

アラニルヒスチジン合成に向けた放線菌由来セリンペプチダーゼの機能改変

有馬 二郎
(鳥取大学 農学部)

研究の目的

魚類や哺乳類の筋肉中には、アンセリン (β -Ala- γ -methyl-L-His) やカルノシン (β -Ala-L-His; Car) など、 β -Alaを含有するペプチドが存在し、抗潰瘍や抗疲労作用を持つペプチドとして知られている。最近の研究から、L-Hisに代わり、分岐鎖アミノ酸をC側に持つペプチドも、Carと同様の生理機能を持つことが分かり¹⁾、 β -AlaをN側に持つペプチドの有用性が高まりつつある。

セリンペプチダーゼは時として、加水分解活性に付随してアミノリシス活性を示す。更にいくつかの酵素では、活性中心Ser残基をCysに置換し、「トランスペプチダーゼ」に機能変換された例も存在する^{2,3)}。我々は、放線菌よりpeptidase S9ファミリーに属するセリンペプチダーゼ(S9AP)を見出した⁴⁾。中でも、中等度高熱性放線菌*Streptomyces thermocyaneoviolaceus* NBRC14271由来のS9AP(S9AP-St)は、微弱な β -Ala誘導体の加水分解活性を示した。本研究では、S9AP-StのSer残基をCys残基に置換した酵素、S502C S9APを構築し、野生型及び変異酵素において、その β -Ala含有ペプチド合成活性及び有用ペプチドの生産能を評価した。

方法

S502C S9AP-Stは、QuickChange site directed mutagenesis kit (Stratagene社)を用いて構築した。野生型及びS502C S9AP-Stをそれぞれ、大腸菌BL21(DE3)株に発現させ、イオン交換カラムに供することで精製した。アミノリシス反応による β -Alaペプチドの合成は、pH 8.0、25℃の条件で行った。アミノ酸誘導体(アシル受容体)及び β -Ala誘導体(アシル供与体)が存在する混合液に、40 μ g/mlになるよう酵素を添加することで反応を開始し、数分~数時間後、混合液と同量の3%ギ酸溶液を添加して反応を終了させた。反応液はUPLC-ESI-TOF-MS、またはアミノ酸分析機を用いて解析した。

結果

S9AP-Stの β -Ala-pNAに対する加水分解活性(0.02 μ mol/min/mg)は、L-Phe-pNAに対する活性(40 μ mol/min/mg)の約1/2000であった。しかし、 β -Ala誘導体を単一の基質としたとき、アミノリシス活性を示したことから(Table 1)我々は高いアミノリシスの機能を付加できれば、様々な β -Alaペプチド合成が可能となると想定し、活性中心のSer⁵⁰²をCysに置換したS502C S9AP-Stを構築した。予測通り、変異酵素は加水分解活性を示さなくなり、単一のアミノ酸誘導体を基質としたとき、疎水アミノ酸に対し高いアミノリシス活性を示した。しかし β -Ala誘導体を単一の基質としたとき、変異酵素はアミノリシス活性を示さず、 β -Alaからなるホモペプチド合成能を失った(Table 1)。 β -Ala

誘導体と β -アミノ酸誘導体の 2 種を反応液に混合し、 β -Ala を含有するヘテロなペプチドの合成能を評価した。その結果、野生型酵素は様々なアミノ酸誘導体を基質として利用し、 β -Ala を N 側に持つペプチドを優先的に合成した (Table 1)。一方、S502C S9AP-St はヘテロなペプチドの合成能を保持していたが、合成ペプチドは全て C 側に β -Ala が存在していた (Table 1)。この結果から、S9AP-St の Ser⁵⁰² を Cys に置換することで、アミノリシス反応における基質特異性が変化することが示唆された。

