



ホモポリアミノ酸の生合成に関する研究

福井県立大学生物資源学部生物資源学科 講師 濱野 吉十

はじめに

天然に存在するホモポリアミノ酸は、たった2種類しか知られていない。すなわち、枯草菌が生産するポリ- $\gamma$ -グルタミン酸(納豆のネバネバ成分)と $\epsilon$ -ポリ-L-リジン( $\epsilon$ -PL)である。放線菌が生産する $\epsilon$ -PLの化学構造は、そのペプチド鎖長に多様性があることを除けば、極めて単純と言えるが、その生合成メカニズムは長らく未解明のままであった。最近われわれは、 $\epsilon$ -PL合成酵素(PIs)を同定し、本酵素が極めて新奇性の高い非リボソームペプチド合成酵素(NRPS)であることを明らかにした。さらに、 $\beta$ リジンのホモオリゴマー構造を有する抗生物質ストレプトスリシン(ST)について、STの生理活性における $\beta$ リジンオリゴマー構造の重要性を明らかにするとともに、 $\beta$ リジンオリゴマーの生合成に関与する新規ペプチド合成酵素の存在を示唆している。これら新規ホモポリアミノ酸合成酵素に関する研究成果について以下に述べる。

1.  $\epsilon$ -PLの生合成に関する研究

$\epsilon$ -PL(図1A)は、L-リジンの $\epsilon$ -アミノ基と $\alpha$ -カルボキシル基がペプチド結合でつながった25~35残基からなる直鎖状のホモポリアミノ酸(ホモポリアミド)である。 $\epsilon$ -PLの生合成メカニズムは長らく未解明であったが、非リボソームペプチド合成酵素(NRPS)によって合成される可能性が他の研究グループによって報告されていた。

微生物はさまざまなペプチド系抗生物質を生産し、その基本骨格であるペプチド鎖の合成はNRPSによって触媒される。従来型のNRPSは、多モジュール構造を有する巨大タンパク質であり、ペプチド結合を一つ合成するために一つのモジュール

を有している。このモジュールの中に三つの活性ドメイン、Adenylation(A)-domain, Thiolation(T)-domain, Condensation(C)-domainが存在する(図2)。例えば、図2のようにNRPSが三つのモジュールから構成されている場合は、トリペプチドを生産する。ペプチド鎖のアミノ酸配列は、各モジュール内のA-domainの基質特異性に依存し、基質となるアミノ酸はアデニル化によって活性化される。活性化されたアミノ酸は同じモジュールのT-domainに補酵素4'-phosphopatethein(4'-PP)基を介してチオエステル結合し、C-domainによってペプチド結合が形成される。最終的にはThioesterase(Te)-domainによってペプチドがNRPSからリリースされる。合成されるペプチド化合物は、このようにNRPSのモジュール構造を鋳型として合成されることから、ペプチドの鎖長はNRPSの構造によって厳密に制御されている。したがって、鎖長の多様性を有する $\epsilon$ -PLの生合成を従来型のNRPSのメカニズムで説明することは容易ではなかった。またその一方でわれわれは、 $\epsilon$ -PL生産菌が $\epsilon$ -PLの分解酵素を併せ持つことを報告しており、 $\epsilon$ -PLの鎖長の多様性が分解酵素によるものなのか、あるいは生合成酵素によるものなのかについては興味深かった。

1.1 膜に局在する $\epsilon$ -PL合成酵素(PIs)の精製

*Streptomyces albulus* NBRC14147における $\epsilon$ -PL合成活性は、膜画分に認められた。そこで、界面活性剤を用い活性画分を可溶化し、各種クロマトグラフィーにてPIsを単一に精製した(図1B)。精製酵素を用いATP存在下でL-リジンを基質として反応を行い、反応産物をHPLC/ESI-MSで分析した。その結果、酵素依存的に生成し、鎖長に多様性(3~17mer)を有する $\epsilon$ -PLを検出した(図1C)。したがって、 $\epsilon$ -PLの鎖長の多様性は、合成酵素であるPIs自身によって導かれていることを明らかにした。

