

Cyclo (Gly-Tyr) 分解酵素の合成高分子配糖体による安定化

神崎 浩・安部 泰輝・河津 一儀

(生物資源開発学講座)

Stabilization of cyclo (Gly-Tyr)-hydrolyzing Enzyme by Synthetic Glycoside-bearing Polymer

Hiroshi Kanzaki, Yasuteru Abe and Kazuyoshi Kawazu

(Department of Bioresources Chemistry)

An enrichment technique led us to isolate 13 cyclo (Gly-Tyr)-assimilating bacteria, which had higher cyclo (Gly-Tyr)-hydrolyzing activity than the coryneform rod bacterium strain T-1-3-Y, previously isolated from soil. The cell-free extract of the strain OI-L-2 prepared by ultrasonication in a buffer containing bovine serum albumin had cyclo (Gly-Tyr)-hydrolyzing activity while that of the strain T-1-3-Y showed no activity. GEMA (Glucosyloxyethyl methacrylate) polymer was found to be a more effective stabilizer for solubilizing cyclo (Gly-Tyr) hydrolase than bovine serum albumin.

Key words : diketopiperazine, cyclic dipeptide, hydrolysis, protease

緒 言

2,5-ジケトピペラジン(2,5-ジオキソピペラジン, 環状ジペプチド, DKP)は自然界に広く存在し, 抗微生物活性, 抗腫瘍活性などの多岐にわたる生理活性を有することで注目されているが^{1,2)}, 生体内では微量しか生成されないため, 大量に調製することが難しく, その生化学的研究は十分に行われているとは言えない. そこで, 我々はこれら DKP 類の簡便合成法を開発することを目的として研究を進めてきた. DKP がペプチド結合から成ること, ペプチド合成がプロテアーゼの逆反応で行われていることから, DKP 分解酵素が取得できればその酵素の多機能性を利用して DKP 類の合成が可能であると考え, 天然の DKP 分解酵素を探索してきた. その過程で, cyclo (Gly-Gly) (以下 CGG とする) および cyclo (Gly-Tyr) (以下 CGY とする) を資化する細菌の中から菌体レベルで最も CGG 分解活性の強い菌株として *Arthrobacter* sp. 1-3-1 株を, 最も CGY 分解活性の強い菌株としてコリネ型桿菌 T-1-3-Y 株を見いだし, これらが DKP に対して異なる基質特異性を示すことを報告した³⁾. しかしながら, これらの菌株

についてさまざまな条件で菌体を破碎して無細胞抽出液を調製したが, DKP 分解活性を全く示さなかった. 破碎直後の懸濁状態でも活性が認められなかったことから, これらの DKP 分解酵素はかなり不安定であることが判明した. そこで, 本論文では CGY 資化性菌に絞り, 菌体レベルで CGY 高分解活性を示す菌株を再スクリーニングし, その菌株を用いて安定な無細胞抽出液を得るための条件検討を行った.

材料と方法

CGY の調製

基質となる CGY の合成は, Kopple の方法⁴⁾に従い次のように行った. Gly-L-Tyr (SIGMA) 50mg をフェノール1.5g に溶解し, 窒素気流下, 140°C, 2 時間還流する. 反応終了後, エーテル洗浄で得られた粗結晶を50% EtOH から再結晶し, 精製結晶 (28 mg) を得た.

$[\alpha]_D^{20} +10^\circ$ (*c* 1.0, MeOH), IR ν max (KBr) cm^{-1} : 3339, 3194, 1666, 1473, EIMS m/z : 220(M^+), 107, 77, 44, NMR δ_H (CD_3OD): 2.69 (1H, d,

Received October 1, 1997

$J=17.7\text{Hz}$), 2.92(1H, dd, $J=4.58, 13.7\text{Hz}$), 3.19(1H, dd, $J=3.66, 13.7\text{Hz}$), 3.46(1H, d, $J=17.7\text{Hz}$), 4.19(1H, dd, $J=3.66, 4.58\text{Hz}$), 6.76(2H, dd, $J=2.74, 11.6\text{Hz}$), 7.06(2H, dd, $J=2.74, 11.6\text{Hz}$)

