

新規ポリアミノ酸生産菌の探索

Screening of newly poly (amino acid)-producing microorganisms

石井 義孝¹, 國吉 紗由美¹, 山根 早優子¹, 石崎 里美¹, 青柳 大介², 木野 邦器²

¹大妻女子大学社会情報学部, ²早稲田大学大学院先進理工学研究科

Yoshitaka Ishii¹, Sayumi Kuniyoshi¹, Sayako Yamane¹, Satomi Ishizaki¹, Daisuke Aoyagi², and Kuniki Kino²

¹School of Social Information Studies, Otsuma Women's University

2-7-1 Karakida, Tama-shi, Tokyo, Japan 206-8540

²Faculty of Science and Engineering, Waseda University

3-4-1 Ohkubo, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan 169-8555

キーワード：ポリアミノ酸, ペプチド, 微生物探索

Key words : Poly (amino acid), Peptide, Screening

抄録

生体適合性や機能性材料への利用可能なポリアミノ酸を見出すことを目指し、新規な構造を有するポリアミノ酸を生産する微生物を探索した。色素排除法を利用した塩基性物質生産菌の探索を通して、*Penicillium* 属K9A株と*Penicillium* 属K17G株を取得した。MALDI-TOF-MS分析の結果、K9A株は、分子量は $128 \times n + 32$ で表されるポリマーを生産しており、リジンの繰り返し構造を持つポリマーと予想された。また、K17G株は、分子量が $208 \times n + 153$ で表されるポリマーを生産している。しかし、分子量間隔208に相当する蛋白質性の20種類のアミノ酸はなく、新規な塩基性ポリマーの可能性が示唆された。

1. 背景

ペプチドは近年注目を集めている機能性食品、医薬品原料および生分解性材料として期待されている有機素材である。例えば、ジペプチドでも血圧降下、抗潰瘍、鎮痛などといった様々な生理活性が明らかとなっている。しかし、生理活性が報告されているペプチドの多くは10残基以上のオリゴペプチドであり、効率的な任意配列オリゴペプチド合成プロセスが求められている。有機合成法では、アミノ酸の官能基の保護・脱保護という煩雑さを伴い、キラリティー（光学活性）のコントロールが困難である。また、酵素法では、キラリティー（光学活性）の高い合成が可能となるが、ペプチダーゼなど分解酵素の逆反応を利用する従来の方法では、官能基の保護が必要であり、効率やコスト面で問題がある。一方、微生物では、納豆の糸の主成分であり、吸水性素材として砂漠緑化などへの利用が検討されている Poly- γ -glutamic acid (PGA, 平均分子量 2,000,000) に代表されるように、極めて長鎖のペプチドがリボソーム翻訳系を介さずに効率良く合成している。

リボソーム翻訳系を介さずにペプチドを合成する代表例として、ペプチド系抗生物質の合成によく見られる非リボソーム型ペプチド合成酵素

(NRPS, non-ribosomal peptide synthetase) があり、任意配列ペプチドの合成に向けて盛んに研究が行われているが、一般に NRPS はその分子量が大きくペプチド生産と言う観点では取扱が容易ではない。一方、PGA に代表されるポリアミノ酸には、食品添加物に利用されている ϵ -Poly-L-lysine (ePL) や窒素貯蔵物質と考えられている Cyanophycin (multi-L-arginyl-poly (L-aspartic acid)) があり、その合成機構が近年明らかとなりつつある。最新の報告では、ePL は分子量の小さい繰り返し型の NRPS^[1], PGA と Cyanophycin はアミドリガーゼであることが報告され^[2], リボソーム翻訳系を介さずにペプチドを合成する分子量の小さい酵素として、その応用研究が盛んに行われている。

他方、近年 ePL 生産菌の中から新規な塩基性ポリアミノ酸である Poly (L-arginyl-D-histidine)

(PRH) を生産する子囊菌 *Verticillium kibiense* E18 株が報告された^[3]。PRH は抗菌活性を有し、 α -ペ

プチド結合により L 体と D 体のアミノ酸が交互に繰り返すポリアミノ酸で、その重合度が 4~6 と狭い重合度の幅という構造的な特長を有する。これまで盛んに研究されてきた PGA や ePL は、それぞれ γ -ペプチド結合、 ϵ -ペプチド結合であるのに対し、PRH は α -ペプチド結合を有するため、生理活性を有する任意配列オリゴペプチド合成には好適である。しかしながら、これまでに見つかっている微生物由来のポリアミノ酸合成の数は少なく、生理活性を有する任意配列オリゴペプチド合成には不十分である。したがって、多様なポリアミノ酸の合成機構の解明に向けて新たなポリアミノ酸生産菌の取得が必要不可欠である。

