



福井県立大学生物資源学部生物資源学科 丸山 千登勢

抗生物質ストレプトスリシンおよびその類縁化合物の 生合成研究で見出した新規ペプチド合成酵素

はじめに

1943年に初めて単離され¹⁾、以来、数多くの放線菌から見つかっている抗生物質streptothricin (ST) は、強力な抗菌活性を示すにも関わらず、ヒトなどの真核生物への毒性が強く医薬品や農薬として利用されていない。ST及びST類縁化合物は共通して、アミノ糖とアミノ酸誘導体からなる streptothrisamine 骨格を有し、アミノ酸側鎖として、1~7残基の β -lysine (β -Lys) または β -Lys oligopeptide [oligo (β -Lys)]²⁾、あるいは glycine 誘導体が結合することで数多くの類縁化合物が存在する (図1)。興味深いことに、これまでに天然より単離された ST 類縁化合物のアミノ酸側鎖構造は、 β -Lys タイプまたは glycine タイプの2種類しか見つかっておらず、これら以外のアミノ酸を側鎖に持つ化合物は見つかっていない。従ってこれら2つのアミノ酸側鎖の生合成経路の解明は、 β -Lys, glycine に次ぐ、第2, 第3のアミノ酸側鎖を有する新規ST類縁化合物の創製につながると期待し、我々はこれらアミノ酸側鎖の生合成機構に着目し、研究を進めてきた。これまですでに、ST生産菌 *Streptomyces rochei* NBRC12908 のゲノムライブラリーより ST 生合成遺伝子群を取得し (図2)、種々解析の結果から、oligo (β -Lys) が新奇反応メカニズムを有する非リボソーム型ペプチド合成酵素 (NRPS) Orf5, 18, 19 によって生合成されることを明らかにした³⁾ (図3A)。さらに我々は、ST類縁化合物 BD-12⁴⁾ の生合成研究から、glycine 誘導体側鎖におけるアミド形成が、 β -Lys 側鎖とは全く異なる生合成メカニズムによって触媒される興味深い結果を得た⁵⁾。本講演では glycine 側鎖のアミド形成を触媒する新規 tRNA 依存型アミド合成酵素 Orf11 に関する研究成果と、最近新たに見出した Orf11 ホモログ酵素を利用した新規ST類縁化合物創製について紹介する。

1. BD-12生合成遺伝子群の同定及びアミド合成酵素遺伝子の探索

BD-12 は、ST と同じく、streptothrisamine 骨格を有することから、BD-12生合成遺伝子群にも、ST生合成遺伝子群に見出した streptothrisamine 生合成に関わる遺伝子群が存在すると予想された。そこで BD-12生産菌 *S. luteocolour* NBRC13826

の BAC ライブラリーより、streptothrisamine 生合成遺伝子群を指標に BD-12生合成遺伝子群を探索した。得られた BAC クローンについて、BD-12を生産しない放線菌 *S. lividans* TK23 を宿主とした異種発現を試みたところ、BD-12の生産が確認されたことから、取得した BAC クローンには BD-12生合成に関わるすべての遺伝子セットが含まれていることが明らかにした (図2)。我々は、BD-12における glycine 側鎖も、ST の β -Lys 側鎖と同様、NRPS によって生合成されると予想し、BD-12生合成遺伝子群から Orf5, 18, 19 のホモログ酵素遺伝子を探索したが、予想に反し、本遺伝子群には NRPS をコードする遺伝子が存在していなかった (図2)。そこで、各遺伝子産物の構造予測を基にアミド合成に関わる酵素遺伝子を探索した結果、Orf11 が FemAX family に相同性を示すことが判明した。FemAX は、微生物のペプチドグリカン生合成過程におけるペプチド架橋反応を触媒する tRNA 依存型ペプチド合成酵素として知られている。従って BD-12 の glycine 側鎖は、NRPS ではなく、tRNA 依存的なメカニズムで生合成される可能性が示唆された。