集積培養法による CGY 資化性菌の単離および培養

集積培養の培地として、蒸留水 1 リットルに次の成分を含み、pH7.0に調整した AK 培地を用いた、CGY 1 g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10mg, biotin 1 mg, pantothenate·Ca 0.2mg, inositol 1 mg, nicotinic acid 0.2mg, pyridoxine HCl 0.2mg, *p*-aminobenzoic acid 0.1mg, riboflavin 0.1mg, folic acid 5 μg , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 40mg, CaCl_2 4 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.4mg, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 65 μg , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 45 μg . まず18 ϕ の試験管にウレタン栓をした AK 液体培地 (5 ml) を用意する。そこに土壌、どぶの水などのサンプルを 1 g 添加し、27 $^{\circ}\text{C}$, 3 日間の往復振とう培養を行う。ここで、菌の生育が確認されたものについて、無菌的に100 μl を新しい培地に移植し、さらに27 $^{\circ}\text{C}$, 3 日間の往復振とう培養を行う。この操作を 3 回程度繰り返すことにより、選択圧をかけ、資化性菌を濃縮する。3回の培養後、同じ組成の寒天培地に塗布し27 $^{\circ}\text{C}$ で培養する。寒天培地上に生育したコロニーを資化性菌として斜面培地に移植した。

得られた資化性菌の CGY 分解活性を測定するために、各菌株を AK 培地 (18 ϕ の試験管、ウレタン栓) に植菌し、27 $^{\circ}\text{C}$, 2 日間の往復振とう培養を行った。得られた菌株は生理食塩水で洗浄後 100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) に懸濁して酵素活性測定に使用した。

CGY 分解活性測定法

酵素反応は、粗酵素液100 μl を30 $^{\circ}\text{C}$ で予備保温した後、4.5 mM CGY 溶液を50 μl 添加して反応を開始する。30分後、1.0 N HClを15 μl 添加して反応を停止する。反応終了後、遠心分離 (10,000 g, 10 min) を行い、その上清をアミノ酸分析に供し、酵素反応生成物である Tyr を定量した。この際、Tyr 以外の反応生成物として考えられる Gly, Gly-Tyr, Tyr-Gly も定量できる。

結 果

高 CGY 分解活性を示す資化性菌の単離

集積培養により得られたおよそ100菌株について静

止菌体を調製し、その酵素活性を測定したところ、13株が T-1-3-Y 株より高い CGY 分解活性 (菌体当たり) を示した (Fig. 1)。どの菌株を用いた反応でもジペプチドの生成は認められず、構成アミノ酸である Gly と Tyr の増加のみが観察されたことから、これ以降の実験においては、酵素 1 Unit を、1 分間に 1 μmol の Tyr を遊離するのに必要な酵素活性とした。なお、材料と方法に示した AK 培地以外に、CGY のみを炭素・窒素源とする培地やアルカリ条件の培地なども集積培養に用いたが、AK 培地ほど CGY 活性を示す菌株を取得できる培地はなかった。次にこれらの菌株から無細胞抽出液を調製し、安定な CGY 分解活性を示す菌株をスクリーニングすることにした。

CGY 分解活性を示す無細胞抽出液の調製

T-1-3-Y 株の菌体破碎は基本緩衝液として100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) 中に 5 mM dithiothreitol, 20% グリセロールを添加したものを使用してきたが、この緩衝液では酵素活性を示す無細胞抽出液が得られなかったため、今回予備実験としてこの緩衝液にタンパク質の安定化剤として知られている

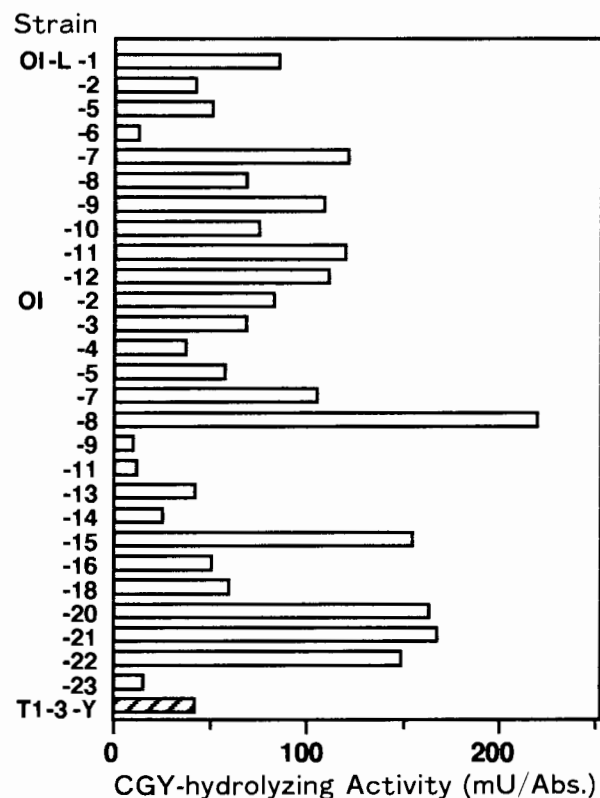


Fig. 1 CGY-hydrolyzing activity of the resting cells of soil isolates.

