

# 放線菌の産生するアミノアシラーゼ阻害剤の検索と単離同定、並びにその性質

田中英彦・稲垣賢二

(生物資源開発学講座)

Received June 15, 1992

## Isolation, Identification and Characterization of the Aminoacylase Inhibitors from Actinomycetes

Hidehiko TANAKA and Kenji INAGAKI

(Department of Bioresources Chemistry)

We carried out the screening of aminoacylase inhibitors from actinomycetes, and found two kinds of inhibitors in the culture broth. One of them, purified to homogeneity by various column chromatographies, was identified as racemic lactic acid by comparison with the authentic compound on the basis of studies by nuclear magnetic resonance, mass, and infrared spectrometries. Only its L-isomer, however, showed inhibitory activity, and the enzyme activity was inhibited non-competitively in L-lactic acid against *N*-acetyl-L-methionine. Several other  $\alpha$ -hydroxy-carboxylic acids, such as L- $\alpha$ -hydroxy-n-caproic acid and L- $\beta$ -phenyl-lactic acid, inhibited the aminoacylase reaction with a higher inhibitory activity than L-lactic acid.

### 緒 言

生体内には多くの*N*-アシル化されたアミノ酸が存在する。例えば、植物の発芽時には多量のアシルアミノ酸が生産される。このアシルアミノ酸を有機酸とアミノ酸に加水分解する酵素としてアミノアシラーゼ (EC 3. 5. 1. 14) が知られている。本酵素は、動物組織<sup>1,2)</sup>や細菌、糸状菌<sup>3-6)</sup>等の微生物に広く存在する。その基質特異性は低く、ジペプチド類も水解することが出来る。しかし、その光学特異性は高く、L-アミノ酸の*N*-アシル基を選択的に切断する。この性質を利用して、DL-アミノ酸の光学分割によるL-アミノ酸の製造法が確立されている<sup>7)</sup>。しかし、本酵素の詳細な生理学的及び酵素化学的な研究は、ほとんど進展していない。そこで、その阻害剤を検索することは、アミノアシラーゼを研究する上で、一つのアプローチと考えられる。本阻害剤の検索は現在まで全くなされていない。本研究は、放線菌の生産する本酵素阻害剤を単離同定し、その阻害反応機構を解明することを目的とした。検討の結果、2種の阻害剤が検出され、その一つはL-乳酸であることが見いだされた。また、この構造から推定される幾つかの化合物、 $\alpha$ -ヒドロキシ-*n*-カプロン酸や $\beta$ -フェニル乳酸などがアミノアシラーゼの強力な阻害剤になることが認められた。

### 材 料 と 方 法

#### 使用菌株と培養条件

土壌より単離した放線菌を、Waksman 培地 (1% glucose, 0.5% meat extract, 0.5% peptone, 0.5% NaCl, pH 7.0) 中、28.5°C で対数増殖後期まで振とう培養した。

### アミノアシラーゼ阻害活性測定法

標準反応混液は、120mM Britton-Robinson's 緩衝液 (pH 8.0) 900 $\mu$ l, 2.5mM CoCl<sub>2</sub> 100 $\mu$ l, 500mM *N*-アセチル-L-メチオニン (pH 7.0, 第一化学薬品) 100 $\mu$ l, 本阻害試料液100 $\mu$ l, 0.4U/ml アミノアシラーゼ I (EC 3. 5. 1. 14, from *Aspergillus oryzae*, 天野製薬) 50 $\mu$ l で構成した。反応はあらかじめ基質以外のものを30°Cで5分間インキュベートした後、基質を添加することにより開始した。30°Cで30分間インキュベートした後、25%トリクロロ酢酸200 $\mu$ l を添加して反応を停止させ、その溶液を8,000rpm で10分間遠心分離した。その上澄500 $\mu$ l を等量のヒドリンダンチンニンヒドリン試薬<sup>8)</sup>と混合し、湯浴中100°Cで15分間加熱した。その後、直ちに50% 2-プロパノール1.5ml を加えて冷却した。酵素活性は Beckman DU-65 分光光度計を用い、その溶液の570nm の吸光度を測定することにより求めた。基質を添加する前の反応混液にあらかじめトリクロロ酢酸を加えたものを酵素反応のブランクとした。また、上記の阻害試料液の代わりに脱塩水を用いたものを阻害活性測定用のコントロールとした。阻害活性は次式に従って算出した。

$$\text{阻害活性 (\%)} = [B - A/B] \times 100$$

A: 阻害試料液を含む反応系の Abs<sub>570</sub>

B: コントロールの Abs<sub>570</sub>

### 阻害物質の精製

KY-11株の培養液10lを2N HClでpH 3.0とし、等量の酢酸エチルで2回抽出を行った。その酢酸エチル層を5% NaHCO<sub>3</sub>で逆抽出し、その水層を再び2N HClでpH 3.0としてから、等量の酢酸エチルで2回抽出を行った。その酢酸エチル層をロータリーエバポレーターで濃縮し、酢酸エチル抽出画分を得た。これを下記に示す各種クロマトグラフィーに供した。