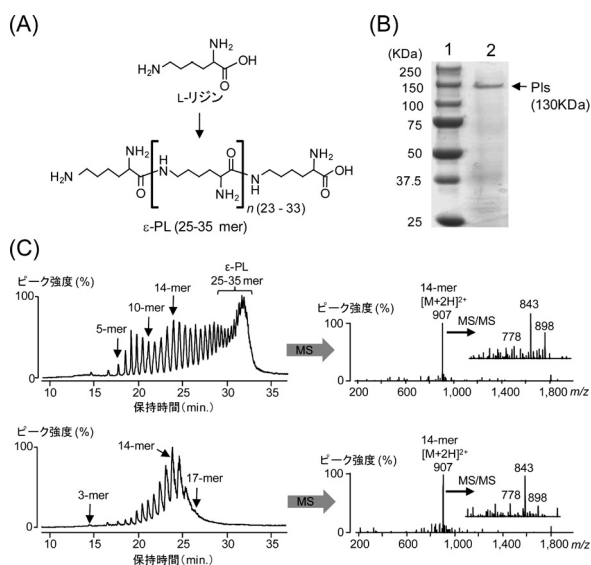


図1  $\epsilon$ -PLと $\epsilon$ -PL合成酵素(PIs)の精製  
(A)  $\epsilon$ -PLの化学構造。(B) 精製PIsのSDS-PAGE分析。  
(C) PIs反応産物のHPLC/ESI-MS解析。標準化合物 $\epsilon$ -PLの加水分解物(上); PIs反応産物(下)。

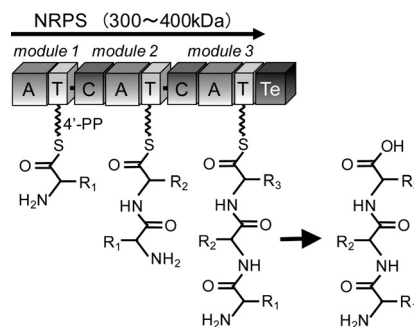


図2 従来型NRPSの反応機構(模式図)

A, adenylation(A)-domain (アミノ酸の活性化触媒ドメイン); T, thiolation(T)-domain (アミノ酸の結合ドメイン); C, condensation(C)-domain (ペプチド合成ドメイン); Te, thioesterase(Te)-domain; 4'-PP, 4'-phosphopatethein

1.2 *pls* 遺伝子のクローニングと PIs のドメイン構造

PIs の内部アミノ酸配列を決定し、定法に従って *pls* 遺伝子を取得した。本遺伝子産物についてドメイン検索を行ったところ、*N* 末端領域に NRPS の A-domain および T-domain と有意な相同性を示すドメインを確認することができた (図 3A)。しかし興味深いことに、それ以外の領域においては、いずれの NRPS と有意な相同性は示さず、一方で、NRPS では初めての例となる 6 カ所の膜貫通ドメイン (TM-domain) の存在と、これらに挟まれたタンデムに存在する三つのドメインの存在を明らかにした。これらタンデムドメインのアミノ酸配列は互いに弱い相同性 (22~27%) を示したが、NRPS で通常認められているペプチド合成ドメイン (C-domain, 図 2) には有意な相同性は示さなかった。しかし、予想される立体構造は C-domain と同じくアセチルトランスフェラーゼと類似性を示したことから、立体構造的には関連していると考えられた。したがって、これらタンデムドメインが PIs におけるペプチド合成ドメインであると示唆され、これらドメインを C1-, C2-, C3-domain (図 3A) と命名した。

1.3 PIs 反応メカニズムの解明

種々解析した結果、PIs においては従来型 NRPS (図 2) と異なり合成途中の中間体、すなわち短鎖長  $\epsilon$ -PL は酵素に結合していない状態で存在することが判明した (図 3B)。現時点で判明している PIs の反応機構は次のとおりである。まず、基質である L-リジンは、A-domain によってアデニル化 (活性化) され、T-domain にチオエステル結合し伸長ユニットとして利用される。次に、ペプチド合成ドメインである C1-, C2-, C3-

domain によって、酵素に結合していないフリーの L-リジン (プライミングユニット) と L-リジン伸長ユニットの間でペプチド結合が形成され L-リジンダイマーが合成される。さらに伸長途中の L-PL 鎖の *N* 末端アミノ基 ( $\epsilon$ -アミノ基) が次サイクルでの求核的アクセプターなることで、繰り返しペプチド結合が形成され、ペプチド鎖が伸長することが明らかとなった。以上のように、PIs が NRPS 様式で基質アミノ酸を活性化し、アミノ酸リガーゼ様の縮合反応機構で繰り返しペプチド鎖の伸長を行なう新奇ペプチド合成酵素であることを明らかにした。また、種々解析結果から、PIs の触媒ポケットは合成途中の  $\epsilon$ -PL を包み込むように長細いトンネルを形成していると推測され (図 3B)、これはまた、合成途中の短鎖  $\epsilon$ -PL の  $\alpha$  位のアミノ基を保護していると考えると PIs の  $\epsilon$  位アミノ基特異的なポリマー合成反応を説明できた。また、PIs は数種の L-リジンアナログを基質として認識し、これらアナログと L-リジンから構成される新規な“非天然型ヘテロポリアミノ酸”を生成した。