上記検討から、野生型 S9AP-St が様々な β -Ala ペプチドの合成能を示したことから、次に β -Ala-L-His-OMe (Car-OMe) 合成量を指標として、野生型酵素の β -Ala ペプチド合成における最適化を行った。Fig. 1A に示されるよう、Car-OMe 合成は β -Ala-OBzl 濃度に非依存的であったが、副生成物、 β -Ala- β -Ala-OBzl の合成量は β -Ala-OBzl 濃度が上昇するにつれ増加した。一方で、L-His-OMe 濃度の上昇に従い Car-OMe 合成は上昇し、 β -Ala- β -Ala-OBzl 合成は減少した。合成における pH の影響を検討した結果、pH 8.5 で Car-OMe 合成活性は最大となった (Fig. 1B)。しかし β -Ala- β -Ala-OBzl 合成量は pH の上昇に伴って増加した。副生成物、 β -Ala- β -Ala- β -Ala-OBzl の合成はこれらの検討では観察されなかった。

Fig. 1C に示すよう、反応液中の酵素濃度を 0.1 mg/ml、基質を共に 20 mM としたときに、Car-OMe 合成は 5 時間後まで効率的に進み、それ以降増加はほとんど見られなかった。一方、 β -Ala-OBzl は 24 時間後にはほぼ完全に消費された。 β -Ala-OBzl から Car-OMe への変換率を決定するため、24 時間反応させた反応混合液中に存在する Car-OMe と各基質の濃度をアミノ酸分析機で解析した。アルカリ処理によりサンプルの酵素反応停止と脱エステルを行った。Fig. 1C に示すよう、アミノ酸分析機で測定した結果、Car 濃

Table 1. Tested chemicals and peptides synthesized by both wild-type and S502C S9AP-Sts.

Substrate	Products					
	wild-type S9AP-St			S502C S9AP-St		
	w/ β A-OBzl			w/ β A-OBzl		
	β A-Xaa, Xaa- β A	Byproducts		β A-Xaa, Xaa- β A	Byproducts	
G-OMe	n.d.	n.d.	(β A) ₂ -OBzl	G ₃ -OMe	G- β A-OBzl	G ₃ -OMe, G ₂ - β A-OBzl
\perp V-OMe	(\perp V) ₂ -OMe	β A- \perp V-OMe	(β A) ₂ -OBzl, (β A) ₂ - \perp V-OMe	n.d.	n.d.	n.d.
\perp L-OEt	n.d.	β A- \perp L-OEt	(β A) ₂ -OBzl	(\perp L) ₂ -OMe, (\perp L) ₃ -OMe etc	\perp L- β A-OBzl	(\perp L) ₂ -OMe, (\perp L) ₃ -OMe etc
\perp L-OMe	n.d.	β A- \perp L-OMe	(β A) ₂ -OBzl	n.d.	n.d.	n.d.
\perp M-OMe	n.d.	β A- \perp M-OMe	(β A) ₂ -OBzl, (β A) ₂ - \perp M-OMe etc	(\perp M) ₂ -OMe	\perp M- β A-OBzl	(\perp M) ₂ -OMe, (\perp M) ₂ - β A-OBzl
\perp F-OEt	n.d.	β A- \perp F-OEt	(β A) ₂ -OBzl, (β A, \perp F)- β A-OBzl etc	(\perp F) ₂ -OMe, (\perp F) ₃ -OMe etc	\perp F- β A-OBzl	(\perp F) ₂ -OMe, (\perp F) ₃ -OMe etc
\perp W-OMe	n.d.	β A- \perp W-OMe	(β A) ₂ -OBzl	(\perp W) ₂ -OMe	\perp W- β A-OBzl	(\perp W) ₂ -OMe
\perp Y-OMe	n.d.	β A- \perp Y-OMe	(β A) ₂ -OBzl, (β A) ₂ - \perp Y-OMe etc	(\perp Y) ₂ -OMe	\perp Y- β A-OBzl	(\perp Y) ₂ -OMe, (β A) ₂ - \perp Y-OMe
\perp P-OMe	n.d.	\perp P- β A-OBzl	(β A) ₂ -OBzl, \perp P-(β A) ₂ -OBzl etc	n.d.	n.d.	n.d.
\perp S-OMe	n.d.	n.d.	(β A) ₂ -OBzl	n.d.	n.d.	n.d.
\perp T-OMe	(\perp T) ₂ -OMe	β A- \perp T-OMe	(β A) ₂ -OBzl, (\perp T) ₂ -OMe	n.d.	n.d.	n.d.
\perp N-OMe	n.d.	β A- \perp N-OMe	(β A) ₂ -OBzl	n.d.	n.d.	n.d.
\perp H-OMe	n.d.	β A- \perp H-OMe	(β A) ₂ -OBzl	n.d.	n.d.	n.d.
\perp K-OMe	n.d.	β A- \perp K-OMe	(β A) ₂ -OBzl	n.d.	n.d.	n.d.
\perp R-OMe	n.d.	β A- \perp R-OMe	(β A) ₂ -OBzl	n.d.	n.d.	n.d.
\perp D-OMe	n.d.	n.d.	(β A) ₂ -OBzl	n.d.	n.d.	n.d.
\perp E-OMe	n.d.	n.d.	(β A) ₂ -OBzl	n.d.	n.d.	n.d.
bA-OMe	n.d.	---	---	n.d.	---	---
bA-OBzl	(β A) ₂ -OBzl	---	---	n.d.	---	---
bA-OtBu	(β A) ₂ -OtBu	---	---	n.d.	---	---

