。以上の結果から、6 株において、塩基性ポリアミノ酸の生産の可能性が示唆された。

一方、濃縮ハロ形成菌の生成物については、培養液そのものの分析を行った。ASB-1 株、BAB-1 株、TJ-G-1 株、TJ-G-4 株、YG-f-オ-1 株の培養液で繰り返し構造をもつピークが MALDI-TOF MS 分析によって確認した。ASB-1 株では分子量約 163 の繰り返し構造を持つ化合物が、BAB-1 株、TJ-G-1 株、TJ-G-4 株、YG-f-オ-1 株では約 142 の繰り返し構造を持つ化合物の存在を確認した。分子量 142 および 163 の繰り返し構造に相当するタンパク質性の 20 種のアミノ酸には該当するアミノ酸がなく、微生物由来の酸性ポリマーであるポリヒドロキシアルカン酸などにも既報の分子量の繰り返しに相当する化合物がないことから、精製条件を検討して、再度検討を行う必要があると考えられる。

以上の結果から、既知のポリリジンの他、種々の塩基性ポリアミノ酸および酸性ポリマーを生産する新規ポリアミノ酸生産菌のライブラリーを構築した。

(2) 新規ポリアミノ酸の構造解析

塩基性ポリアミノ酸生産菌として取得した 6 株の生成物について、生成物の濃縮・精製物の MALDI-TOF MS 分析および生成物の濃縮・精製物の加水分解物の ESI MS 分析、HPLC 分析、TLC 分析、IR 分析を行った。

428 株の生成物は、MALDI-TOF MS 分析の結果から、鎖長を n とすると分子量が $128 \times n + 18$ で表され、既知のポリリジンと同様の構造を有すると考えられる。鎖長 n は 23 ~ 33mer であり、*Streptomyces albulus* 由来の ϵ -ポリリジンとほぼ同じ鎖長であった。

352 株および 367 株の生成物は、分子量が $128 \times n + 30$ (~35) で表され、何かにポリリジン単位が付加しているもの、あるいはポリリジンの末端が修飾されたものと考えられる。

448 株の生成物は、分子量が $128 \times n + 122$ (~124) で表され、何らかの化合物にポリリジン単位が付加しているもの、あるいはポリリジンの末端が修飾されたものと考えられる。また、繰り返し単位ではない部分の分子量が大きいことから、*Streptomyces albulus* 由来の抗生物質ストレプトリジンの様に、 β -リジンの繰り返し構造に環状構造が付加した化合物とも考えられる。

CEB-1 株の生成物は、MALDI-TOF MS 分析の結果から分子量が $(137 + 156) \times n + 18$ で表され (図 2 参照)、TLC 分析および HPLC 分析

の結果からヒスチジンとアルギニンが交互に繰り返す構造を有すると推定された。エドマン分解によるペプチド配列解析を行った結果、予想の通り D-ヒスチジンと L-アルギニンが交互に連結していることが明らかとなり、また、N 末端アミノ酸は D-ヒスチジンであった。既報の *Verticillium kibiense* E18 株の生産する PRH はアルギニンを N 末端とし、アルギニルヒスチジンジペプチドの単位で鎖長の分布が見られる。しかし、CEB-1 株の生産するポリアミノ酸は構成アミノ酸については既報の PRH とほぼ同様の組成だったものの、当該 PRH 様物質はアミノ酸単位で合成されていることがその構造から示唆されており、ジペプチド単位で合成されている既報の PRH 生産菌の E18 株とは異なる生合成機構が関与していることが示唆される。また、本生産菌では、既報の PRH 生産菌の E18 株とは異なりポリリジンの併産は観察されなかった。

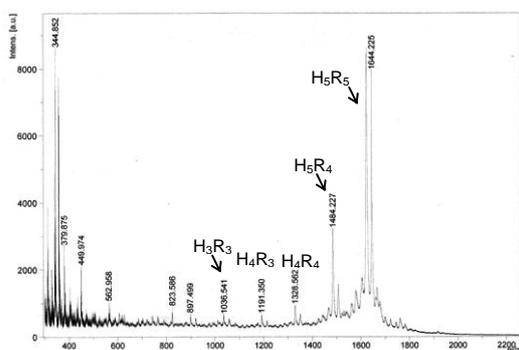


図 2 CEB-1 株の生成物の分子量解析

BKE-1 株の生成物は、MALDI-TOF MS 分析の結果から分子量が $(114 \times n + 111)$ で表され (図 3 参照)、生成物の濃縮・精製物の加水分解産物の TLC 分析、HPLC 分析および ESI MS 分析の結果からオルニチンを繰り返し構造に有していた。