牛血清アルブミン (BSA) を10mg/ℓ 添加した緩衝液を用いて、菌体破碎実験を行った。破碎には、超音波破碎機 (Astrason XL2020) を用い、強度3.8で合計15分間の破碎を行った。破碎後、遠心分離により得られた上清を無細胞抽出液として酵素反応に供した。その結果、Fig. 2に示すように、13株中、8株の無細胞抽出液中に CGY 分解酵素活性が認められ、中でも OI-L-2 株由来の抽出液が最も高い活性を示した。

OI-L-2 株が安定な CGY 分解酵素の供給源として最適であることが判明したので、高活性の菌体を得る培養時間の検討を行った。2日間18φ試験管で前培養した菌体を、AK 培地を100ml含む 500ml 容坂口フラスコへ移植して培養を行い、活性の経時変化を観察した。Fig. 3に示すように、本菌株は培養開始18時間前後で生育が最大になるが、CGY 分解活性は培地中の CGY が消失する48時間前後に最大になり、その後急激に減少する。このことから、本菌の CGY 分解酵素は CGY により誘導される典型的な誘導酵素であることが判明した。培地中の CGY 量の減少を指標に培養48時間前後の菌体を、今後の実験に用いることにした。

最適酵素安定化剤の検討

BSA が CGY 分解酵素活性安定化のために適していることが判明したが、今後、この酵素を精製しその諸性質を検討するためには、BSA より大量に安価で入手可能な安定化剤の発見が必要である。そこで、タンパク質の安定化剤として知られているポリオール類に着目しその CGY 分解酵素への安定化効果を検討した。この際、最近、日本精化 (株) で合成されタンパク質への安定化効果が期待されている glucosyloxyethyl methacrylate polymer (GEMA polymer, 分子量 1.02×10^6)⁹⁾をも使用した。その結果、Fig. 4に示すように、試験した全てのポリオール類に効果が認められ、中でも GEMA polymer が最も効果的であった。

考 察

前報⁹⁾において、資化性菌を取得する集積培養の際、新しい培地への移植は1回ないし2回で済ませていたが、今回、3回もしくはそれ以上の移植を行ったところ、より高い CGY 分解活性を有する微生物が確率高く得られた。これは長期にわたり基質である

CGY に対する選択圧がかかったためと考えられる。今後、より多くの DKP 分解酵素を発見するためには多くの DKP 資化性菌を得ることが必要不可欠であるが、この事実を生かして選択圧を強くかつ長く与えることにより、有用な微生物の探索が簡単に行えると期待できる。

本研究の結果から、CGY 分解酵素に対する GEMA ポリマーの安定化効果が明らかになった。他のポリオールにも安定化効果が見いだされたことから、こ

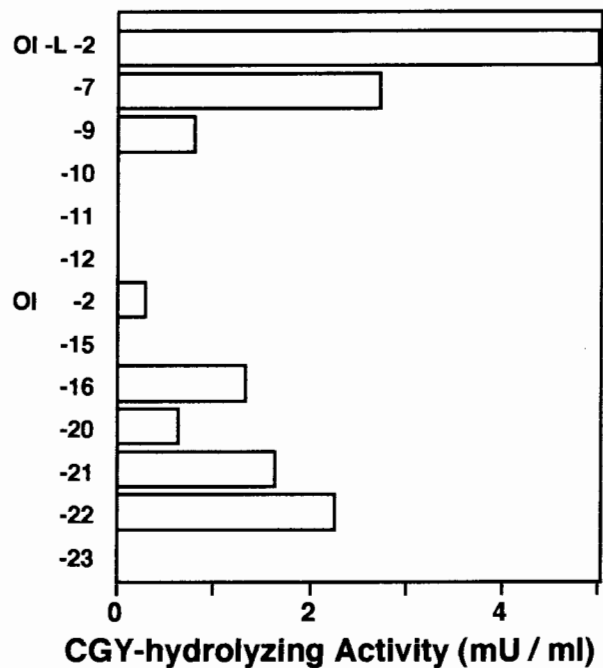


Fig. 2 CGY-hydrolyzing activity of the cell-free extracts prepared by somication in a buffer containing bovine serum albumin.