Step 1. 得られた酸性抽出画分をシリカゲルシラナイズドカラム(2.5mm × 30cm, Merck)に供した。溶出は30%, 40%, 50%メタノール (MeOH) 各150ml, 流速1.5ml/minで行い、5ml ずつ分画した。

Step 2. シリカゲルシラナイズドカラムにおいて30% MeOHで溶出された活性画分をロータリーエバポレーターで濃縮し、TSKgel OApak カラム (7.8mm × 30cm, 東ソー)を用いた Waters 600E マルチソルベントシステムで分離した。溶出は0.75mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 流速0.5ml/minで、検出は210nmで行った。

Step 3. TSKgel OApak カラムでの HPLC に於ける活性画分を集め、 $\mu$ BONDASPHERE 5 $\mu$  C<sub>18</sub>-100 Aカラム (19mm × 15cm, Waters)を用いた Waters 600E マルチソルベントシステムで分離した。溶出は30% MeOH, 流速2.5ml/minで、検出は210nmで行った。

### 各種機器分析法

<sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR 分析は、共に D<sub>2</sub>O 中で Varian 核磁気共鳴装置 (VXR 500) により行った。<sup>13</sup>C-NMR 分析における内部標準として、1, 4-ジオキサンを用いた。IR 分析は KBr 法により日立赤外分光光度計 (model EPI-G3) を用いて行った。質量分析は日本電子社製 (JMS -D300) を用いて行った。

### 光学活性の決定法

KY-11株の培養液から精製された乳酸の比旋光度は、旋光度計 (日本分光) を用いて測定した。また本乳酸を基質として D-及び L-乳酸デヒドロゲナーゼ反応を行わせた。標準反応混液は0.1M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 70 $\mu$ l, 500mM 乳酸ナトリウム 10 $\mu$ l, 50mM NAD<sup>+</sup> (KOHJIN) 10 $\mu$ l, 0.1U/ml D-乳酸デヒドロゲナーゼ (EC 1. 1. 1. 28, from Microorganism, TOYOBO) または L-乳酸デヒドロゲナーゼ (EC 1. 1. 1. 27, from Bovine Heart, Sigma) 10 $\mu$ l で構成した。反応はあらかじめ酵素以外の成分をキュベット中で30°Cで5分間インキュ

べートした後、酵素液を添加することにより開始した。酵素反応の進行は、生成された NADH の 340nm の吸光度の増加を測定することにより確認した。

## 結果と考察

### 放線菌の生産するアミノアシラーゼ阻害物質の検索

*Aspergillus oryzae* 由来のアミノアシラーゼ I を対象酵素に用い、土壌より分離した放線菌株 (約 70 株) の培養濾液の酢酸エチル抽出物を用いてその阻害物質の検索を行った。Table 1 に示すように数株得られた。中でも KY-11 株の培養液は活性が最も強く、生育も良好であったことにより、以後の実験は KY-11 株よりその阻害物質を単離同定することにした。本菌の生育と阻害物質の産生の関係から、強い阻害活性は対数増殖後期の培養液に認められた。

### 阻害物質の精製

KY-11 株の生産するアミノアシラーゼ阻害物質は酸性条件下 (pH 3.0)、酢酸エチルで効率よく抽出されたが、中性 (pH 7.0) 及びアルカリ性 (pH 11.0) 条件下では効率よく抽出されなかった。この結果から KY-11 株の生産する阻害物質は酸性物質であることが示唆された。酸性抽出画分をシリカゲルシラナイズド逆相クロマトグラフィーに供したところ、二つの活性画分が観察された (Fig. 1)。本研究では 30% MeOH で溶出される画分の単離精製を試みた。実験の項に示したように培養液 10 l からシロップ状物質約 30mg が得られた。本阻害物質の純度検定は 2 種の展開溶媒系 A (2-プロパノール：アンモニア水：水/9：1：2, *R<sub>f</sub>* 0.45) 及び B (ベンゼン：メタノール：酢酸/45：8：4, *R<sub>f</sub>* 0.6) を用いた TLC 分析により確認された。なおその化合物の検出は 0.1% 2, 6-ジクロロフェノールインドフェノールナトリウム液、ヨード及び  $V_{254\text{nm}}$  で行った。

