

アミノリシス触媒能を有するペプチダーゼを利用した 高汎用ジペプチド合成法の開発

鳥取大学農学部 有馬二郎



はじめに

ペプチダーゼ本来の触媒機能は、タンパク質やペプチド系化合物の加水分解であるが、「裏の機能」としてペプチド結合形成反応を触媒する酵素も存在する。特に活性中心が Ser や Cys 残基を持つペプチダーゼは、アミノ酸エステル等に対し、アミノリシスの触媒が観察される。この反応は加水分解と拮抗して起こり、水の代わりにアミノ基が求核するため、ペプチド結合が形成される (Figure 1)。アミノリシスは、有機溶媒中で起こるアミノ酸同士の脱水縮合とは異なり、水溶液中でも効率良く反応が進むため、酵素の有機溶媒耐性は必要ではなく、操作も容易である点の特徴としてあげられる。筆者らはアミノペプチダーゼ(AP)を対象とし、アミノリシスを触媒できる酵素の取得と、その機能を利用した簡易かつ高汎用なジペプチド合成法の確立を目指し研究を行っている。本講演では、AP による様々なジペプチドの合成と酵素機能改変について紹介する。

アミノリシス触媒能を有するアミノペプチダーゼ

AP はペプチドの N 末端を加水分解の基質として認識することから、ペプチド結合形成反応においても単純なアミノ酸やそのエステルを容易に基質として認識し、それがジペプチド類合成における AP の利点として捉えられている。そこで筆者らは、アミノリシス触媒能を有する AP に焦点を当てた。活性中心に Ser 残基を持つ AP は、MEROPS データベース上、family S9、S11、S12、S33、S51、S58 に属する酵素が知られている。筆者らは、土壌細菌を対象に上記酵素遺伝子の探索と、組換え酵素のペプチド結合形成能を評価することで、*Streptomyces thermocyaneoviolaceus* NBRC14271 由来 family S9 に属する AP (S9AP) 及び *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 由来の family S58 の AP を取得した。同時に、土壌細菌の培養菌体やキノコ子実体を対象に新奇酵素のスクリーニングも行い、*Streptomyces* sp. 82F2 由来 family S12 に属する AP や、エリンギ子実体からアミノリシス触媒能を有する酵素 (現在遺伝子を解析中) を単離した。

Family S9 に属する AP によるジペプチド合成と機能改変

放線菌由来の S9AP は、既にピューロマイシン不活化酵素としての報告があり、その機能はアミノヌクレオシドと p-メトキシ-Phe 間のペプチド結合部分を切断する。筆者らが取得した S9AP は、ピューロマイシンの分解に加え、数種のアミノ酸誘導体に対し、加水分解やアミノリシスの触媒が確認された。本酵素によるアミノリシスの特徴は、β-Ala や L-Pro を優先的にアシル供与体として利用し、アシル受容体としてはアミノ酸を含む幅広いアミン化合物を利用することが可能であった。更には、アシル受容体にアミノ酸エステルを利用したとき、非酵素的な環化反応も同時に起こり、ジケトピペラジン合成も確認された。本酵素機能は Carnosine (β-Ala-L-His) や抗高血糖ペプチドである cyclo(L-Pro-L-His) の合成に応用可能であった (変換率: 30 ~ 80%)^{1,2)}。

これまでに、Ser ペプチダーゼにおいて、活性中心を Cys に置換すると、アミノリシス反応を優先的に触媒出来るように機能が改変された例が報告されている³⁾。この詳細なメカニズムは不明であるが、この例を S9AP にも応用し、活性中心 Ser を Cys に置換した酵素 (S502C S9AP) が構築された。S502C S9AP は、Carnosine や cyclo(L-Pro-L-His) の合成活性は失われた半面、野生型では加水分解しか確認されなかった L-Phe 誘導体を基質としたとき、高いアミノリシス活性が観察された⁴⁾。更には、ピューロマイシンアミノヌクレオシドをアシル受容体として利用可能となり、様々なピューロマイシンアナログの合成が可能となった⁵⁾。

