

# 再生利用をめざした好熱菌が生産するコラーゲン分解系酵素群の研究

京都府立大学 大学院農学研究科 渡部 邦彦

## 1. はじめに

コラーゲンは、細胞外マトリックスとも呼ばれ、動物タンパク質の中で最も多い成分である。ポリペプチドの強固な3重らせん構造を取る上に、トリペプチド(Gly-Pro-X)の繰り返し配列を数多く持つことからペプチド結合開裂の効率が悪いプロリン、グリシン残基が全組成の半分を占めるため、コラーゲンは不水溶性かつ難分解性である。食品加工業などから大量に産業廃棄物として排出されるくず肉には、このコラーゲンが大量に含まれ、利用されることなくほとんどが焼却処分される。しかしコラーゲンおよびその分解物であるコラーゲンペプチドは、細胞接着、ガン浸潤、保湿、アルツハイマー病のβアミロイド形成など、重要な医学的・細胞生物学的事象に関連することから医薬、食品、化粧品への需要が近年急増している。現在もコラーゲンおよびコラーゲンペプチドが持つ新たな生理活性・機能の開拓や、高付加価値素材としての利用に期待が膨らんでいる。そこで、コラーゲンを産業廃棄物から有効に再生利用するため、コラーゲンに特異的に作用し、効率よくコラーゲンペプチドが調製できる安定なプロテアーゼ、ペプチダーゼが求められている。しかし動物のみならず微生物においても、コラーゲンを含む細胞外マトリックスタンパク質に特異的に作用するプロテアーゼはごく希で、この有望な酵素を生産する微生物菌株の取得・実用化は、極めて難しいのが現状である。

このニーズに応えるべく、我々はコラーゲンを積極的に分解する好熱性細菌を独自に単離し、それらが生産するコラーゲン分解系酵素群についての研究を行ってきた(1-3)。今回は、まずコラーゲン分解性好熱菌 *Geobacillus collagenovorans* MO-1 株が生産するコラーゲン分解性プロテアーゼを、2段階目としてコラーゲンのトリペプチド特異配列を認識し、コラーゲン分解ペプチドをさらに小さく分解する同菌株の2つの Pz ペプチダーゼ、そして3段階目としてプロリルペプチドを強力に加水分解する *Anuerinibacillus* 属細菌 AM-1 株のアミノペプチダーゼについて解説する。

## 2. *G. collagenovorans* MO-1 株が生産するコラーゲン分解性プロテアーゼについて

MO-1 株が生産するコラーゲン分解性プロテアーゼを培養上清から精製し、解析を行った(1)。このプロテアーゼは、分子量 210 kDa (105 kDaの2量体)という巨大酵素タンパク質で、60°C30分の処理に対し100%の活性を保持し、際立って高い耐熱性を有することを示した。加えて SDS-PAGE後のzymographyにおいても活性の回復が見られ、強い熱安定性、薬剤耐性をも示した。本酵素は、コラーゲンI型とIV型とゼラチンに高い活性を示したが、コラーゲン特異配列を持つペプチド合成基質にはほとんど作用せず、コラーゲン分子を不特定な箇所切断することを明らかにした。本酵素はCa<sup>2+</sup>を含み、阻害剤の調査からセリンプロテアーゼに属することを示した。しかしセリンプロテアーゼの中で、105 kDaの2量体という巨大分子量を持つものは極めて特殊であるのに対し、コラーゲナーゼは、動物から微生物に至るまで100 kDaを越える分子量を有するものが多い(2)。このように、セリンプロテアーゼに属するMO-1株由来の本酵素が、分子量的にはコラーゲナーゼに類似するちぐはぐな様相をもつことを示した。さらに本酵素の遺伝子単離とその構造解析を行った結果(4)、乳酸菌が生産する細胞膜結合型プロテイナーゼと、触媒ドメインに高い相同性を有しており、セリンプロテアーゼ系の酵素と同様な作用機作で加水分解を行うと推定された。さらに、アミノ酸20残基を14回繰り返す細胞表層アンカー様領域も見つかり、触媒領域とアンカー様領域の間にはコラーゲン結合性領域が含まれることも見出した。