本研究では、新規ポリアミノ酸生産菌の取得を目的として、色素排除を指標とした新規ポリアミノ酸生産菌の探索ならび生成物の分析を行った。

2. 方法

2.1. 使用培地

微生物の探索には炭素源としてグルコースを用いた最少培地である SG 培地^[4]に 1.5% の Bacto Agar を加えた SG 寒天平板培地に、0.002% のメチレンブルーを添加した培地を使用した。また、菌株の保存には、標準寒天培地およびポテトデキストロス寒天培地を使用した。

2.2. 色素排除法による候補株の選定

スパチュラ 1 杯程度の土壌試料を 1.5ml プラスティックチューブに入れ、1ml の生理食塩水を加える。ボルテックスミキサーで十分攪拌した後、しばらく静置する。上清を 100 μ l 分取し、メチレンブルー入り SG 寒天培地に塗布した。30 $^{\circ}$ C で 1 週間程度培養した。寒天培地上にハコを形成したコロニーをメチレンブルー入り SG 寒天培地に単離し、30 $^{\circ}$ C で培養を行った後、色素排除を示したコロニーを候補株に選定した。

2.3. 分離株の同定

候補株の同定は rDNA 解析により行った。原核生物の場合は 16S rRNA をコードする 16S rDNA 領域、あるいは真核生物の場合は 28S rDNA 領域の配列に対する BLAST プログラムによる相同性検索 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) によって属名を決定した。16S rDNA 領域の解析には、U1 (Universal 1) および U2 プライマーを用いて PCR で増幅し、U3 プライマーを用いて増幅断片の塩基配列を決

定した。28S rDNA 領域の解析は、ITS5 プライマーと LR6 プライマーを用いて PCR で増幅し、増幅断片をクローニングした後、塩基配列を決定した。

2.4. 塩基性物質の分析

得られた候補株が生成する塩基性物質の分析は以下の様に行った。候補株を SG 液体培地で 30 $^{\circ}$ C、2 週間培養を行った。培養液のろ液 12ml を pH7.0 に調整し、固相抽出法により塩基性物質を抽出した。固相抽出には、弱陽イオン交換カラム Sep-Pak Light Accell Plus CM カートリッジを用いた。固相抽出カラムに pH を調整したろ液を注入した後、0.1M 酢酸 3ml で洗浄し、0.1M 塩酸 1.2ml で溶出し、精製・濃縮サンプルを調製した。精製した塩基性物質は HPLC によって分析を行った。HPLC の分析条件は既報^[5]に従った。HPLC 分析で塩基性物質を検出できた場合には、MALDI-TOF-MS 分析を行い、ポリマーの有無について確認を行った。MALDI-TOF-MS 分析のマトリクスには 2,5-ジヒドロキシ安息香酸を使用した。

3. 結果および考察

3.1. 色素排除法による候補株の選定

新規ポリアミノ酸生産菌の探索においては、東京都、神奈川県、栃木県、和歌山県の各所から合計 88 個の土壌サンプルを採取した。色素排除法による微生物探索を行った結果、塩基性（カチオン性）物質を生産する微生物を 25 株取得した。この 25 株について、単離株を用いた色素排除を検討した結果、8 株が明確な色素排除を示した。

色素排除は、微生物の生産する塩基性物質（正に荷電）が菌体外に放出され、寒天培地内を拡散していくことで、青色の色素物質であるメチレンブルー（正に荷電）を静電反発により外側に押しやり形成される。従って、明確な色素排除を示した 8 株を候補株とした。

3.2. 生成物の確認

明確な色素排除を示した候補株である K1A 株、K8B-1 株、K9A 株、K11A 株、K17G 株、YS 株、KM 株および MM6 株について生成物の分析を行った。生成物の分析は、HPLC 分析および MALDI-TOF MS 分析を行った。HPLC 分析の結果、K9A 株と K17G 株の 2 株において、保持時間 14.7 分付近に明瞭なピークが確認できた。

候補株 K9A 株について、さらに MALDI-TOF MS

分析を行った結果、ネガティブモードにおいて分子量間隔が 127 から 128 のポリマー様のピークを検出した。アミノ酸が結合してポリマーと考えた場合、モノマーの分子量はポリマーの分子量間隔に水分子の分子量 18 を加算した値に等しい。したがって、分子量 146 (=128+18) に相当するリジンの繰り返し構造を持つものと予想される。また、分子量は $128 \times n + 32$ で表され、ポリリジンの末端が修飾されていると考えられる。分子量 32 に相当する修飾としては、メタノールエステルが考えられる。

