

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780103

研究課題名(和文) セリンアミノペプチダーゼを基盤とした新たな生体触媒の創出

研究課題名(英文) Construction of novel bio-catalyst based on serine-aminopeptidase

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) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：ペプチドは新たな生理活性物質の魅力的なプラットフォームである。本研究では、副反応としてペプチド結合形成反応を触媒するペプチド分解酵素を基盤に、ペプチドライブラリーの構築と、様々な物質合成が可能な酵素触媒の創製を試みた。副反応を示す3種のペプチド分解酵素を対象に、ペプチドライブラリー構築の材料に使用できる化合物(基質)を網羅的に決定し、約900種類の酵素反応ライブラリーを構築した。一方で、上記酵素の機能に中心的な働きをする部位(活性中心)の構造を遺伝子工学的に変換した結果、1つの酵素で、基質の選択性に顕著な変化が見られた。

研究成果の概要(英文)：Peptides are attractive for novel biologically active substances. In this study, we attempted construction of a peptide library by chemo-enzymatic synthesis along with generation of bio-catalyst for synthesis of various peptides based on peptidases that catalyze peptide bond formation reaction as a side reaction. We exhaustively selected materials (substrates) for construction of peptide library using peptidases that exhibit peptide bond formation activity. By using the information, we constructed 900 kinds of enzyme reaction mixture library using the reaction of above enzymes. In addition, we found that the change in structure of active site of above enzymes by genetic engineering techniques exhibited increase of effectiveness for peptide bond formation.

研究分野：農学

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 ペプチダーゼ アミノリシス ジペプチド 変異解析

1. 研究開始当初の背景

(1) 酵素の誤作動反応「アミノリシス」

生体内では、酵素は本来の機能を発揮するのは当たり前である。しかしその条件から少し外れた場合、ときに本来の機能から外れた特異な触媒能を発揮することがある。その条件とは pH や濃度など様々であるが、その特質を熟知していれば触媒能を調節することは可能である。

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る。生体内における本来の機能は加水分解であるが、活性中心にセリンを有するペプチダーゼは、加水分解と拮抗して起こる副反応“アミノリシス”を触媒する。これは、加水分解の水の代わりにアミンが求核し、ペプチド結合が形成されるといった比較的単純な反応である(図1)。

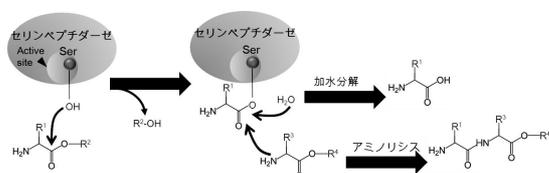


図1. セリンペプチダーゼを触媒としたアミノリシスと加水分解の反応過程

(2) アミノリシス反応の高汎用物質合成と新奇物質探索研究への応用 アミノリシス反応は、加水分解の逆反応とは異なり、化合物同士の縮合反応を 1-pot/1-step で行うことが可能である。従って、より簡便性に優れ、ホワイトバイオテクノロジーに視点を置いた物質合成への利用展開が見込まれる。また、異なる化合物同士が縮合した物質が生成物として生じるため、加水分解とは比較にならないほど、反応生成物に多様性をもたらす。酵素反応であることから、反応液は基本的に水溶液であるため、酵素反応液を直接生理機能アッセイに供することが可能であり、この性質はよりスループット性の高い機能物質探索・創製研究における新たな手法の提案に繋がる。しかし、酵素反応による網羅的な物質合成と、そこから見つけられる生理機能物質に係る研究は、これまでに行われていない。現在盛んな機能探索研究でも、上記手法のような、新たな知恵を導入することにより、これまではない展開を導くことが可能であると期待している。

2. 研究の目的

(1) 機能探索研究における新たなプラットフォームの創出 ペプチドは言わずとも知れる新奇な生理活性物質の魅力的なプラットフォームである。特に、20種類のアミノ酸からなるペプチドは、その供給も行き渡り生理活性も網羅されてきている。しかし非天