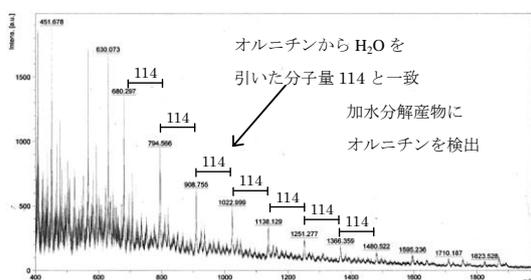


図 3 BKE-1 株の生成物の分子量解析

L-オルニチンはその構造にアミノ基が 2 つあるため、ペプチド結合を α 位と δ 位ととることができる。生成物がそのどちらで結合しているかを同定した。アミノ基を 2,4-ジニトロ

フルオロベンゼン(DNFB)によってジニトロフェニル基(DNP 基)化した。DNP 基化した生成物を加水分解して、標品の α -DNP-L-オルニチン、 δ -DNP-L-オルニチン、 α,δ -bis-DNP-L-オルニチンを指標として HPLC 分析により決定した。生成物の加水分解物は、 α -DNP-L-オルニチンと同じ保持時間のピークを確認した。よって生成物の L-オルニチンの結合様式は δ 位であると示唆され、推定構造式は図 4 と考えられる。

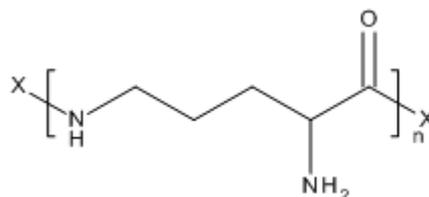


図 4 BKE-1 株の生成物の推定構造式

(3) ポリアミノ酸合成酵素遺伝子の解析

新規ポリアミノ酸生産菌の取得およびライブラリー化と並行して、既知の PRH 生産菌 *Verticillium kibiense* E18 株の PRH 合成酵素遺伝子の解析を行った。

PRH の構造から NRPS により合成されると予測し、NRPS の A ドメインの保存領域配列情報を利用して、PCR による NRPS の A ドメイン断片を取得した。種々のプライマーの組み合わせで PCR を行い、145 個の断片について塩基配列を決定した。取得断片の塩基配列に対して Blast 解析を行ったところ、NRPS と相同性を示した断片は 87 個、このうち重複する配列を除き 27 種類の A ドメイン保存配列を含む断片を取得した。さらに、A ドメイン保存配列を含む断片の基質特異性を解析ソフトにより予測したところ、NR1、NR130、NR176、NR186 の 4 つが L-Arg を認識していると考えられた。

得られた NRPS 断片から、PRH 合成酵素の候補を絞るため、生産条件と非生産条件での RT-PCR による発現解析を行った。生産条件では SG 培地、非生産条件である PD 培地を用いて、5 日間振とう培養した。各条件で培養したものから、Total RNA を抽出し、逆転写反応によって得られた cDNA をテンプレートとして配列特異的なプライマーを用いて全 NRPS 断片の RT-PCR を行った。また、各遺伝子の推定アミノ酸配列から、CLUSTAL W を用いて系統樹を作成した。系統樹は配列の長さによって差が出てしまうことを考慮して、保存配列を除いて長さに合わせた。図 5 に示したように、SG 培地では 23 種類の遺伝子の発現を確認することが出来たのに対し、PD 培地では 9 種類の遺伝子の発現しか確認することが出来なかった。

系統樹上で近接しているモジュールで発現状況にも相関性のある遺伝子断片同士は、

同一 NRPS 上の近接するモジュールのドメインである可能性を考慮し、各遺伝子同士でゲノムをテンプレートとした PCR を行い、各遺伝子断片の近接関係を解析した。図 5 に示すように、系統樹で近接する遺伝子断片は、ゲノム上でも近接した位置に存在し、同一 NRPS のモジュールと考えられた。また、その方向も決定出来たので、→によってその方向 (5' → 3') を表す。緑で示したものは増幅断片が確認されたもの (隣接している)、灰色で示したものは増幅断片が確認できなかったものである。

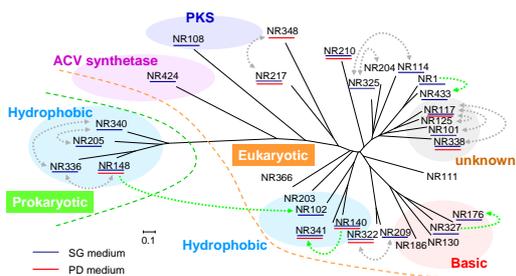


図 5 取得 NRPS 断片の発現解析

基質特異性予測から L-Arg を認識していると推定された 4 つの断片のうち、PRH 生産条件で発現の確認された NR1 と NR176 について、隣接断片の情報、3'-RACE、5'-RACE、およびインバース PCR を用いて、周辺領域の遺伝子配列を決定した。NR1 の周辺領域の解析の結果、NR1 を含む遺伝子は C ドメインが 3 つあることから 3 モジュール以上の NRPS であることが分かり、なおかつその中で E ドメインが 2 つ確認された。このことから現在取得している A ドメインがあるモジュールをモジュール 2 とすると、モジュール 2 は D-Arg を合成していることになる。仮にこのモジュール 2 が D-His を合成していたとしても、上流のモジュール 1 でも何らかの D-アミノ酸を合成していること可能性が高いので、NR1 断片を含む遺伝子は PRH 合成酵素ではないと判断した。

