

新規の環状ジペプチド脱水素酵素とその活性測定法の確立

神崎 浩・赤澤 和美・井村 大輔・仁戸田照彦

(生物資源開発学講座)

Novel Cyclic Dipeptide Dehydrogenase and Assay Method for Its Activity

Hiroshi Kanzaki, Kazumi Akazawa, Daisuke Imura
and Teruhiko Nitoda

(Department of Bioresources Chemistry)

The cell-free extract prepared from cells of an albonoursin-producing actinomycete *Streptomyces* sp. KO2388 was found to catalyze the dehydrogenation of cyclo (L-Phe-L-Leu) (CFL) to albonoursin. This is the first report for the dehydrogenation at the α , β -positions of amino acid residues. The simple method for determining the dehydrogenation activity was devised by measuring the increase in UV absorption of the reaction mixture at 317 nm, $\lambda_{\max}$ (ϵ 25,400) of albonoursin, where CFL had no absorption. Phenazine methosulfate was the most active cofactor for the dehydrogenation among several hydrogen acceptors.

Key words : albonoursin, cyclo (Phe-Leu), dehydrogenation, phenazine methosulfate

緒 言

天然には、アミノ酸から派生した二次代謝産物が数多く存在し、興味深い生理活性を示すことが報告されてきている。アミノ酸は脱アミノ化反応、脱炭酸反応、ペプチド形成のための縮合重合反応などを受けて、それらの化合物に変換される。ペプチド系の化合物の場合、ペプチド結合形成後にさらなる修飾反応を受ける例があり、2重結合の導入、すなわちデヒドロアミノ酸の形成が例として挙げられる。デヒドロアミノ酸を構成成分とする二次代謝産物も天然から数多く単離されており^{1,2)}、そのひとつにアルボノルシンがある。本化合物は放線菌の代謝産物として、Khokhlov と Lokshin によって最初に構造決定されたもので³⁾、我々もウニ胚雌核雄核融合阻害活性を有する化合物として、土壌放線菌 *Streptomyces* sp. KO2388 から単離同定してきた⁴⁾。

デヒドロアミノ酸残基の存在が知られているにもかかわらず、その生合成系については、ほとんど明らかになっていない。そこで我々は、アルボノルシンの生合成について検討してきた。アルボノルシン

がその水素付加体である cyclo (L-Phe-L-Leu) (CFL) から生合成されていると予測し、アルボノルシンの生産培地中に CFL を発酵途中に添加したところ、CFL の添加量に応じてアルボノルシンの生産量が増大する現象を認めた。従って、本アルボノルシン生産菌は CFL からアルボノルシンを生合成していることが明らかとなった。本論文では、その脱水素活性 (Fig. 1) が無細胞抽出液中に抽出されること、およびその活性の簡便な測定法について示す。

材料と方法

Cyclo (L-Phe-L-Leu) の調製

基質となる CFL の合成は、Kopple と Ghazaarian の方法⁵⁾に従い、フェノールを触媒とし、L-Phe-L-Leu (SIGMA) から合成した。精製標品の構造確認は ¹H-NMR スペクトル、紫外吸収スペクトル、赤外吸収スペクトル、質量スペクトル、旋光度の分析を組み合わせで行い、それぞれの測定は、VXR-500 (バリアン)、UV-3000 (島津製作所)、710 FT-IR (ニコ

Received October 1, 1998

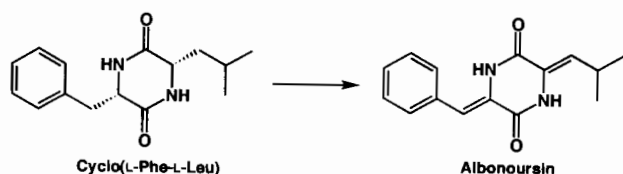


Fig. 1 Dehydrogenation reaction of cyclo (L-Phe-L-Leu) to albonoursin.

レー), SX-102A (日本電子), DIP-360 (日本分光)で行った。

$[\alpha]_D^{25} + 38.0^\circ$ (c 0.1, CH_3COOH). EIMS m/z (rel. int.): 260 (M^+ , 26.0), 204 (39.0), 169 (24.7), 141 (34.2), 113 (25.3), 91 (100.0). IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3300, 3191, 1657, 1494. UV λ_{max} (MeOH) nm (ϵ): 247 (110), 252 (280), 256 (338), 263 (260). NMR δ_{H} ($\text{DMSO}-d_6$): 0.12 (1 H, m), 0.58 (3 H, d, $J=6.4\text{Hz}$), 0.63 (3 H, d, $J=6.7\text{Hz}$), 0.75 (1 H, m), 1.42 (1 H, m), 2.83 (1 H, dd, $J=4.9, 13.4\text{Hz}$), 3.13 (1 H, dd, $J=3.7, 13.4\text{Hz}$), 3.47 (1 H, m), 4.16 (1 H, ddd, $J=1.5, 3.7, 4.9\text{Hz}$), 7.13 (2 H, d, $J=7.9\text{Hz}$), 7.22 (1 H, t, $J=7.6\text{Hz}$), 7.27 (2 H, dd, $J=7.6, 7.9\text{Hz}$), 8.07 (1 H, br.s), 8.09 (1 H, br.s).