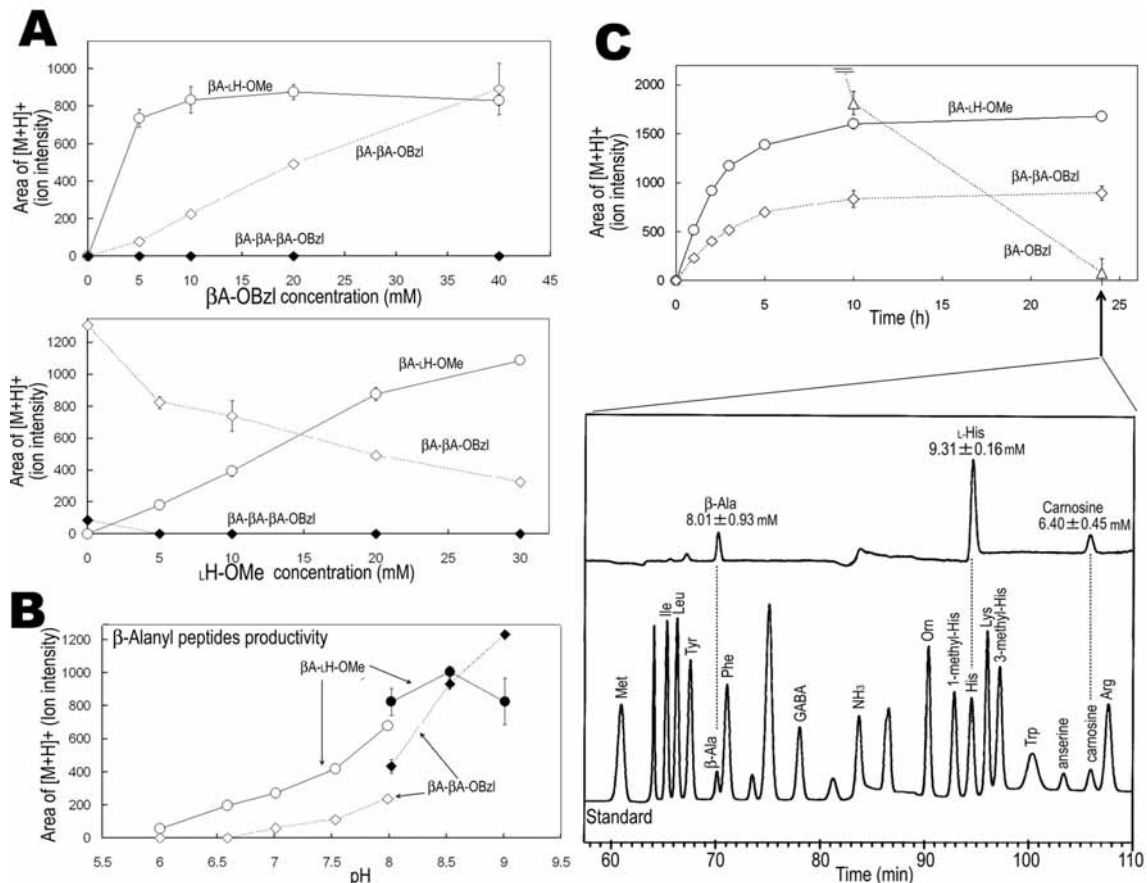


Fig. 1 (A) Effect of the substrate concentration on the production of Car-Ome and β -Ala- β -Ala-OBzl. Upper panel: Effect of β -Ala-OBzl concentration. L-His-Ome at 20 mM and β -Ala-OBzl at 0 to 40 mM were used as the acyl acceptor and donor, respectively. Lower panel: Effect of L-His-Ome concentration. L-His-Ome at 0 to 30 mM and β -Ala-OBzl at 20 mM were used as the acyl acceptor and donor, respectively. (B) Effect of pH on production of Car-Ome and β -Ala- β -Ala-OBzl. (C) Time dependence and yield evaluation of Car-Ome synthesis. The upper panel shows the time dependence in the production of Car-Ome and β -Ala- β -Ala-OBzl. L-His-Ome at 20 mM and β -Ala-OBzl at 20 mM were used as the acyl acceptor and donor, respectively. The lower panel shows a chromatogram of amino acid analyzer. L-His-Ome at 20 mM and β -Ala-OBzl at 20 mM were used as the acyl acceptor and donor, respectively.

度は約 6.4 mM であり、 β -Ala-OBzl から Car-Ome への変換率は、少なくとも 30%以上であると計算された。

結論