D-アミノ酸含有ジペプチド合成酵素：family S12 に属する AP

Family S12 に属する AP は、細胞壁構築に関与する酵素であると考えられており、筆者らが取得した酵素も D-アミノ酸誘導体に対し広く作用する。本酵素の性質として、弱酸性では加水分解のみを触媒し、アミノリシスは弱塩基性条件下にのみ観察された。また、ペプチドに対し殆ど加水分解活性を示さないため、アミノリシスで生じたジペプチドは決して加水分解されることはなかった。本酵素の最も大きな特徴は、立体選択的に DL-ペプチドを合成できる点であり、D-アミノ酸誘導体と L-アミノ酸誘導体を基質としたとき、前者をアシル供与体、後者をアシル受容体として利用し、生成物への変換率も非常に高いものであった (~97%)。S9AP と同様、アシル受容体としてアミノ酸エステルを利用したとき、非酵素的な環化反応も観察され、本酵素機能を利用することで、キチナーゼ阻害作用を持つ cyclo(D-Pro-L-Arg) の合成 (変換率：57%) に成功した。

本酵素は活性中心 Ser を Cys に置換すると、完全に触媒機能を失った。一方で、活性中心 Ser 残基から 5~8Å 以内にある残基の機能を解析したところ、193 番目の Asn 残基の置換により、アシル供与体の認識に大きな変化が見られた。その結果、野生型では殆ど合成が見られなかった D-Ser や D-His を含有するジペプチドにおいても、効率的な合成反応の触媒が確認された。

今後の展開

近年のペプチド機能研究から、優れた機能を持つジペプチド類が多数同定され、将来は非天然アミノ酸も含む様々な構造のジペプチドを対象に、生理機能研究が進められることも容易に予測できる。しかし多くの場合、発見→合成→応用の道筋は大きな障壁を有しており、簡易かつ高汎用なジペプチド類合成法の確立が望まれる。そこで本研究を通し、「機能性ジペプチドの発見」と「簡易かつ安全な合成」が直結した手法を提案出来ればと考えている。筆者らは、S9AP と family S12 に属する AP 以外にも *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 由来の family S58 に属する AP や、エリンギ子実体から単離された AP も所有し、これらによる Homo-carnosine や鎮痛ペプチドの Kyotorphin 合成にも成功した⁶⁾。現在は、更に多くのジペプチド類合成への可能性を広げるべく、新たな酵素の取得や上記酵素の基質の開拓や機能改変に向けた研究を行っている。今後は固定化酵素の作製とジペプチド類合成リアクターの構築を行うと同時に、新たな機能性物質創生研究への展開に向け、ジペプチド類ライブラリの作製と機能性ジペプチドの探索に試みていきたい。

参考文献

- 1) Arima *et al.*, J. Biotechnol., **147**, 52-58 (2010)
- 2) Arima *et al.*, Appl. Environment. Microbiol., **76**, 4109-4112 (2010)
- 3) Abrahmsen *et al.*, Biochemistry, **30**, 4151-4159 (1991)
- 4) Usuki *et al.*, Chem. Commun., **46**, 580-582 (2010)
- 5) Usuki *et al.*, Org. Biomol. Chem., **in press**
- 6) Arima *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol., **87**, 1791-1801 (2010)

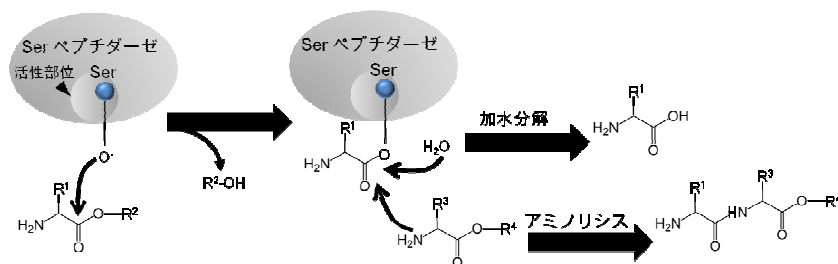


Figure 1. 加水分解と拮抗して起こるアミノリシス反応