然アミノ酸や特殊アミノ酸が含まれるもの、ジケトピペラジン類、様々なアミン類と結合したアミノ酸などのペプチド類縁体の機能は、網羅的な簡易合成法が提供されていない現状では未開拓のままである。従って、セリンペプチダーゼの触媒により特異な構造を持つペプチド類の合成が可能となれば、酵素合成を手法とし、非天然や特殊構造を有する物質の機能探索や創成研究における新たなプラットフォームの創製に繋がる。我々は既に3種のアミノリシス活性を示すセリンペプチダーゼ (family S9, S12, P1 peptidase) を取得しており、その機能を利用していくつかの既知生理機能ペプチド類の合成を行ってきた。本研究では、上記のような新たな手法の提案に向け、所有する3種のセリンペプチダーゼの反応で作成される生成物の網羅的解析と、その機能を利用したペプチドライブラリー構築への応用可能性評価を第一の目的とした。

(2) 機能探索研究への応用に向けた、高汎用に使用できる新奇生体触媒の創出

一方で、酵素は生体物質であり、生きていくために必要な能力を、進化の過程で精査されてきた経緯を持つ。その能力とは主に特有の基質特異性となるが、応用の観点からは、支店の角度によっては、特有の基質特異性がプラスにもマイナスにもなり得る。特に網羅的な物質合成と機能探索という視点からは、特徴的な基質特異性は、対象物質の幅を狭める原因となる。そのような背景も踏まえ、本課題では酵素の基質特異性の拡大に視点を置き、所有する3種のセリンペプチダーゼの変異解析や遺伝子工学的手法による機能改変を介した高汎用に利用できる酵素触媒の分子デザインも同時に行った。

3. 研究の方法

(1) アシル受容体の網羅的解析 既に3種のアミノリシス反応を触媒出来る酵素、family S9, S12, P1 peptidase の発現系は構築されている。アシル受容体の網羅的解析では、組換え酵素の精製品を使用し、様々な化合物をアシル受容体として使用し、アミノリシス活性を評価した。アシル受容体の評価では、アシル供与体としては 20 mM のアミノ酸誘導体 (family S9 : L-Tyr-NH₂, family S12 : D-Phe-OMe, family P1 : -Ala-pNA) を使用し、酵素反応は 4 で行った。反応後のサンプルについては ESI-TOF-MS で生成された化合物を同定・定量した。

(2) family S12 peptidase を使用した酵素反応ライブラリーの構築 アシル受容体の網羅的解析のデータを基に、様々なアシル受容体 (200 mM) とアシル供与体 (20 mM) を組み合わせた 900 種類の反応液を作成した。続いてランダムに反応ポットを選択し、

UPLC-ESI-TOF MS を使用して酵素反応区と未反応区に存在する分子の分子質量を測定することで、反応液中の生成物を同定した。

(3) family P1 peptidase の活性中心の変異と機能解析 Quick Change Mutagenesis の手法を応用することで、family P1 peptidase において、活性中心 Ser 残基を Cys に置換した。得られた変異酵素について、ペプチド結合形成反応を、-Ala-pNA と様々な基質を使用して評価し、野生型酵素と比較を行った。

(4) family S9 peptidase の酸化による特異性変化 family S9 peptidase の酸化は、1~5%の過酸化水素で数時間暴露することで行った。酸化領域の決定は、酸化された酵素と酸化されていない酵素をトリプシンで消化し、MALDI-TOF MS 解析を行った後、酸化されることで消失するピークの分子質量から、領域を特定した。また、活性中心 Ser 残基や、推定酸化領域内の酸化されやすい残基をピックアップし、Quick Change Mutagenesis の手法を応用することで、Cys や Ala 置換した。変異酵素については、基質特異性やアミノリシス反応の効率を野生型酵素と比較した。

4. 研究成果

(1) アシル受容体の網羅的解析 family S9, S12, P1 peptidase のアシル受容体網羅的解析の結果、family S9 では、アシル受容体として利用出来る化合物は疎水及び塩基性アミノ酸誘導体にとどまった。一方で、family S12 と P1 の AP ではアミノ酸エステルに加え、単体のアミノ酸、アルキルアミン、アミノアルコール類もアシル受容体として認識した(表1)。