2. ST の生合成に関する研究

有効な生理活性を示すにもかかわらず、何らかの理由でこれまで実用化されていない天然生理活性物質は多数存在する。これら物質の有効利用の可能性を探る研究の中で、最近われわれは、アミノ酸  $\beta$ -リジンのホモオリゴマー (1~7 残基) を有する抗生物質 ST (図 4) において、そのオリゴマー構造に関する興味深い知見を得た。

ST のストレプトリジンラクタムは生理活性 (タンパク質合成阻害活性) に重要な構造モチーフであり、その環状アミドが加水分解されると生理活性を失う。実際に、 $\beta$ -リジン 1 残基を有する ST-F の加水分解物である ST-F-acid の抗菌活性は完全に消失する。しかし興味深いことに、 $\beta$ -リジン 3 残基を有する ST-D の加水分解物である ST-D-acid については、その抗菌活性が維持された。これは、 $\beta$ -リジンホモオリゴマーの鎖長が長くなるに従ってその抗菌活性が強化され、ストレプトリジンラクタムの分解による生理活性低下を補っていると考えられた。さらにわれわれは、この抗菌活性強化が  $\beta$ -リジンホモオリゴマーがもたらす膜透過性の向上とリボソームへの親和性向上によるものである可能性を示している。したがって、“活性が低い”あるいは“活性が低下した”化合物を  $\beta$ -リジンオリゴマー化することができればその生理活性を増強できると考えている。そこで、 $\beta$ -リジンホモオリゴマー合成酵素を ST 生合成遺伝子群から同定することを試みた。

2.1 ST 生合成遺伝子群の取得と各遺伝子の機能解析

ST 自己耐性遺伝子 (*sttR*) をプローブとして用い、ST 生産放線菌 *Streptomyces rochei* ゲノムライブラリーより、*sttR* 遺伝子を含む約 34 kbp のゲノム断片を有するコスミドを取得した (図 5)。本コスミドの全塩基配列を決定したところ、NRPS 遺

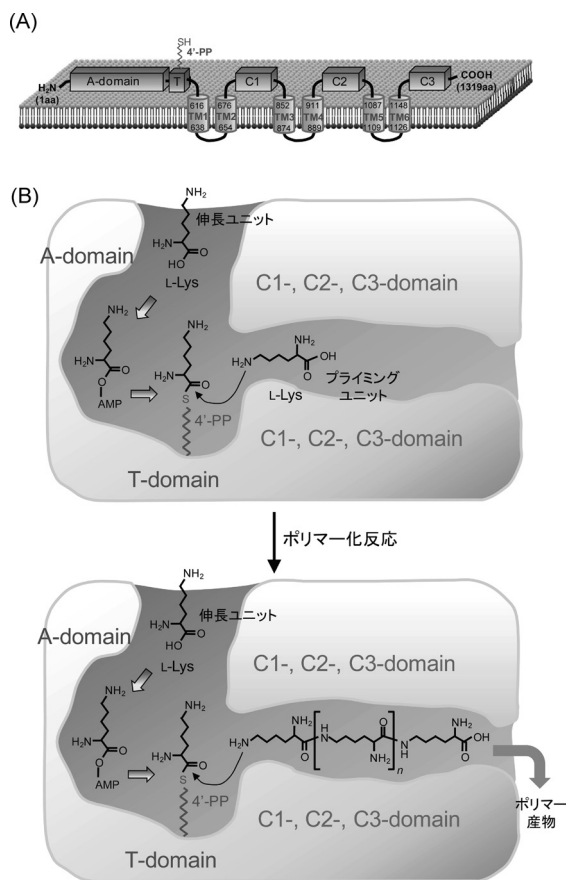


図 3 PIs の反応機構 (模式図)  
(a) PIs のドメイン構造, (b) 想定される PIs 触媒ポケットと反応機構。TM, 膜貫通ドメイン; aa, amino acid.