### 阻害物質の同定

各種機器分析により阻害物質の最終精製標品の構造解析を試みた。<sup>1</sup>H-NMR スペクトルでは 1.2ppm と 4.0ppm 付近に 2 つのシグナルが観察された。その積分曲線からプロトンの比が 1：3 であり、両シグナルの多重度並びにスピン結合定数 ( $J=6.95\text{ Hz}$ ) から、1.2ppm のシグナルはメチルプロトンに由来し、4.0ppm のシグナルはそれに隣接するメチンプロトンに由来することが分かった。また <sup>13</sup>C-NMR スペクトルから炭素数は 3 以上で、180ppm にカルボキシル基と思われるシグナルが観察された。IR スペクトルから  $1720\text{ cm}^{-1}$  に  $\text{C}=\text{O}$ 、1150~1200

Table 1 Aminoacylase inhibitory activity of the extract from several strains

Strain No.	pH after growth	Inhibition (%)
KY-01	8.3	0
02	8.1	1
11	4.1	51
21	4.9	0
33	8.5	21
35	7.7	11
37	4.1	0
38	6.5	5
<i>Streptomyces</i> sp. 01	7.2	2
<i>Streptomyces</i> sp. 02	7.6	4
<i>Nocardia</i> sp. 01	8.0	0
<i>Nocardia</i> sp. 02	8.5	0

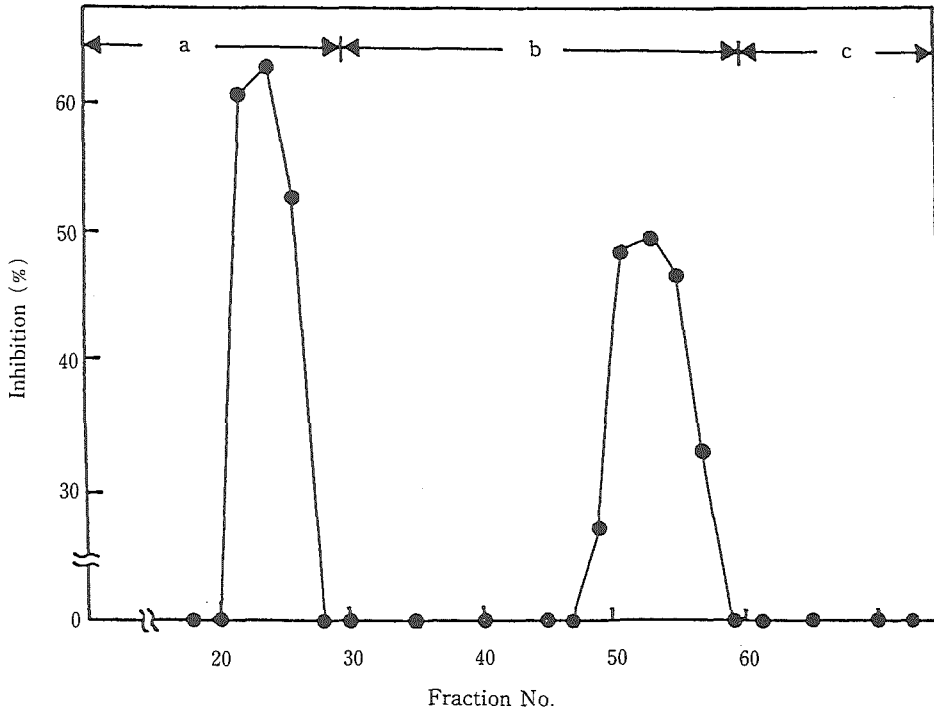


Fig. 1 Silica gel silanized reverse phase chromatography. Ethylacetate extract (1300mg) was applied to a silica gel silanized column, and eluted by stepwise method (a: 30%, b: 40%, c: 50% methanol). An aliquot (100 $\mu$ l) of each fraction was subjected to assay for inhibitory activity. One fraction = 5ml, flow rate = 1.5ml/min.