候補株 K17G 株について、さらに MALDI-TOF MS 分析を行った結果、ネガティブモードにおいて分子量間隔が 208 のポリマー様のピークを検出した。また、分子量は $208 \times n + 153$ で表される。しかし、分子量 208 に相当する蛋白質性の 20 種類のアミノ酸にはこの分子量に相当するものはなく、非天然アミノ酸や修飾アミノ酸などが結合していると考えられる。

3.3. 候補株の同定

MALDI-TOF-MS 分析の結果、ポリマー様のピークが検出された候補株 K9A 株と K17G 株について、属種の同定を行った。両株からゲノム DNA に対して 16S rDNA の増幅を行ったが増幅断片は検出されなかった。また、コロニー形状からカビと推定されたので、18S-26S rDNA 配列による属の同定を行った。同定の結果、K9A 株および K17G 株ともに *Penicillium* 属であった。

4. まとめと展望

ポリアミノ酸は、生分解性、抗菌性、高吸水性などの機能を持つ有用物質であるため、機能性食品、医薬品原料、複合材料などへの応用の可能性がある。本研究では生体適合性や機能性材料への利用可能なポリアミノ酸を見出すことを目指し、新規な構造を有するポリアミノ酸を生産する微生物を探索した。

色素排除法を利用した塩基性物質生産菌の探索を通して取得した候補株について、HPLC 分析と MALDI-TOF MS 分析を行った結果、K9A 株と K17G 株にポリマー構造を有すると推測されるピークを確認した。同定の結果、両株とも *Penicillium*

属であった。しかしながら、両株で生産している塩基性物質は異なっていた。K9A 株において、分子量間隔 128 に相当するリジンの繰り返し構造を持つポリマーと予想された。分子量は $128 \times n + 32$ で表され、ポリリジンの末端が修飾された物質と考える。分子量 32 に相当する修飾としては、メタノールエステルが考えられるが、さらなる検討が必要である。また、K17G 株において、分子量間隔が 208 のポリマー様ピークが検出された。しかし、分子量間隔 208 に相当する蛋白質性の 20 種類のアミノ酸はなく、分子量が $208 \times n + 153$ で表されるポリマーであることから、末端に大きな置換基を有していることが推察される。このような塩基性ポリマーの報告はなく、今後酸加水分解による生成物の分析などを通して、非天然アミノ酸や修飾アミノ酸なども含めた検討とともにペプチド性物質の確認を行う必要がある。

謝辞

本研究は、JSPS 科研費 22603013 の助成および大妻女子大学戦略的個人研究費 (S2606) の助成を受けたものである

引用文献

- [1] Yamanaka K et al. ϵ -poly-L-lysine dispersity is controlled by a highly unusual nonribosomal peptide synthetase, *Nat. Chem. Biol.*, 2008, 4, p.766-772
- [2] Ashiuchi M et al. A poly- γ -glutamate synthetic system of *Bacillus subtilis* IFO 3336: gene cloning and biochemical analysis of poly- γ -glutamate produced by *Escherichia coli* clone cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 1999, 263, p.6-12
- [3] Nishikawa M et al. Antimicrobial activity of a chelatable poly (arginyl-histidine) produced by the ergot fungus *Verticillium kibiense*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004, 48, p.229-235
- [4] Nishikawa M et al. Distribution of microbes producing antimicrobial ϵ -poly-L-lysine polymers in soil microflora determined by a novel method. *Appl Environ Microbiol* 2002, 68, p.3575-3581
- [5] Kurihara I et al. Enhancement of poly (arginyl-histidine) production by *Verticillium kibiense* E18. *Biochem Eng J* 2008, 42, p.270-275

Abstract

Two cationic polymer compound-producing microorganisms, *Penicillium* sp. K9A and K17G, were newly isolated by screening using cationic dye, methylene blue. MS analysis revealed that the molecular weight of the cationic polymer compound produced by K9A was shown based on the formula $128 \times n + 32$. It suggests that the polymer produced by K9A may be poly-lysine. The molecular weight of the cationic polymer produced by K17G was shown based on the formula $208 \times n + 153$, it suggests that this polymer might be a novel cationic polymer.

(受付日 : 2015 年 6 月 27 日, 受理日 : 2015 年 7 月 7 日)

石井 義孝 (いしい よしたか)

現職 : 大妻女子大学社会情報学部 教授

早稲田大学大学院理工学研究科修士課程修了 博士 (工学)

専門は応用生物化学. 微生物を利用した環境調和型の有用物質生産に関する研究を展開している. 現在は, 特にポリアミノ酸の生産や利用を中心に研究を行っている.

主な著書 : 生命科学概論—環境・エネルギーから医療まで— (共著, 朝倉書店)