表 1. 各ペプチダーゼのアシル受容体基質となり得る化合物の網羅的解析。表中の数字は、本実験で明らかとなったアシル受容体となり得る化合物の数。

アシル受容体 基質	Peptidases		
	Family S9	Family S12	Family P1
α-L-アミノ酸	0	19	4
α-D-アミノ酸	0	0	0
その他アミノ酸	0	1	0
α-L-アミノ酸エステル	14	32	32
α-D-アミノ酸エステル	15	17	11
α-L-アミノ酸アミド	3	3	4
その他アミノ酸誘導体	0	3	3
ジ・トリペプチド	0	21	3
アルキルアミン	0	12	3
アミノアルコール	0	11	2
その他アミン類	0	3	2

アシル受容体に対する特異性が最も広い family S12 peptidase において、各アシル受容体を使用したときの、アシル供与体から生成物への変換率を計測した結果、アシル受容体によってアミノリシス生成物の効率は大きく異なり、特に側鎖に芳香環を持つ L-アミノ酸誘導体は効率が良く(80~95%)、それ以外のアミノ酸誘導体においても、反応時間を延ばし、酵素濃度を上げることで、アミノリシス反応効率が上昇した。

(2) family S12 peptidase を使用した酵素反応ライブラリーの構築 アシル受容体の網羅的解析のデータを基に、様々なアシル受容体(約 100 種類)とアシル供与体(9 種類)の組合せの元 900 種類の反応液を作成した。生成物を UPLC-ESI-TOF MS で確認した結果、一部を除きほとんどの反応ポットで生成物が確認された。また、D-プロリンエステルをアシル供与体として利用した反応液からは、ジケトピペラジンの精製が確認され、芳香族 D-アミノ酸エステルをアシル供与体としたときの反応液からは、トリペプチドの合成が見られたポットも存在した。更には、アシル受容体として L-アミノ酸誘導体を使用した反応ポットからは、L-アミノ酸同士のペプチドも観察された。

(3) family P1 peptidase の活性中心の変異と機能解析 family P1 peptidase の活性中心 Ser 残基を Cys に置換し、-Ala-pNA を基質としたときのペプチド結合形成反応を野生型酵素と比較を行ったところ、顕著なアミノリシス活性の改変が見られた。特に野生型酵素では、生成物として得られたペプチドは即座に加水分解されることに対し、変異酵素ではペプチド結合形成反応は観察されるが、加水分解は全く観察されなかった。これは活性中心の変異によりアシル受容体としての水の認識が、大きく変化した結果であると考えられる。野生型酵素と変異酵素の触媒反応スキームを、図 2 に示す。

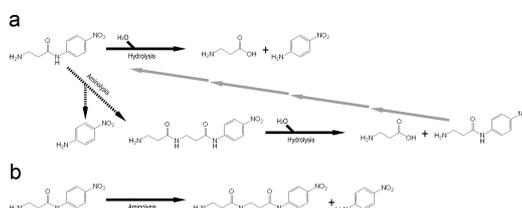


図 2. 野生型 family P1 peptidase とその活性中心 Ser を Cys に置換した変異酵素における、-Ala-pNA に対する触媒反応スキーム。(a)野生型酵素の触媒反応。アミノリシス反応と加水分解反応が混在する。(b)変異酵素の反応。アミノリシス反応のみ触媒する。

上記検討に加え、各アミン類に対するアシル受容体としての認識について、野生型酵素と変異酵素を比較したところ、水分子のみに

らず他の化合物においても、顕著な特異性の改変が見られた。特に野生型酵素では、シスタミンをアシル受容体として認識する性質を持っており、-Ala-pNA と反応することで、-Ala-シスタミンを生成する。このシスタミン認識は、活性中心の変異により失われ、-Ala-シスタミンの生成は確認されなかった。一方で、変異酵素においては、野生型酵素では認識されないシステアミンをアシル受容体として認識するようになり、野生型酵素では合成し得ない -Ala-システアミンの生成が確認された (図 3)。