$\text{cm}^{-1}$ に C-O, 3000~3400 $\text{cm}^{-1}$ に OH の伸縮振動があり, カルボキシル基とアルコール性の OH 基の存在が示唆された. イオン化法として EI法, 並びに反応ガスにイソブタンを用いた CI法による質量分析の結果, 分子量は約90であることが認められた. これらの結果から本阻害物質は乳酸と推定された. 市販の乳酸を用いて上と同様な機器分析を行った結果, それは阻害物質のものと同様一致した. また市販の DL-乳酸にアミノアシラーゼ阻害活性が確認されたことから, 本阻害物質は乳酸であると結論した. 精製された乳酸の比旋光度を測定した結果, 及び本乳酸が D-及び L-乳酸デヒドロゲナーゼ両酵素の基質として作用したことから, KY-11株の培養液から得られたアミノアシラーゼ阻害物質の一つはラセミ乳酸であることが明らかになった. それぞれの光学異性体についてその阻害活性を調べたところ, L体のみ阻害活性が認められた.

#### L-乳酸による阻害機構

本阻害反応において基質濃度を変化させ, 30分間反応させた時の二重逆数プロットをとった結果,  $K_m$ は変化せず,  $V_{max}$ が見掛け上小さくなっていることが観察された. この事実は基質と L-乳酸は全く独立的に酵素に結合することが認められた. 横軸に L-乳酸の濃度, 縦軸に  $1/v$  をとった Dixon プロットから L-乳酸の阻害定数 ( $K_i$ ) は  $0.9+0.1\text{mM}$  と求められた (Fig. 2).

#### 各種の $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸による阻害とその機構

L-乳酸は  $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸であることに着目し, 幾つかの  $\alpha$ -ヒドロキシカルボン

酸及びその類縁体についてアミノアシラーゼ活性に対する影響を調べた。Table 2 に示したように数種の  $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸に阻害活性が認められた。中でもDL- $\alpha$ -ヒドロキシ-n-カプロン酸とL- $\beta$ -フェニル乳酸に高い阻害活性が観察され、その  $K_i$  値はそれぞれ  $15\mu\text{M}$  と  $35\mu\text{M}$  でL-乳酸に比べてかなり低かった。その阻害形式はL-乳酸と同様に非拮抗的であった。DL- $\beta$ -ヒドロキシ-n-酪酸及び光学活性を持たない  $\alpha$ -ヒドロキシイソ酪酸に全く阻害活性が見られないことから、本阻害物質には  $\alpha$  位の水酸基が L 配位していることが必須で、さらにその脂肪族鎖の疎水性が増加するにつれて阻害活性も増加し、また DL-リンゴ酸、酒石酸な

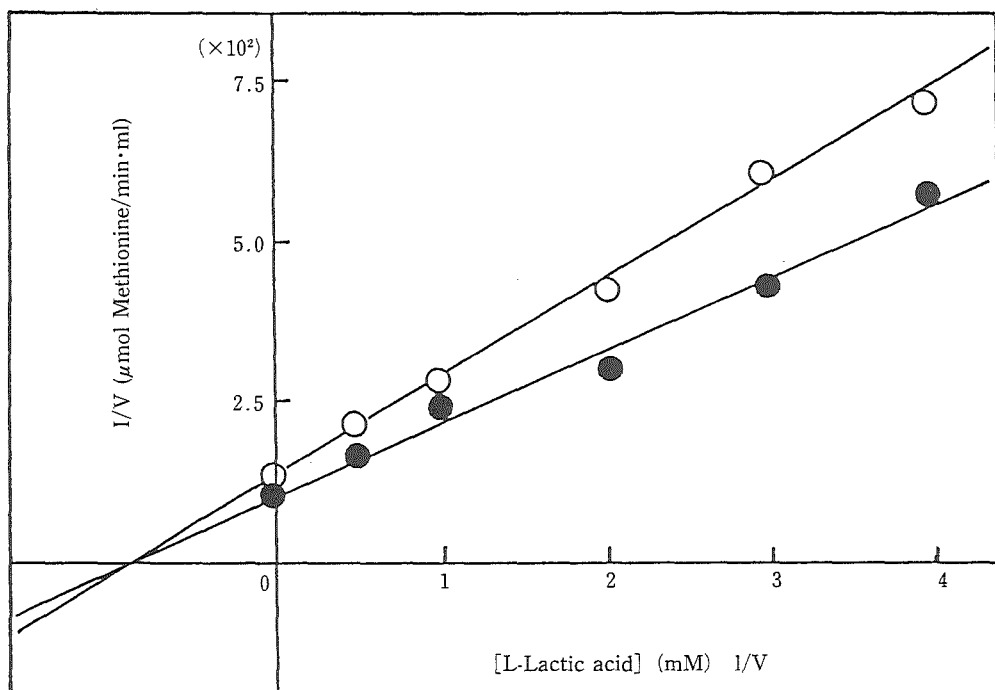


Fig. 2 Dixon plots for the inhibition of aminoacylase by L-lactic acid. N-Acetyl-L-methionine concentrations were 1 (○) and 2 (●) mM.

