

二国間交流事業 共同研究報告書

平成 23年 3月 30日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

共同研究代表者所属・部局 富山県立大学・工学部・生物工学科

職・氏名 ^(ふりがな) 教授・浅野 泰久 ^(あさの やすひさ)

1. 事業名 相手国(ロシア)との共同研究 振興会対応機関()

2. 研究課題名 D-アミノペプチダーゼ類の基質特異性のin silico解析とアミド合成への利用

3. 全採用期間

平成 21 年 4 月 1 日 ~ 平成 23 年 3 月 31 日 (2 年 0 ヶ月)

4. 研究経費総額

(1) 本事業により交付された研究経費総額 5,000 千円

初年度経費 2,500 千円、 2年度経費 2,500 千円、 3年度経費 千円

(2) 本事業による経費以外の国内研究経費総額 千円

5. 研究組織

(1) 日本側参加者

氏名 <small>(ふりがな)</small>	所属・職名	研究協力テーマ
(あさのやすひさ) 浅野 泰久	富山県立大学工学部生物工学科・ 教授	研究総括
(こめだ ひでのぶ) 米田 英伸	富山県立大学工学部生物工学科・ 准教授	遺伝子組換え実験
(ふうしゆく けんいち) 富宿 賢一	富山県立大学工学部生物工学科・ 助教	基質の合成実験
(ふくた やすひさ) 福田 泰久	富山県立大学工学部生物工学科・ 嘱託研究員	ω -ラウロラクタム加水分解酵素の変異型酵素の調製
(かめや まさふみ) 亀谷 将史	富山県立大学工学部生物工学科・ 嘱託研究員	変異型酵素のドッキングシミュレーション
(おおつか みのる) 大塚 稔	富山県立大学工学部生物工学科・ 博士前期課程 2 年生	D-アミノペプチダーゼの調製と精製
(とくなん こうすけ) 徳南 宏祐	富山県立大学工学部生物工学科・ 博士前期課程 1 年生	D-アミノペプチダーゼの変異型酵素遺伝子の調製と精製
(ひみ まりこ) 氷見 茉莉子	富山県立大学工学部生物工学科・ 博士前期課程 1 年生	D-アミノペプチダーゼの変異型酵素遺伝子の調製と精製

(2) 相手国側研究代表者

所属・職名・氏名 モスクワ大学・教授・ビタス・スベダス (Vytas SVEDAS)

(3) 相手国参加者 (代表者の氏名の前に○印を付すこと)

氏名	所属・職名 (国名)	研究協力テーマ
○Vytas SVEDAS	モスクワ大学・教授 (ロシア)	研究総括
Ghermes CHILOV	モスクワ大学・上級研究者 (ロシア)	基質合成
Irina SHAPOVALOVA	モスクワ大学・上級教員 (ロシア)	酵素の活性測定
Dmitry SUPLATOV	モスクワ大学・大学院博士課程学生 (ロシア)	酵素と基質との in Silico スクリーニングとドッキングシミュレーション
Ilyas KHALIULLIN	モスクワ大学・大学院博士課程学生 (ロシア)	D-アミノペプチダーゼと基質とのドッキングシミュレーションに基づく実証実験
Nikolai PANIN	モスクワ大学・大学院博士課程学生 (ロシア)	データ解析

6. 研究概要（研究の目的・内容・成果等の概要を簡潔に記載してください。）

研究目的・内容

本研究は、日本とロシアの専門性の異なる二つのグループが、D 立体選択的なアミノ酸アミダーゼ類の酵素化学とその合成への利用について、異なる専門性からのアプローチにより相補的に共同研究を行い、それぞれが単独では成し得ない研究成果を生み出そうとするものである。富山県立大学の浅野泰久らのグループは、応用微生物学、新規酵素のスクリーニングと発見等の研究を行っている。一方、ロシアのスベダス教授のグループは、酵素的アシル基転移反応の動力学解析、基質の *in silico* スクリーニング、水中アシル基転移酵素の最適化についての研究実績を有している。本研究では、富山県立大学が保有している D-アミノペプチダーゼや D-アミノ酸アミダーゼ、 ω -ラウロラクタム加水分解酵素などの酵素のエナンチオ選択性やペプチド合成の効率についての知見を深める。

スベダス教授のグループは、酵素の詳細な構造解析と基質となる化合物の *in silico* スクリーニングを担当する。D-アミノペプチダーゼの X 線構造データから、D-アラニンアミドに対する求核剤の構造を提案する。特にアミダーゼの反応でラセミ体の求核剤が光学分割を受ける可能性を追求する。また、D-アミノペプチダーゼの構造と触媒活性について、コンピュータモデリング、基質の *in silico* スクリーニングの手法を用いて比較と検証を重ねる。酵素は遺伝子組換え法により大量に生産し、ロシア側に送付して実証実験に使用してもらう。

① D-アミノペプチダーゼ

富山県立大学において、すでに結晶構造解析のデータが得られている D-アミノペプチダーゼ (*Ochrobactrum anthropi* C1-38 由来) 遺伝子を含む大腸菌形質転換株を大量培養し、酵素の精製および大量調製を行った。浅野泰久および本学大学院博士前期課程 2 年生大塚稔は、平成 21 年 5 月 2 日に富山を出発し、5 月 8 日帰国する日程で、精製酵素をロシアに持参し、モスクワ大学生物工学および生物情報学部並びにペロゼルスキー物理化学生物研究所のスベダス教授の研究室を訪問した。本研究に関連する従来の研究について、「Development of Amino acid amidases and dynamic kinetic resolution of α -aminonitriles」および「Screening for new functions of enzymes and their industrial development」と題して、講演を行い、今後の展開の可能性と研究分担の方法を具体化させた。