NR176 では UTR 配列を含めて 11.8 kb の領域を取得し、10.3 kb の ORF と、その推定アミノ酸からモジュール構造が明らかとなった。また、NR176 の C ドメインを A ドメインの間にイントロンの存在を確認した (図 6 参照)。NR176 の上流には NR327 があり、さらにその上流にはもうひとつのモジュールが存在した。まず、NR327 では基質特異性は Glu を認識すると予測していたが、改めて基質認識部位を比較してみると、塩基性のアミノ酸を認識することが可能ではないかという結論に至った。また、モジュールの一番目には、A ドメインと相同性を示しつつも、前半部分のアミノ基を認識する部位で D が A になっており、さらに本来あるはずの後半の

保存領域を欠失しているドメインが存在した。これを A*ドメインと命名した。

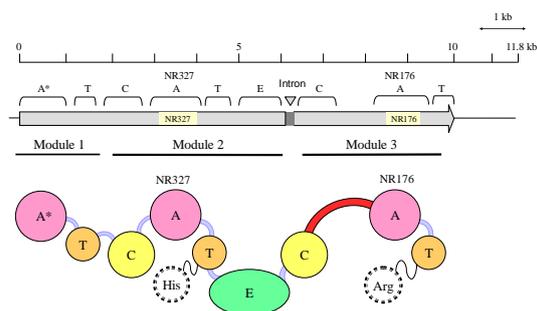


図 6 NR176 を含む NRPS 遺伝子

A*ドメインの機能は未知であるが、下流の A ドメインの基質認識部位や全体のモジュール構造から、本 NRPS 遺伝子は PRH 合成酵素遺伝子である可能性が非常に高いと判断した。しかしながら、本研究では、破壊株の作製や大腸菌などの異種微生物での発現による活性の確認ができておらず、今後これらの検討が必要である。

ポリリジン合成酵素では、ペプチドの伸長反応はタンデムな新規 C ドメイン様ドメインがその反応を担っていると推定されている。そこで、本酵素でも図 7 のような機構を推定した。

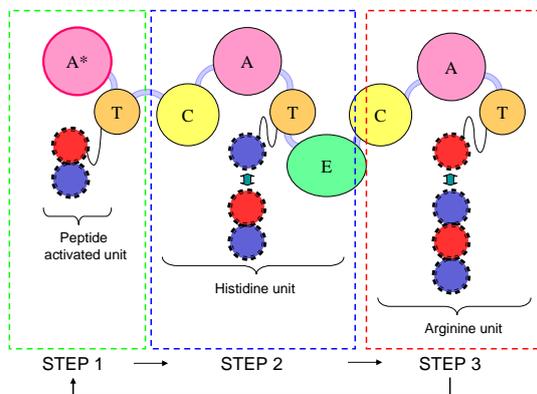


図 7 推定合成機構

A*ドメインは、A ドメイン様の構造を持つため、おそらく何らかの基質を活性化するドメインであると考えられる。しかし、アミノ酸は基質としないと考えられ、その代わりにペプチドを活性化するドメインではないかと推測した。これは、立体構造予測から、A*ドメインの基質ポケットが通常の A ドメインと比較して広いことから推測した。また、そうすることで、繰り返し伸長反応を行うことができ、本酵素の構造と PRH の構造がうまく説明できる。また、鎖長は A*ドメインの基質ポケットの大きさに依存していると考

えられる。

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)

〔学会発表〕(計3件)

① 青柳大介、石井義孝、内海尚子、西川正信、木野邦器、*Verticillium kibiense* E18株由来 NRPS 様遺伝子の網羅的な発現解析、第64回酵素工学研究会

② 青柳大介、石井義孝、内海尚子、西川正信、木野邦器、*Verticillium kibiense* E18株由来 NRPS 様遺伝子の解析、日本農芸化学会2011年度大会

③ 青柳大介、芝原弘樹、内海尚子、石井義孝、木野邦器、新規塩基性ポリアミノ酸の探索、日本農芸化学会2013年度大会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 義孝 (ISHII YOSHITAKA)

大妻女子大学・社会情報学部・准教授

研究者番号：70339688

(2) 研究分担者

木野 邦器 (KINO KUNIKI)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：60318764