Table 2 Effect of hydroxycarboxylic acids on the activity of aminoacylase I form *A. oryzae*

Compound	$K_i$ (mM)
L(+)-Lactic acid	0.9
D(-)-Lactic acid	—
Glycolic acid	5.0
DL- $\alpha$ -Hydroxy-n-butyric acid	1.2
DL- $\beta$ -Hydroxy-n-butyric acid	—
$\alpha$ -Hydroxyisobutyric acid	—
DL- $\alpha$ -Hydroxy-n-valeric acid	0.45
DL- $\alpha$ -Hydroxy-n-caproic acid	0.015
L(+)- $\beta$ -Phenyllactic acid	0.035

どの  $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸には全く阻害が観察されないことから、阻害物質と酵素の結合にはカルボン酸と水酸基のような極性部分のほかに疎水部分が関係していることが強く示唆された。

### 摘 要

アミノアシラーゼは固定化酵素として工業的に利用された最初の酵素であり、その応用面において精力的な研究がなされてきた。しかし、その生理学的及び酵素学的な面での研究はほとんど進展していない。本酵素の基礎面を研究する一つのアプローチとして、本酵素の阻害物質を放線菌を用いて検索し、2種の異なる阻害物質 (I, II) を見いだした。各種クロマトグラフィーにより阻害物質 I を単一に精製し、機器分析にかけた結果、本物質は DL-乳酸であり、その阻害活性は L 体のみ認められた。各種  $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸についてその阻害活性を検索したところ、DL- $\alpha$ -ヒドロキシ-*n*-酪酸、DL- $\alpha$ -ヒドロキシ-*n*-吉草酸、DL- $\alpha$ -ヒドロキシ-*n*-カブロン酸、L- $\beta$ -フェニル乳酸が乳酸を上回る阻害活性を示した。最も強い阻害活性を示した DL- $\alpha$ -ヒドロキシ-*n*-カブロン酸の  $K_i$  は約  $15\mu\text{M}$  で L-乳酸の  $0.9\text{mM}$  と比較すると、かなり低濃度で阻害を示すことが認められた。いずれの物質の阻害形式も基質に対して非拮抗的であった。

### 謝 辞

この研究は、平成元年度から3年度までの3年間に亘る岡山大学学内特定研究『生物生産のための細胞選抜と細胞育種』を分担して行ったものである。記して感謝の意を表する。

### 文 献

- 1) Birnbaum, S. W., L. Levintow, R. B. Kingsley and J. P. Greenstein : Specificity of amino acid acylases. *J. Biol. Chem.*, **194**, 455—470 (1952)
- 2) Endo Y. : *In vivo* deacetylation of *N*-acetyl amino acids by kidney acylases in mice and rats. A possible role of acylase system in mammalian kidneys. *Biochim. Biophys. Acta*, **628**, 13—18 (1980)
- 3) Gentzen, I., H. G. Löffler and F. Schneider : Amino acylase from *Aspergillus oryzae*. Comparison with the pig kidney enzyme. *Z. Naturforsch.*, **35c**, 544—550 (1980)
- 4) Kikuchi, M., I. Koshiyama and D. Fukushima : A new enzyme, proline acylase (*N*-acyl-L-proline amidohydrolase) from *Pseudomonas* species. *Biochim. Biophys. Acta*, **744**, 180—188 (1983)
- 5) Park, R. W. and S. W. Fox : An acylase system related to the utilization of benzoylamino acids by *Lactobacillus arabinosus*. *J. Biol. Chem.*, **235**, 3193—3197 (1960)
- 6) Cho, H. -Y., K. Tanizawa, H. Tanaka and K. Soda : Thermostable amino acylase from *Bacillus thermoglucosidius* ; Purification and characterization. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2793—2800 (1987)
- 7) Chibata, I., T. Tosa, T. Sato and T. Mori : Production of *L*-amino acids by aminoacylase adsorbed on DEAE-Sephadex. in *Methods in Enzymology* (Mosbach, K., ed.) Vol. **44**, 746—759, Academic Press, New York (1976)
- 8) Moore, S. and W. H. Stein : A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.*, **211**, 907—913 (1954)