平成 21 年 10 月 5 日～10 月 15 日の日程で、ロシアから、スベダス教授、モスクワ大学・大学院博士課程学生 Dmitry SUPLATOV および Ilyas KHALIULLIN が富山県立大学を訪問した。スベダス教授による講演会「Enzymatic acyl transfer reactions in aqueous medium: kinetics, principles of engineering and examples of preparative synthesis」を開催し、お互いの研究の進捗について意見交換を行った。また、京都大学大学院農学研究科（小川教授）および味の素（株）アミノサイエンス研究所を訪問し、同内容の講演を行った。

平成 21 年度末にロシア側より、D-アミノペプチダーゼの結晶構造 (1EI5) に基づく情報解析を行った結果が報告された。すなわち、1981 種類の変異型酵素と 38 種類の基質の *in silico* でのドッキングシミュレーションの結果、75,278 種類の酵素基質複合体の中から、複数の変異型酵素において、基質特異性および反応速度が向上する可能性が高いことが予想された。その結果に基づいて、本学大学院博士前期課程 1 年徳南宏祐及び氷見茉莉子は、D-アミノペプチダーゼの変異型酵素 (W222H、W222H-W114L、W222H-W114L-I220V 及び W222H-W114H-I220T) を大腸菌で発現させ、酵素精製及び大量調整を行った。

平成 22 年 7 月 16 日に富山を出発し、7 月 23 日に帰国する日程で、精製酵素をロシアに持参し、スベダス教授の研究室を再び訪問した。その際、本研究に関する従来の研究および持参した精製酵素に関する報告を行った。浅野教授は「Recent development on the dynamic kinetic resolution of α -aminonitriles and

reaction mechanism of ACL racemase」、嘱託研究員の福田泰久は「A new enzymatic synthesis of 12-aminolauric acid -Screening, characterization and the use of ω -laurolactam hydrolase-」と題して講演を行った。また、大学院生の徳南宏祐および氷見茉莉子は「Point mutation of D-aminopeptidase」と題してそれぞれ講演を行った。また、同時に味の素(株)アミノサイエンス研究所を訪問した際には、浅野教授が「Application of microbial and plant enzymes acting on nitrile and amide compounds」と題して講演を行った。

これまでのお互いの研究の進捗を共有すると共に、討論を通して、今後の展開を具体化させた。得られた4種類の変異型酵素の比活性は、一点変異で野生型の60%、二点及び三点変異で5%未満と、D-アラニンアミドに対する比活性が著しく低下した。かさ高い基質に対する反応性は上昇していることが期待でき、現在、ロシア側にて持参した精製酵素を用いた検討が行われている。

② ω -ラクタム加水分解酵素

平成21年度、ロシア側が訪問した際の議論において、新しく ω -ラウロラクタム加水分解酵素に関する課題を追加した。共同研究の目的は、*in silico*解析を基にした ω -ラウロラクタム加水分解酵素の活性向上による12-アミノラウリン酸合成の効率化と6-アミノヘキサ酸環状ダイマー加水分解酵素(Acd加水分解酵素)との構造および酵素活性の比較である。ロシア側から平成22年3月23日に受けた電子メールにより、活性向上が予想される変異型酵素が推定された。スベダス教授のグループは、 ω -ラウロラクタム加水分解酵素と高い構造相同性を示すAcd加水分解酵素の立体構造を基に、PROPKA QSAR法によりpKa値の計算を行った。その結果、活性に関わるLys72残基のpKa値は5.45を示した。この値は一般的な値と比較すると極めて低いため、Lys72残基のpKa値を上昇させる変異残基を予測した。L74D、T120D、D202E、T120D/D202Eの変異により、Lys72残基のpKa値が向上するという計算結果が得られた。富山県立大学嘱託研究員福田泰久は、変異型酵素であるL74D、T120D、D202E、T120D/D202Eをsite-directed mutagenesisにより作成し、速度論解析を行った。T120DとT120/D202Eの変異体においては加水分解活性が失活したが、L74DとD202E変異体においてはKm値が野生型酵素と比べ減少し、 ω -ラウロラクタムとの親和性が向上するという結果が得られた。さらに、D202E変異体においては、Kcat/Km値が向上しており、酵素の機能が向上しているという結果が得られた。上記の変異はLys72のpKa値を向上させる変異であり、変異型酵素における指摘pHの変化が予想されるため、様々なpHで酵素反応を実施してみるというディスカッションを行った。

また、スベダス教授のグループに所属するDmitry SUPLATOV氏による、本酵素に関する講演を聴講した。本講演中で、新たな活性向上の変異型酵素の報告を受けた。上記と同様の手法による計算によりG171A、V118T、R420Qの変異型酵素に活性向上の推定がなされた。ロシア側とのディスカッションにより、富山県立大学側が、これらの変異型酵素を作成して速度論解析を行うという具体的な研究分担を行った。さらに、富山県立大学側から、本酵素の基質である ω -ラウロラクタムと生成物である12-アミノラウリン酸を各25gスベダス教授のグループに提供した。

本共同研究にて明らかにされたD-アミノペプチダーゼの特異的なアミノ酸残基Lys65に関する論文を、「Bioinformatic Analysis, Molecular Modeling of Role of Lys65 Residue in Catalytic Triad of D-aminopeptidase from *Ochrobactrum anthropi*」と題して平成22年4月に、*Acta Naturae*に発表した。また、モスクワ大学大学院博士課程I.G. Khaliullinは、国際学会Biocatalysis 2010にて「The Role of Lys65 Residue in Catalytic Triad of D-aminopeptidase from *Ochrobactrum anthropi* Revealed by Bioinformatic Analysis and Molecular Modeling」と題し、ポスター発表を行った。