アルボノルシン生産菌の培養と無細胞抽出液の調製

Streptomyces sp. KO2388株を ϕ 18試験管中のベネット寒天培地 (培地1リットル当たり酵母エキス1 g, 牛肉エキス1 g, NZ アミンA型2 g, グルコース10 g, 寒天15 g, pH7.3) 上で28°C, 14日間培養し, 十分に胞子を形成させる。試験管1本に, 2滴のTriton X-100を含む滅菌水10mlを注入し, 胞子懸濁液を作成する。胞子懸濁液40 μ lを, アルボノルシン生産の最適培地 KP (培地1リットル当たりグルコース15 g, グリセロール10 g, ポリペプトン10 g, 牛肉エキス10 g, 炭酸カルシウム5 g, pH7.3)を40 ml含む200ml容三角フラスコに植菌し, 培養を開始する。培養は28°C, 回転振とう(180rpm)により行い, 冷却遠心分離により細胞を集め, 一度生理食塩水で洗浄後, 10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) に懸濁する (緩衝液10ml当たり湿重量2 g)。この細胞懸濁液を, 超音波処理 (久保田201M超音波発生装置) 後, 遠心分離して得られた上清を無細胞抽出液として以降の実験に用いた。

酵素活性測定法

1.5 g/l の CFL の DMSO 溶液50 μ lと10mM リ

ン酸ナトリウム緩衝液430 μ lを光路長1 cmの石英セルに入れて37°Cで予保温し, 酵素溶液の添加で反応を開始する。反応開始後317 nmの吸光度の増加を分光光度計で連続的に測定し, 1分間当たりの増加値を求める。この増加値とアルボノルシンの317 nmにおけるモル分子吸光係数25,400から活性を計算する。酵素1 unitは1分間に1 μ molのアルボノルシン生成を触媒する酵素量とする。

タンパク質量はバイオラッド社のタンパク質アッセイキットで牛血清アルブミンを標準試料として測定し⁶⁾, 比活性はタンパク質1 mg当たりの活性として計算した。

アルボノルシンの定量法

酵素反応により生成するアルボノルシンの分離定量は ODS-HPLC により行った。カラムに Inertsil ODS-3 (4.6 $\times$ 250mm, GL Sciences) を, 溶媒として60%メタノールを用い, 流速1.0ml/minで分離し, 317nmの吸光度で定量した。この条件でアルボノルシンは19.5分に溶出され, 酵素反応液中の他の成分と完全に分離された。

結 果

無細胞抽出液中の CFL 脱水素活性の確認

発酵生産の途中に, CFL を添加した場合にアルボノルシンの蓄積の増加が認められたことから, CFL からアルボノルシンへの変換活性が無細胞抽出液中に存在するかどうか, すなわち目的の酵素が細胞質画分に存在するかどうかを確認することにした。無細胞抽出液と CFL をリン酸ナトリウム緩衝液中で30°C, 15時間反応させて得られた反応液を HPLC 分析に供した。反応直前の反応液の分析と比較すると, 15時間反応により, 基質である CFL の減少とともにアルボノルシンの増加が観察された。この活性は無細胞抽出液の代わりに, 同量の休止菌体を用いたときの変換活性に匹敵していた。従って, CFL を脱水素し, アルボノルシンを合成する反応を触媒する酵素が無細胞抽出液中に効率よく抽出されることが判明した。

CFL 脱水素活性の簡便測定法

無細胞抽出液中に CFL からアルボノルシンへの変換を触媒する酵素活性が抽出されることが判明したので, その活性をより簡便にかつ定量的に測定する方法を確立することにした。アルボノルシンは長

い共役系を有しているため、317nm に極大を有する特異的な紫外吸収スペクトルを示すが、基質である CFL にはその付近に極大吸収は存在しない (Fig. 2)。従って、酵素反応中連続的に 317nm の吸収を追跡すれば、アルボノルシンの単位時間当たりの生成量が判明し、それを基に酵素活性が求められると考えた。そこでまず、反応液の吸収スペクトルの変化をフォトダイオードアレイ型の分光光度計 (Shimadzu MultiSpec-1500) で追跡した。反応開始前のスペクトルと反応 1 分後、2 分後、3 分後の差スペクトルを Fig. 3A に示した。明らかにアルボノルシンと類