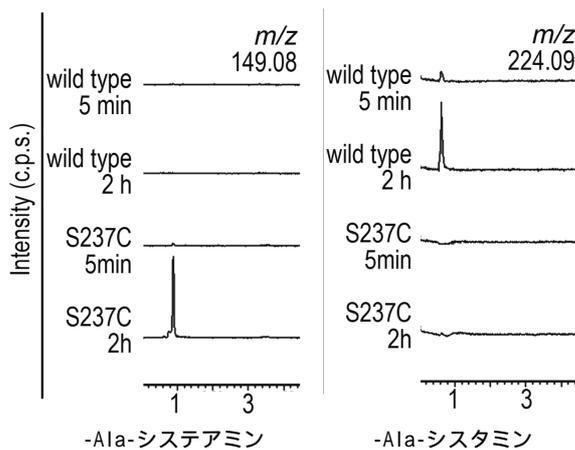


図 3. 野生型 family P1 peptidase とその活性中心 Ser を Cys に置換した変異酵素における、シスタミン及びシステアミンに対するアシル受容体としての認識。左のパネル: -Ala-システアミンの合成。変異酵素にのみ生成物のピークが確認された。右のパネル: -Ala-シスタミンの合成。野生型酵素にのみ生成物のピークが確認された。S237C: 変異酵素。各クロマトグラムの横軸は時間 (分)

(4) family S9 peptidase の酸化による特異性変化 family S9 peptidase を少量の過酸化水素で数時間暴露して酸化処理を行うと、特異性の変化が確認された。具体的には、5%過酸化水素で 1 時間処理すると、L-Phe-pNA に対する活性は保持するが、顕著に L-Leu-pNA に対する活性が失われた (図 4)。1,8-anilino naphthalene sulfonate を使用した高次構造変化の検討から、この現象は、酸化により大きく立体構造が崩されることに、要因を発していないことも確認された (図 4)。続いて、酸化処理後の酵素のトリプシン分解及び MALDI-TOF MS 解析を行い、酸化される領域を推定した。その結果、酵素の中間に存在する基質取り込みに寄与する領域が同定された (図 5)。この領域のうち、酸化されやすい Trp や Met を Ala に置換し、各基質に対する特異性を調べた結果、Met 残基を Ala に置換すると、特異性において酸化と同じ効果が得られた (図 6)。

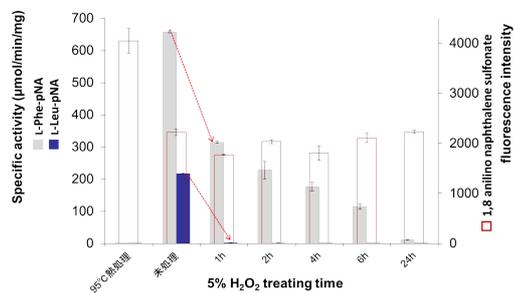


図 4. 野生型 family S9 peptidase の酸化による特異性変化。グレーのバー: L-Phe-pNA に対する比活性。ブルーのバー: L-Leu-pNA に対する比活性。赤枠のバー: 1,8-anilino naphthalene sulfonate を添加後の蛍光強度。構造を大きく崩すと、蛍光強度が上昇する。

