

《農芸化学奨励賞》



東北大学大学院理学研究科 助教 岡田 正 弘

枯草菌のクオラムセンシングフェロモンに見られる新規翻訳後修飾の解明

はじめに

細菌にとって自らの集団密度は重要な外的環境の一つであり、細菌は細胞密度の変化に応答して生物発光、毒素や抗生物質の生産、バイオフィルムの形成、形質転換などさまざまな現象を引き起こす。このような細胞密度依存的な遺伝子発現制御機構は、定足数という意味の“クオラム”という単語を用いてクオラムセンシングと呼ばれている。細菌は実に単純明快な方法で細胞密度を監視しており、それは常に細胞外にフェロモンを分泌するというものである。すなわち、細胞密度が低い場合は分泌されたフェロモンの濃度も低いのだが、細胞密度の増加に伴ってフェロモン濃度も上昇し、一定の閾値を超えた場合に細胞膜上のフェロモン受容体を介してクオラムセンシングが働き、様々な現象が引き起こされる(図1)。言い換えれば、細菌は細胞密度を細胞外のフェロモン濃度に置き換えて感知しているのである。これらクオラムセンシングフェロモンは種特異的に作用し、一般にその化学構造は、グラム陰性菌においてはアシルホモセリンラクトンであり、グラム陽性菌ではペプチドである。

一方、枯草菌は無毒性のグラム陽性細菌であり、その大きな特徴としてはバイオフィルムや胞子の形成、抗生物質の生産、DNA形質転換を行うことが挙げられるが、これらの現象はいずれもクオラムセンシングによって制御されている。このうちのDNA形質転換を誘導するクオラムセンシングフェロモンがオリゴペプチドであるComXフェロモンである。枯草菌はグラム陽性菌のモデル細菌として、網羅的な分子遺伝学的解析が行われており、形質転換におけるComXフェロモンのシグナル伝達機構についても詳細に解析されている。それによると、まず前駆体タンパク ComX が修飾酵素 ComQ による翻訳後修飾を受け ComX フェロモンとなり細胞外に分泌される。やがて細胞密度依存的に蓄積された ComX フェロモンの濃度が閾値に達すると、膜タンパク ComP を介した ComP-ComA 二成分制御系によってシグナルが伝達される(図2)。さらに、分子生物学的研究から、ComX フェロモンは、トリプトファン残基が未知の翻訳後修飾を受けており、その修飾はイソプレニル化ではないかと推定されていた。これがもし本当ならば、新規な

翻訳後修飾様式となるのだが、ComX フェロモンの化学構造解析は、遺伝学的解析とは対照的に全く進んでおらず、新規翻訳後修飾であることがほぼ明らかであるにもかかわらず分子式すら確定していなかった。

ComX フェロモンの化学構造の決定

モデル細菌における新規翻訳後修飾であるにもかかわらず、これまで修飾様式が決定されなかったのは、枯草菌の ComX フェロモン生産量が極微量であることが要因の一つであった。そこで大腸菌中に RO-E-2 株由来の *comQXP* クラスタを導入することで、ComX_{RO-E-2} フェロモンを発現させ、量的な供給をある程度可能にした。それでもなお、ComX_{RO-E-2} フェロモンは回収率が低く、不安定であったため、回収率の向上と精製条件の検討を重ね、最終的にわずか5 Lの培養液から ComX_{RO-E-2} フェロモン(0.20 mg)を単離し、各種 NMR スペクトル解析により化学構造を決定した。つづいて、計算化学的手法による立体配座解析により立体構造を推定した。さらに、可能性の残されたすべての立体異性体を含めた4種類の ComX_{RO-E-2} ペプチドをそれぞれ合成した結果、推定構造を有する ComX_{RO-E-2} ペプチドのみの NMR スペクトルや生物活性が、天然フェロモンと一致したことから ComX_{RO-E-2} フェロモンの絶対立体化学を含めた化学構造を決定した。ComX_{RO-E-2}