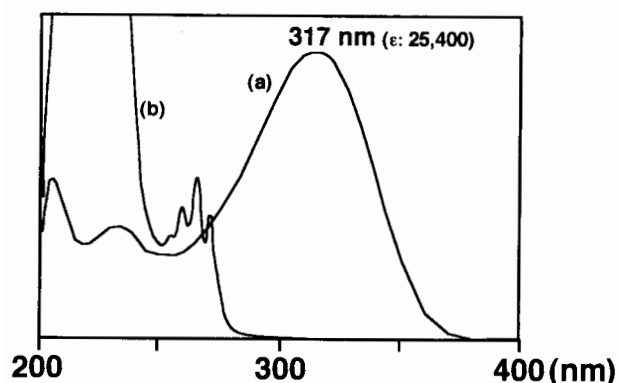


Fig. 2 UV absorption spectra of albonoursin (a) and cyclo (L-Phe-L-Leu) (b).

似のスペクトルが観察され、かつその吸収は時間に比例して増大することがわかる。Fig. 3B に同じ反応液の 317nm の吸光度変化のみを抽出して示した。その吸光度の増加は時間に比例しており、酵素活性をこの吸光度の増加で評価可能であることが判った。本方法は簡便でありかつ短時間で測定が可能であることから、今後の本酵素の精製および諸性質の検討に大いに役立つことが期待できる。なお、基質である CFL が水に難溶であったため、DMSO 溶液として反応液に添加したが、この量の DMSO では本酵素活性はほとんど阻害を受けなかった。

CFL 脱水素反応に最適な水素受容体

本反応は脱水素反応であるため、水素受容体が必要である。無細胞抽出液レベルでは菌体由来の受容体が存在するため、活性は受容体無添加でも測定可能であったが、今後の酵素の精製の各段階で酵素活性を的確に測定するためには、最適の水素受容体を決定しておく必要がある。そこで、研究室で入手可能な脱水素酵素に関与する補酵素、NAD、NADP、FAD、PMS、DCIP についてその水素受容体としての活性を調べた。Table 1 に示したように、試験した受容体の内 PMS が無添加の時の 5.8 倍の活性を示したことから、本酵素活性測定に最適の水素受容体

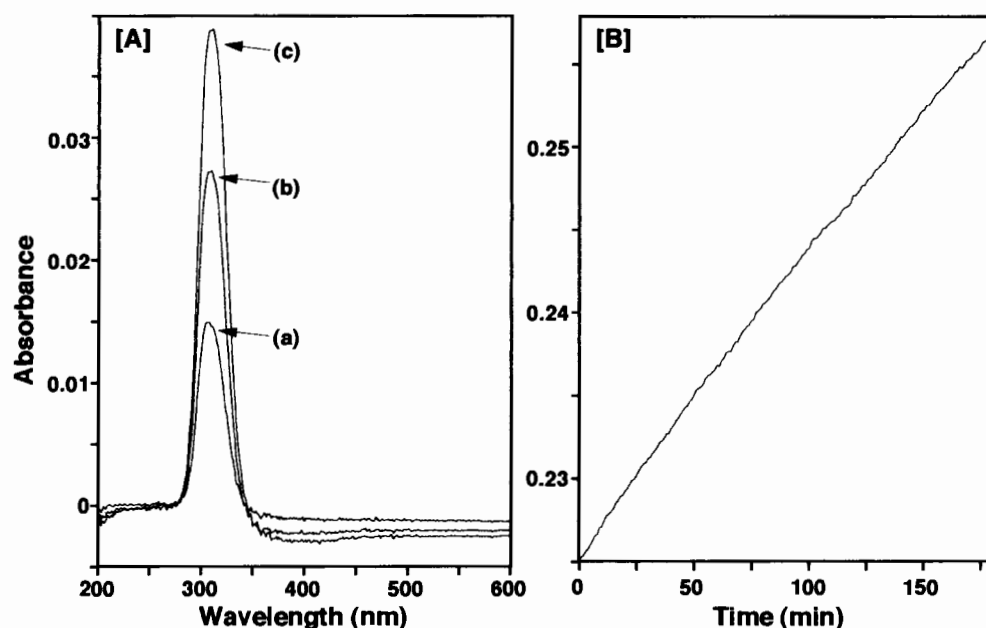


Fig. 3 Alteration in UV absorption spectra during CFL dehydrogenation.

[A] : difference spectra of the reaction mixture between at 0 min and the respective reaction times; (a) 1, (b) 2, and (c) 3 min.

[B] : increase in absorbance at 317nm.