我々は、S9AP-St のアミノリシス反応を使用することで、 β -Ala-OBzl と L-His-Ome から Car-Ome を合成できることを見出した。セリンペプチダーゼから「トランスペプチダーゼ」に機能置換し、より優れた生体触媒に仕立て上げることを目的して、我々は活性中心セリン残基に変異を施した S502C S9AP-St を構築した。しかし、この変異によってアミノリシスにおける基質特異性が大きく変化した。一方、野生型 S9AP-St による Car-Ome 合成では、 β -Ala-OBzl からの変換率が 30%以上であることが判明した。

文献

- 1) Tsuneyoshi Y, Tomonaga S, Asechi M, Morishita K, Denbow DM, Furuse M. (2007) Central administration of dipeptides, beta-alanyl-BCAAs, induces hyperactivity in chicks.

BMC Neurosci. 8:37.

- 2) Elliott RJ, Bennet AJ, Braun CA, MacLeod AM, Borgford TJ. (2000) Active-site variants of *Streptomyces griseus* protease B with peptide-ligation activity. Chem. Biol. 7:163–171.
- 3) Joe K, Borgford TJ, Bennet AJ. (2004) Generation of a thermostable and denaturant-resistant peptide ligase. Biochemistry 43:7672–7677.
- 4) Usuki H, Uesugi Y, Iwabuchi M, Hatanaka T. (2009) Putative “acylaminoacyl” peptidases from *Streptomyces griseus* and *S. coelicolor* display “aminopeptidase” activities with distinct substrate specificities and sensitivities to reducing reagent. Biochim. Biophys. Acta. 1794:468–475.