### 3. *G. collagenovorans* MO-1 株が生産する2つのPzペプチダーゼについて

MO-1株は、分泌型のコラーゲン分解性プロテアーゼとは別に、コラーゲンを直接分解することはないが、コラーゲンに特異な配列を含む合成基質 Pz-PL↓GPRを分解するオリゴペプチダーゼ、Pzペプチダーゼを、2種類細胞内に生産する。これら2つをPzペプチダーゼA, Bと呼び、コラーゲン分解における役割と機能解明を行った(5)。両酵素は、陰イオン交換クロマトグラフィーで分離され、さらに数種類のクロマトグラフィーを組み合わせで精製された。PzペプチダーゼA, Bは、基質特異性、基質の切断サイト、阻害剤などの触媒作用で数多く共通点を持っていた。ところが分子量の様相 (PzペプチダーゼA:70 kDaの1量体, PzペプチダーゼB: 66 kDaの4量体) は大きく異なっており、各酵素タンパク質に対して作成されたポリクローナル抗体に対する抗原性も、交差することは無かった。このことを裏付けるため、両酵素タンパク質の遺伝子をクローン化し、その構造遺伝子について検討を加えた。その結果、両酵素タンパク質のアミノ酸一次配列には22%の相同性しかないが、共に亜鉛原子を配位するモチーフHEXXHを持ち、金属プロテアーゼのM3Bファミリーに属することが判った。PzペプチダーゼAについては、1.8 Å分解能のX線結晶構造解析を行い、阻害剤との共結晶の構造解析を通して、(Gly-Pro-X)繰り返し配列認識と分解の構造を明らかにした(6-7)。

### 4. *Aneurinibacillus* 属細菌 AM-1 株が生産するアミノペプチダーゼ

プロリルペプチドを強力に加水分解する *Aneurinibacillus* 属細菌 AM-1 株のアミノペプチダーゼは、(i) leucyl-*p*-nitroanilide (Leu-*p*NA)を最も効率的に加水分解し、(ii) アミノ酸配列から、活性部位に2つのZn原子を含むメタルペプチダーゼファミリーM28に属し、(iii) プロリンを多く含む難分解性タンパク質であるコラーゲンの効果的な分解に貢献する広い基質特異性を有する、という3つの興味深い性質をもつ(8)。これらの特徴について、タンパク質立体構造情報から検討を加えるため、本酵素のX線結晶構造解析による立体構造決定を行った(9)。ペプチダーゼドメインとそれにぶら下がるもうひとつのドメインから成る構造を明らかにし、プロリルペプチドに作用する構造的特徴を明らかにした。

これまで解明してきたそれらコラーゲン分解系酵素群の生化学的性質を基礎に、細胞外マトリックスの分解生成物から抗ガン剤などの医薬・機能性食品の開発、さらに食品や化粧品等の素材開発へ応用可能な産業用酵素としての実用化が期待される(3)。本酵素群が産業廃棄物である難分解性動物タンパク質の分解・リサイクルのためのツールとしての応用可能になれば、私たちの提唱する「リサイクルバイオテクノロジー」の一翼を担い、その意義は益々大きいものとなる。

## 5. Reference

- (1) Okamoto, M. *et al.* Appl. Microbiol. Biotechnol., **57**, 103-108 (2001)
- (2) Watanabe, K. Appl. Microbiol. Biotechnol., **63**, 520-526 (2004)
- (3) Suzuki, Y., *et al.* J. Biosci. Bioeng., **102**, 73-81 (2006)
- (4) Itoi, Y., *et al.* J. Bacteriol., **188**, 6572-6579 (2006)
- (5) Miyake, R., *et al.* J. Bacteriol., **187**, 4140-4148 (2005)
- (6) Sugihara, Y. *et al.* Biosci. Biotech. Biochem. **71**, 594-597 (2007)
- (7) Kawasaki, A., *et al.* Acta Crystallographica, **F63**, 142-144 (2007)
- (8) Murai, A., *et al.* J. Appl. Microbiol., **96**, 810-818 (2004)
- (9) Akioka, M. *et al.* Acta Crystallographica, **F62**, 1266-1268 (2006)