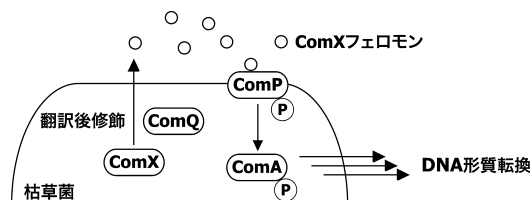


図2 ComX フェロモンのシグナル伝達経路

まず、細胞内で前駆体タンパク ComX が生産され、修飾酵素 ComQ による翻訳後修飾を受け、ComX フェロモンとなり細胞外に分泌される。やがて細胞密度依存的に蓄積された ComX フェロモンは、膜貫通型ヒスチジンキナーゼ ComP の自己リン酸化、レスポンスレギュレーター ComA へのリン酸基の受け渡しを経る二成分制御系を介してシグナルを伝達し、DNA形質転換が引き起こされる。

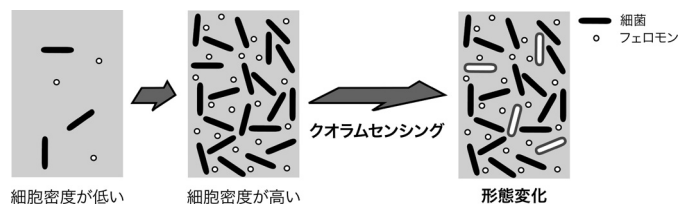
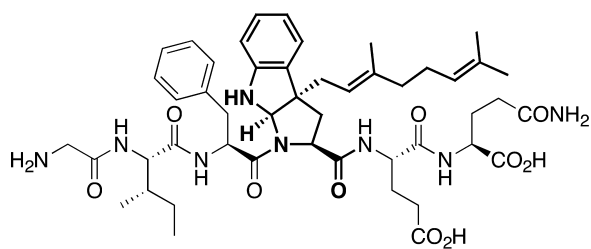


図1 クオラムセンシングの概略

細菌の細胞密度が低い場合は細胞外に分泌されたフェロモンの濃度も低いので何も起こらない。これに対し、細胞密度の上昇に伴って細胞外に分泌されたフェロモンの濃度も高くなり、ある一定の閾値を超えた場合はクオラムセンシングが働き出し、フェロモンを受容体が感知し、特定の遺伝子制御を行うことにより形態変化などが引き起こされる。



Gly-Ile-Phe-Trp*(Ger)-Glu-Gln

図3 ComX_{RO-E-2} フェロモンの化学構造

	イソプレニル化アミノ酸	
	Cys残基* (Tremorgen A-10)	Trp残基 (ComXフェロモン)
なし	◎	◎
未修飾	×	×
N末除去	×	◎
側鎖短縮	○	×
側鎖伸長	◎	×
側鎖変化	○	×

*Y. Sakagami, et al., *Naturwissenschaften*, 1980, 67, 406.

図4 イソプレニル化ペプチドにおける構造活性相関の比較
両修飾ペプチド共に翻訳後修飾が活性発現に必須である。しかし、システイン残基の場合ではアミノ酸配列が重要であり、イソプレニル基の化学構造については長鎖炭素鎖があれば活性を示すことから、その役割は細胞表面へのアンカーであると考えられる。トリプトファン残基の場合ではアミノ酸配列ではなく、修飾トリプトファンの化学構造が重要であり、イソプレニル基自体が受容体との特異的結合に関与していると考えられる。(◎, 強い活性; ○, 中程度の活性; ×, 活性なし)

フェロモンの修飾トリプトファン残基の化学構造は、インドール環の3位がゲラニル化されており、さらに、新たにプロリン様の5員環が形成しているというユニークな化学構造であることが明らかとなり、トリプトファン残基における新規翻訳後修飾であるだけでなく、翻訳後修飾によるゲラニル化の初の報告例となった(図3)。