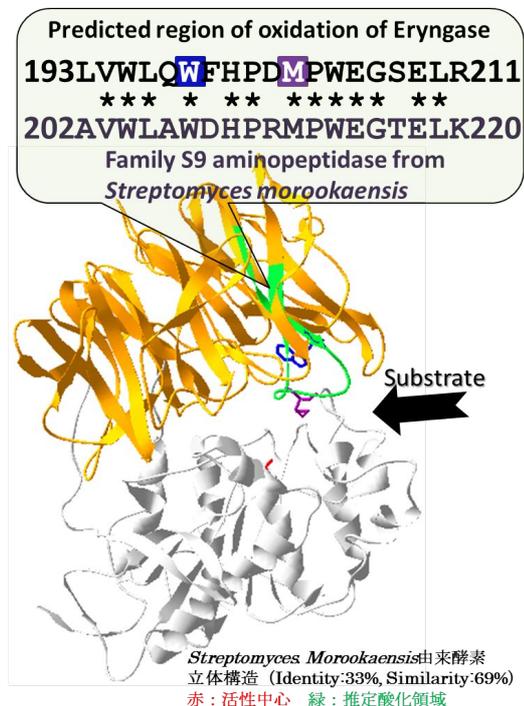


図 5. MALDI-TOF MS 解析と類似酵素との比較から同定された、推定酸化領域 (グリーン)。図の上部に推定酸化領域のアミノ酸配列を示した。

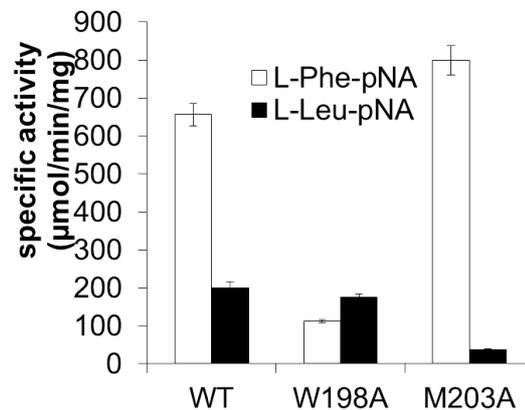


図 6. 推定酸化領域に存在する酸化されやすい残基の Ala 置換における、特異性への影響。W198A, M203A: 変異酵素。

Family S9 peptidase においても、family P1 と同様、活性中心の Ser 残基を Cys に置換し、アミノリシス活性への影響を確認した。その結果、加水分解活性は完全に失われたが、アミノリシス活性の効率も大幅に減少した。本実験結果は、family S9 peptidase の機能を大きく損なわせる結果となったが、今後はアミノリシス活性の効率向上に向けた変異酵素作成を行っていくと共に、酸化領域の変異を組み合わせ、特異性が異なる多くの生体触媒の創製に期待がかかる。

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)

[雑誌論文](計 3 件)

J. Arima*, S. Tokai, M. Chiba, T. Ichyanagi, Y. Yabuta, N. Mori and T. Aimi: Gene cloning and biochemical characterization of eryngase, a serine aminopeptidase of *Pleurotus eryngii* belonging to the family S9 peptidases. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (査読有), accepted (2014.05.26)

J. Arima*, A. tanaka, M. Morimoto, and N. Mori: Mutation of active site serine residue with cysteine displays change in acyl-acceptor preference of beta-peptidyl aminopeptidase from *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (査読有), 98(2014), 1631-1640.

J. Arima*, Y. Isoda, T. Hatanaka, and N. Mori: Recombinant production and characterization of an N-acyl-D-amino acid amidohydrolase from *Streptomyces* sp. 64E6. *World J. Microbiol. Biotechnol.* (査読有), 29(2013), 899-906.

[学会発表](計 7 件)

恒原由佳、磯田佳孝、田村丹、森 信寛、有馬二朗：機能物質探索ツールとしての D-アミノペプチダーゼ：反応の効率化と生成物の網羅的解析 2014 年度日本農芸化学会全国大会 2014.3.27-30 明治大学(神奈川)

東海彰太、森 信寛、有馬二朗：エリンギ由来セリンペプチダーゼ：特定の残基の酸化と変異が基質特異性を変える 2014 年度日本農芸化学会全国大会 2014.3.27-30 明治大学(神奈川)

太田朱香、森信寛、有馬二朗：D 体特異的アミド加水分解酵素によるペプチド結合形成反応：基質認識に関わる残基 2014 年度日本農芸化学会中四国支部例会 2014.1.25 香川大学(香川)

東海彰太、森 信寛、有馬二朗：エリンギ由来セリンアミノペプチダーゼ “Eryngase”：酸化により引き起こされる基質特異性の変化 2013 年度日本生化学会全国大会 2013.9.18-20 広島国際会議場(広島)

有馬二朗、下根 可奈、森 信寛、日野 智也、永野 真吾：放線菌由来 D-アミノペプチダーゼ：立体構造からみたペプチド結合形成反応における基質認識 2013 年度日本蛋白質科学会全国大会 2013.6.12-14 とりぎん文化ホール(鳥取)

東海彰太、千葉真範、森信寛、有馬二朗：エリンギ由来セリンアミノペプチダーゼの一次構造解析と酵素化学的性質 2013 年度農芸化学会大会 2013.3.24-27 東北大学(仙台)

有馬二朗、田中あゆみ、森本正純、森信寛：Pseudomonas 由来 -peptidyl aminopeptidase の酵素特性評価 2013 年度農芸化学会大会 2013.3.24-27 東北大学(仙台)

[図書](計 1 件)

有馬二朗：菌類きのご遺伝資源 - 発掘と活用, 第3章3節 きのごに潜む新たな酵素の利用. 丸善プラネット(東京), pp.63-71. ISBN978-4-86345-156-8 C3045 (2013)

[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：
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