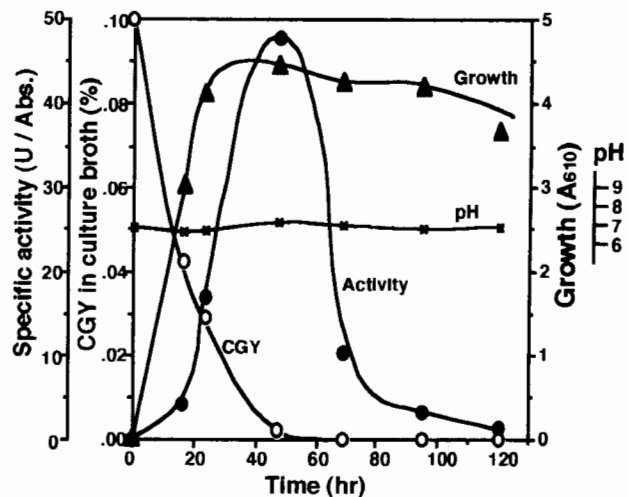


Fig. 3 Time course of cultivation of the strain OI-L-2.

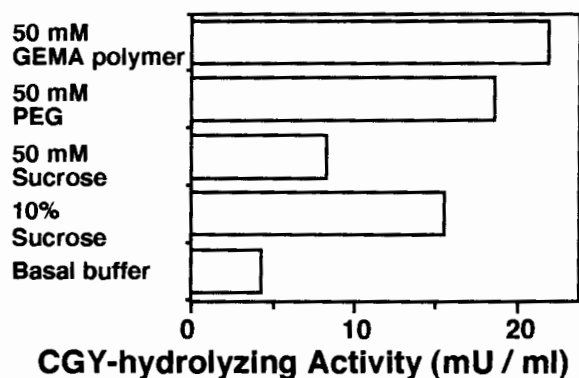


Fig. 4 Effect of polyols on stabilizing CGY-hydrolyzing activity.

の効果は水酸基の水和によりタンパク質近傍の水分子によるタンパク質の立体構造変化が押さえられることによるものと推測される。他のポリオールより良好な結果を与えた理由は不明であるが、他の化合物より水和能が優れていることが一因かもしれない。GEMA ポリマーによる酵素の安定化については、乳酸脱水素酵素とトリプシンについて、酵素の保存に対する安定性が増大したと、および基質の親和性が増大したことが報告されているが⁶⁾、今回新たに、細胞破碎により抽出困難な酵素に対しても安定性を増大させその結果として、無細胞状態の酵素液の取得を可能にする効果が見いだされた。今後この安定条件を採用することにより、CGY 分解酵素を始めとする、DKP 分解酵素の精製が可能となり、その諸性質が明らかになると期待される。

要 約

集積培養法を用いて新たに土壌より cyclo (Gly-Tyr) 資化性菌を分離し、その中から、従来の資化性菌より菌体当たりの活性の高い菌株を13株見いだした。これらの菌株を牛血清アルブミンを添加した緩衝液中に懸濁し、超音波破碎に供したところ、OI-L-2 株由来の無細胞抽出液中に cyclo (Gly-Tyr) 分解

活性が検出された。この活性は安定化剤をアルブミンから配糖化合成高分子 GEMA ポリマーに代えることによりさらに安定に抽出された。

謝 辞

この研究は平成6年度から8年度までの3年間に亘る岡山大学学内特定研究『特殊環境生物の機能開発と物質生産への応用』を分担して行ったものである。GEMA polymer は日本精化(株)研究本部、奥村昌和博士に供与していただいた。また、500-MHz ¹H-NMR 測定、質量分析測定に際しては岡山大学 SC-NMR 室および岡山大学農学部質量分析室を利用させていただいた。ここに記して感謝の意を表する。

文 献

- 1) Sammes, P.G.: Naturally occurring 2,5-diketopiperazines and related compounds, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, **32**, 51-118 (1975)
- 2) Prasad, C.: Bioactive cyclic dipeptides, *Peptides*, **1**, 151-164 (1995)
- 3) Kanzaki, H., S. Oda, A. Kobayashi, and K. Kawazu: Microbial hydrolysis of diketopiperazines: different types of diketopiperazine-assimilating bacteria, *J. Ferment. Biotechnol.*, **83**, 386-388 (1997)
- 4) Kopple, K. D. and H. G. Ghazarian: A convenient synthesis of 2,5-diketopiperazines, *J. Org. Chem.*, **33**, 862-864 (1968)
- 5) Kitazawa, S., M. Okumura, K. Kinoshita, T. Sakakibara, K. Nakamae, T. Miyata, M. Akashi and K. Suzuki: Preparation and some properties of glycoside-bearing polymer, in *Carbohydrate as Organic Raw Materials* (G. Descotes ed.), **2**, 115 (1994)
- 6) 中前勝彦, 西野孝, 吉田良夫, 定者奈緒, 奥村昌和, 山本昌平, 木野村圭右, A.S.Hoffman: 配糖体高分子による酵素の安定化, *高分子討論会予稿集*, **44**, 2186-2187 (1995)