

放線菌由来アミノペプチダーゼによるペプチド合成

畑中 唯史

(岡山県生物科学総合研究所)

研究の目的

ジペプチドの中には、aspartyl-phenylalanine methyl esters (人工甘味料)、tyrosyl-arginine (オピオイド作用)¹⁾、varyl-tyrosine (アンギオテンシンI変換酵素阻害作用=高血圧低減作用)²⁾などのように、生理活性を示すものが知られている。また、tyrosineは、未熟児の栄養分として、必須であるにもかかわらず、その難溶性が問題となっており、水への溶解度を向上させるために、alanyl-tyrosineがtyrosineの代用品として有望視されている^{3, 4)}。

サーモリシンに代表される金属プロテアーゼは、有機溶媒中でペプチド合成能を示すことが知られている⁵⁾。しかしながら、サーモリシンはN末端修飾アミノ酸を基質とするため、ペプチドを得るためには、化学反応による脱保護工程を必要とする。また、N末端修飾アミノ酸は、高価であり、経済性の観点からも問題がある。

我々は、放線菌*Streptomyces septatus* TH-2株が分泌する、高い耐熱性を示す金属アミノペプチダーゼ (SSAP) を見出し、大腸菌を用いた大量発現に成功した⁶⁾。SSAPは、様々なジペプチドに対して、加水分解活性を示し、N末端が修飾されたペプチドの加水分解能は示さないアミノペプチダーゼである⁷⁾。本研究では、N末端未修飾アミノ酸を基質とした、SSAPの逆反応による、ジペプチド合成の可能性について検討する。

方法

SSAPは、我々の文献に従い調整した⁶⁾。SSAPによるジペプチド合成は、以下のように行った。SSAP (1 mg/ml) 20 μ Lを、200 mMのアミノ酸を含む10 μ Lの1M Tris-HCl (pH 8.0) に懸濁し、1.5-ml容チューブにいれ、液体チッソに浸し瞬時に凍らせた。FreeZone Freeze-Dry Systems Model 7679520 (Labconco社製) により、0.3 hPa減圧下、2時間凍結乾燥させ、得られた粉末をペプチド合成に用いた。この時、凍結乾燥処理後の残存活性は78%であった。50 mMのアミノ酸メチルエステルを含む98%メタノール100 μ Lを凍結乾燥酵素に添加することにより、反応を開始させた。300rpm、25°C、20分から50時間反応を継続した。SSAPは、99.8%以上のメタノール存在下では、活性を示さないため、1.9 mlの100%メタノールを添加することにより、反応を停止させた。遠心により不溶物を除いた後、薄層クロマトグラフィーあるいは高速液体クロマトグラフィーによる分析を行った。

結果

基質特異性

SSAPは、疎水性残基を含むジペプチドの加水分解反応では、幅広い特異性を示すことから⁷⁾、

我々はSSAPにより、疎水性残基を含むジペプチドの合成が可能であると考えた。アシ

ル受容体を Phe-OMe に固定し、20 種類のアミノ酸を用いて、3 時間反応を行い、アシル供与体の特異性を検討した。また、phenylalanine をアシル供与体として、17 種類のアミノ酸メチルエステルを用いて、アシル受容体について同様な検討を行った。図 1 に示すように、アシル供与体、アシル受容体いずれにおいても、嵩高い疎水性側鎖をもつアミノ酸を好み、ジペプチドの生成を確認した。加えて、cysteine をアシル供与体とした場合は、ペプチドの合成は認められなかった。また、His-OMe あるいは Pro-OMe をアシル受容体とした場合も、ペプチドは生成されなかった。

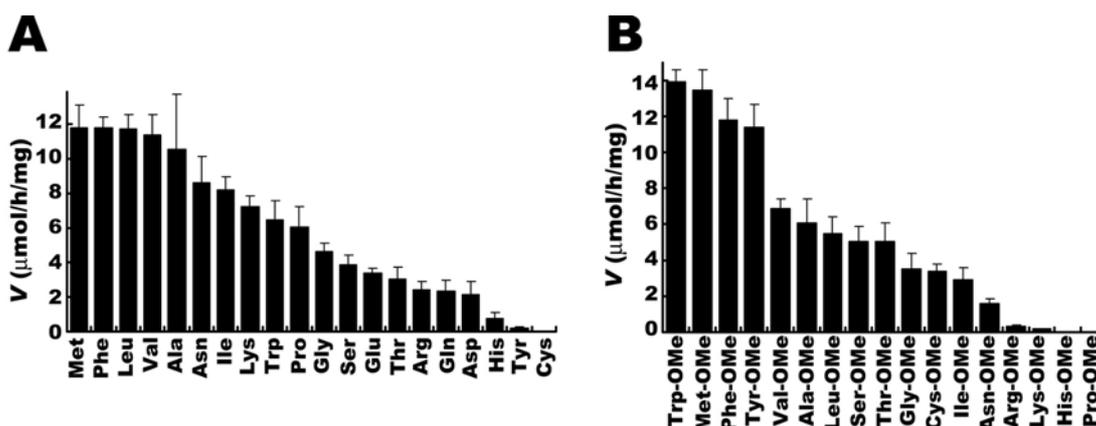


図1 ジペプチド合成における基質特異性

A:アシル供与体の特異性。

B:アシル受容体の特異性。

SSAP による生理活性ペプチドの合成

次に、SSAP により、AspPhe-OMe, ValTyr-OMe, AlaTyr-OMe および Ala-3,4-dihydroxyphenylalanine(DOPA)-OMe の合成を試みた。DOPA は、パーキンソン病治療薬であるが、投与する際にその水溶性が低いことが問題である。DOPA は、tyrosine に似た構造を有するため、DOPA-OMe は、アシル受容体として適していることが予想され、ジペプチド化することによって、水溶性の向上が見込まれる。反応を試みたところ、上記4種のペプチドは、98%メタノール中でいずれも SSAP によって合成可能であることを確認した。これらジペプチドのアミノ酸に対する変換率は 25% 以上の値を示した (data not shown)。我々は、SSAP により、tyrosine および Arg-OMe を用い、オピオイド作用をもつ TyrArg のメチルエステル体合成を試みたが、その生成は認められなかった。図 1 からわかるように、tyrosine および Arg-OMe は、基質として適さないものと考えられた。

結論

本研究により、アミノ酸をアシル供与体、アミノ酸メチルエステルをアシル受容体に用いることにより、SSAP によるジペプチド合成が可能であることを証明することができた。さらに我々は、SSAP によって4種の生理活性ペプチドの合成にも成功した。

文献

- 1) Satoh, M., Kawajiri, S., Yamamoto, M., Akaike, A., Ukai, Y. and Takagi, H. (1980) *Neurosci. Lett.* **16**:319-322
- 2) Tokunaga, K. H., Yoshida, C., Suzuki, K. M., Maruyama, H., Futamura, Y., Araki, Y. and Mishima, S. (2004) *Biol. Pharm. Bull.* **27**:189-192
- 3) Daabees, T. T., and Stegink, L. D. (1978) *J. Nutr.* **108**:1104-1113
- 4) Daabees, T. T., and Stegink, L. D. (1979) *Pediatr. Res.* **13**:894-899
- 5) Nakanishi, K., and Matsuno, R. (1990) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **613**:652-655
- 6) Arima, J., Iwabuchi, M. and Hatanaka, T. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**:531-538
- 7) Arima, J., Uesugi, Y. Iwabuchi, M. and Hatanaka, T. (2006) *Appl. Microb. Biotechnol.* **70**:541-547