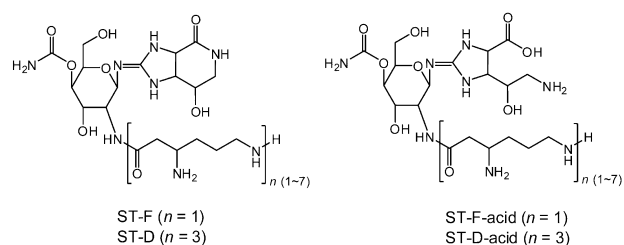


図 4 ST, ST-acid の化学構造

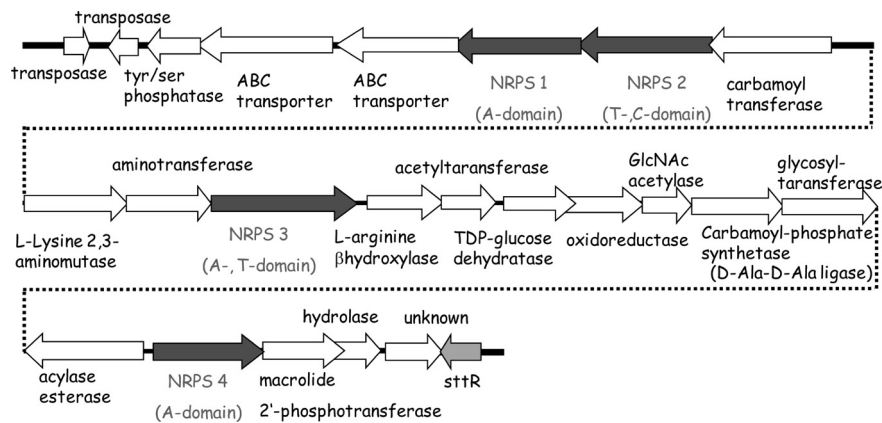


図 5 ST 生合成遺伝子クラスター

伝子を含む ST 生合成関連遺伝子群が見いだされた。そこで、本コスミドを異種放線菌に導入したところ、その導入株は、ST-F と ST-D を生産した。したがって、本コスミドには ST 生合成にかかわるすべての遺伝子群が含まれており、すなわちβ-リジンホモオリゴマー合成酵素遺伝子も含まれていることを明らかにした。また、クラスター内に見いだした四つの NRPS 遺伝子およびその他の関連遺伝子群について破壊実験を行ったところ、β-リジンホモオリゴマー合成に関連する NRPS 遺伝子を見いだした。前述したようにわれわれは、β-PL の合成酵素 (PIs) を見いだしているが、ST 生合成遺伝子群内にこれに相同性を示す遺伝子は存在しておらず、β-リジンホモオリゴマー合成酵素は新規ポリアミド (ペプチド) 合成酵素である可能性が示唆された。

本研究は福井県立大学生物資源学部生物資源学科応用微生物学研究領域 (現 分子機能科学研究領域) において行われました。研究を進めるにあたり、始終温かいご指導とご支援を賜り

ました元 福井県立大学生物資源学部教授・中森 茂先生、元同教授・高木博史先生 (現 奈良先端科学技術大学院大学教授) に心より感謝申し上げます。また、研究の手ほどきをしていただいた学生時代の恩師である富山県立大学准教授・大利 徹先生に深く御礼申し上げます。富山県立大学教授・伊藤 伸哉先生には、学生時代、ご懇篤なるご教導と温かい激励を賜り、深甚なる謝意を申し上げます。また、共に研究を行った福井県立大学の学生諸氏、技術員・丸山千登勢氏に厚く御礼申し上げます。ε-PL の生合成研究において、共同研究者として多大なご協力をいただいたチッソ株式会社横浜研究所・山中一也氏、武藤正道氏に御礼申し上げます。また、ご指導・ご鞭撻いただきました福井県立大学生物資源学部教授・宇多川 隆先生、同教授・大東 肇先生、同教授・岩崎行玄先生、同准教授・木元 久先生、同講師・高橋正和先生、福井県立大学生物資源学部の諸先生方に感謝申し上げます。最後に、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会中部支部長・小林哲夫先生ならびにご支援賜りました学会の諸先生方に厚く御礼申し上げます。