ComX_{RO-E-2} フェロモンの構造活性相関研究

つづいてComX_{RO-E-2} フェロモンの構造活性相関研究を行った。まず、活性発現に必要な最小単位を調べた結果、修飾トリプトファン残基を含むわずか3残基でも活性をある程度保持していた。さらに修飾トリプトファン以外のアミノ酸残基をアラニンに置換しても活性発現にほとんど影響を与えなかったことから、修飾トリプトファン以外の他のアミノ酸残基は活性発現にそれほど重要ではないことが明らかとなった。一方、修飾トリプトファン残基においては、未修飾のトリプトファンへの置換だけでなく、プロリン様の環構造や、立体化学を変化させることでも活性が完全に消失した。さらにゲラニル側鎖の化学構造を変化させただけでもほとんど活性を示さなかったことから、修飾トリプトファン残基は立体化学を含めた厳密な化学構造が活性発現に必須であることが明らかとなった。これは既知のシステインイソプレニル化ペプチドとは大きく異なった傾向

枯草菌株の種類	ComXフェロモンのアミノ酸配列	トリプトファンの修飾様式
168	ADPITRQW*GD	ファルネシル化
RO-C-2	TREW*DG	ファルネシル化
RO-E-2	GIFW*EQ	ゲラニル化
RO-H-1	MLDW*KY	ゲラニル化
RS-B-1	MMDW*HY	ゲラニル化
RO-B-2	YTINGNW*VPS	ゲラニル化

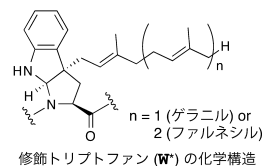


図5 枯草菌の菌株による ComX フェロモンの修飾様式

で、ComX_{RO-E-2} フェロモンにおけるゲラニル修飾が、単に細胞表面へのアンカーとしての役割だけでなく、受容体との結合に直接関与していることが強く示唆された(図4)。

さらに、他の菌株由来のComXフェロモンの化学構造の決定を行いComXフェロモンの修飾様式が、トリプトファン残基の環化を伴うゲラニル化とファルネシル化の2種類であることを示した(図5)。この結果から、ComXフェロモンの種特異性を規定する要因は、アミノ酸配列よりもむしろイソプレニル側鎖の炭素数であると考えられた。興味深いことにグラム陰性細菌の生産するクオラムセンシングフェロモンにおいても、化学構造が全く異なっているにもかかわらず、種特異性と疎水性側鎖の炭素数には相関が見られる。

おわりに

以上のようにして、枯草菌のクオラムセンシングフェロモンであるComXフェロモンから見いだされたトリプトファン残基のイソプレニル化は、化学構造がユニークなだけでなく、活性発現に必須な翻訳後修飾であることが判明した。現在までにこの翻訳後修飾はComXフェロモンにおいてのみ確認されており、そのコンセンサス配列も見いだせていない。しかし、担子菌の接合管形成フェロモン中において発見されたシステイン残基のイソプレニル化は、その後普遍性が明らかになっており、枯草菌の形質転換誘導フェロモン中において発見されたトリプトファン残基のイソプレニル化も生物界に普遍的に存在する翻訳後修飾である可能性が高いのではないかと考えている。

謝辞 本研究は主として名古屋大学大学院生命農学研究科・生理活性物質化学研究室にて行われたものです。日本の農芸化学の伝統である“ものとり”を主体として研究を展開していき、名誉ある本賞を受賞できたことは筆者にとって望外の喜びであり、興味深いテーマを与えてくださり終始ご指導をいただきました坂神洋次教授に厚く御礼申し上げます。研究を支えてくださった小鹿一教授、松林嘉克准教授をはじめとするスタッフの皆様、共に研究を行った学生諸氏、共同研究者であるD. Dubnau博士に感謝申し上げます。学部生時代の指導教官であり、同研究室に推薦していただきました山村庄亮名誉教授に厚く御礼申し上げます。現在の所属であり、引き続き研究の機会を与えてくださった東北大学大学院理学研究科有機化学第一研究室の上田実教授に厚く御礼申し上げます。最後となりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました、日本農芸化学会名古屋支部長の小林哲夫教授、日本農芸化学会東北支部長の五味勝也教授、ならびにご支援賜りました諸先生方に厚く御礼申し上げます。