Table 1 Optimal hydrogen acceptor for CFL dehydrogenation

Hydrogen acceptor	CFL dehydrogenation activity	
	units/mg	relative activity
None	3.28×10^{-3}	100
Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) (0.2mM)	2.80×10^{-3}	85
Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) (0.2mM)	4.40×10^{-3}	134
Flavin adenine dinucleotide (FAD) (0.4mM)	4.51×10^{-3}	137
Phenazine methosulfate (PMS) (0.4mM)	1.91×10^{-2}	582
2, 6-Dichlorophenolindophenol (DCIP) (0.1mM)	8.51×10^{-3}	260
PMS (0.4mM)+DCIP (0.1mM)	7.61×10^{-3}	232

と判断し、以降の酵素活性測定は PMS 存在下で行うことを決定した。

考 察

本論文において CFL からアルボノルシンへの脱水素反応を触媒する酵素の存在を明らかにしたが、デヒドロアミノ酸の存在は各種のペプチド系化合物で報告されているにもかかわらず、アミノ酸残基の α , β -位でのこのような脱水素反応の存在についての報告例はこれまでになかった。他のデヒドロアミノ酸含有ペプチドの生合成に関わる酵素が本酵素と類似している可能性、さらにはこれらの酵素が同一の祖先から進化したという可能性が考えられるので、この酵素の存在が明らかにされたことにより、デヒドロアミノ酸含有ペプチド類の代謝研究が飛躍的に進歩することが期待される。

デヒドロアミノ酸の生合成についてはこれまでに唯一、乳酸菌の生産するバクテリオシンであるランチビオティックの生合成において報告されている⁵⁾。すなわちランチビオティック中に含まれる異常アミノ酸、ランチオニンおよびその 3-メチル誘導体の生成がそれぞれデヒドロアラニン、デヒドロプロリンを中間体としていること、さらにそれらデヒドロアミノ酸がセリン、スレオニンの脱水反応によって生成することが知られている。しかしながら、天然には、セリンやスレオニン以外のアミノ酸から派生したと考えられるデヒドロアミノ酸構造が数多く知られており、それらの場合、相当するヒドロキシアミノ酸の存在はこれまでに報告されていないことから、ランチビオティックの場合の脱水反応によるデヒドロアミノ酸残基の生成は、かなり特殊であり、今回我々が見いだした脱水素反応によるデヒドロアミノ

酸残基の生成経路が天然に普遍的に存在すると予測される。

アミノ酸の脱水素反応は数多く知られているが、それらは酸化脱アミノ化反応であり、アミノ基の脱離を伴う。一方、本論文で初めてその存在を明らかにした脱水素反応は不飽和化反応とも言い換えられる反応であり、アミノ酸代謝において非常にユニークであり、それを触媒する酵素についてはほとんど知見が蓄えられていない。従って、本酵素が無細胞抽出液レベルで安定に活性を保持していることを考え合わせると、本酵素が精製できれば、脱水素酵素の研究分野に新たな知見を供給できるものと期待される。

要 約

アルボノルシン生産菌、*Streptomyces* sp. KO2388 株の無細胞抽出液が、cyclo (L-Phe-L-Leu) からアルボノルシンへの脱水素反応を触媒する事を明らかにした。アミノ酸残基の α , β -位での脱水素反応を酵素レベルで明らかにしたのはこの報告が初めてである。本反応の簡便な測定法として、基質 cyclo (L-Phe-L-Leu) には認められない、アルボノルシンの特異的な 317nm における紫外吸収の増加を測定する方法を考案した。本方法を用いて数種の水素受容体を試験したところ、フェナジンメトサルフェートが最も有効であると判った。

謝 辞

この研究は平成10年度の岡山大学学内特別研究『人間環境保全に有効な生物種の開発と育成に関する研究』を分担して行ったものである。本研究を開始するに当たり、多大なご助言をいただいた岡山大学農学部名誉教授河津一儀博士に深甚

なる謝意を表する。また、NMR および質量スペクトル測定に際しては、それぞれ、岡山大学超伝導核磁気共鳴実験室、岡山大学農学部質量分析室を利用させていただいた。とも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) Khokhlov, A. S. and Lokshin, G. B. : The structure of albonoursin, *Tet. Lett.*, **27**, 1881-1885 (1963)
- 4) 小林昭雄, 大江和人, 矢田伸二, 河津一儀: 微生物の生産する微小管配向制御物質, 第31回天然有機化合物討論会講演要旨集, 388-395 (1989)
- 5) Kopple, K. D. and H. G. Ghazarian : A convenient synthesis of 2, 5-diketopiperazines, *J. Org. Chem.*, **33**, 862-864 (1968)
- 6) Bradford, M. M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976)
- 7) 園元謙二, 松崎弘美, 石崎文彬: 乳酸菌が生産するバクテリオシン, *バイオサイエンスとインダストリー*, **54**, 492-496 (1996)