2. tRNA 依存型アミド合成酵素 Orf11 の *in vitro* 解析

次に我々は、Orf11 の機能解析を行うために、Orf11組換え

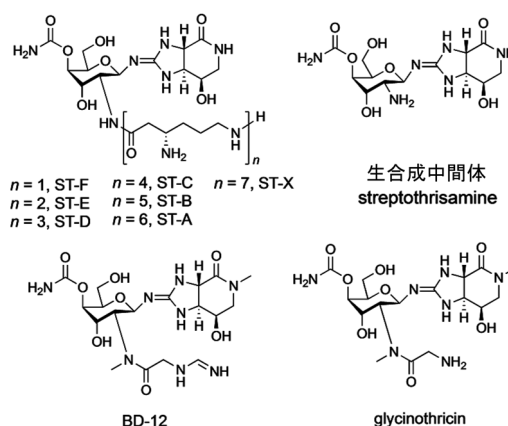


図1. ST 及び ST 類縁化合物の化学構造

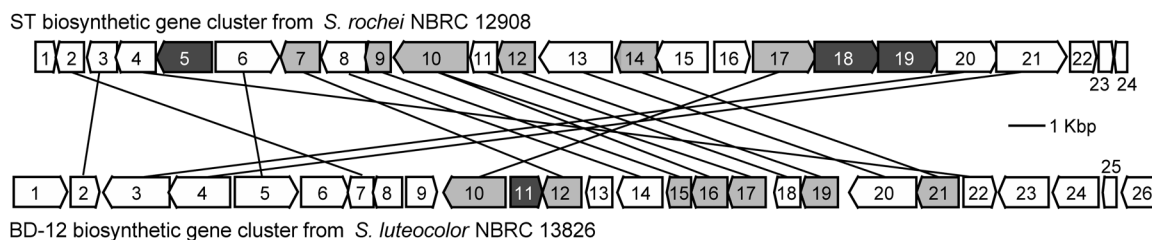


図2. ST 及び ST 類縁化合物 BD-12 の生合成遺伝子群

■ streptothrisamine 生合成に関わる酵素遺伝子 ■ アミド合成酵素遺伝子

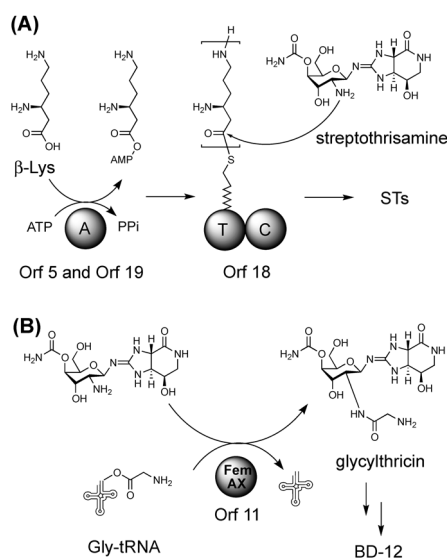


図3. (A) STにおける oligo (β -Lys) 側鎖の生合成経路
(B) BD-12における glycine 側鎖の生合成経路

酵素を用いた *in vitro* 反応を試みた。Orf11 の基質となる aminoacyl-tRNA の供給には、大腸菌由来 *in vitro* タンパク質合成システムを利用し、streptothrisamine と glycine を基質に酵素反応を行ったところ、BD-12 生合成中間体 glycyllthricin の生成が確認された⁵⁾ (図3B)。また本反応について、先に RNase にて前処理を行った後に酵素反応を行うと glycyllthricin は生成されなかったことから、Orf11 は確かに tRNA 依存型アミド合成酵素であることを明らかにした。さらに Orf11 の基質特性を調べるために、タンパク性アミノ酸 20 種類を基質として用いて同様の酵素反応を行ったところ、興味深いことに、わずかにではあるが alanine を基質認識し、alanine 側鎖を有する新規 ST 類縁化合物 alanylthricin を与えた。前述したように、ST 及び ST 類縁化合物のアミノ酸側鎖には、 β -Lys タイプまたは glycine タイプの 2 種類しか見つかっていない。しかし、本酵素を用いた反応において、第 3 のアミノ酸側鎖を持つ新規 ST 類縁化合物の創製に成功した。すなわち、Orf11 ホモログ酵素の探索とその応用利用は、さらなる新規 ST 類縁化合物の創出への可能性が期待された。

3. Orf11 ホモログ酵素遺伝子の探索と応用利用に関する研究

タンパク質翻訳システムにおいては、Gly-tRNA^{Gly} を含め 20 種の アミノアシル-tRNA^{アミノ酸} (aa-tRNA^{aa}) が存在することから、天然には glycine 以外の aa-tRNA^{aa} を基質認識する Orf11 ホモログ酵素が存在すると考え、放線菌ゲノムデータベースより探索を行った。その結果、最近、Orf11 ホモログ酵素 Sba18 を見出し、Orf11 と同様に機能解析を行ったところ、Sba18 は、Gly-tRNA^{Gly} 以外にも Ala-tRNA^{Ala}、Ser-tRNA^{Ser} を基質として認識し、glycyllthricin、alanylthricin だけでなく、新規 ST 類縁化合物 serylthricin を生成することを明らかにした。Orf11 と Sba18 は高い相同性 (75%) を有するが、その基質特異性は大きく異なり、Sba18 は aa-tRNA^{aa} 分子における tRNA^{aa} 構造、アミノアシル基構造の両者に対して、広い基質特異性を有するアミド合成酵素であることが判明した。

おわりに

streptothrisamine 骨格は、すべての ST 類縁化合物の共通骨

格であるが、本化合物は全く抗菌活性を示さない。しかしアミノ酸側鎖構造を有する ST や ST 類縁化合物のすべてが強力な抗菌活性を示すことから、これら化合物の生理活性には、アミノ酸側鎖構造が重要な役割を担っていると言える。従って β -Lys や glycine 以外のアミノ酸側鎖を持つ ST 類縁化合物の多様性創出は、真核生物に毒性を示さない有用化合物の創製につながると期待される。そこで本研究で新たに創製した 3 つの化合物、glycyllthricin、alanylthricin、serylthricin について、大腸菌、枯草菌、酵母に対する抗菌活性を評価した結果、残念ながら、いずれの化合物も ST や BD-12 に比べて弱い抗菌活性が観察された。しかし興味深いことに、serylthricin については、真核生物である酵母に対して全く抗菌活性を示さなかったことから、ST 類縁化合物の医薬品リード化合物としての可能性を示唆できたと考えている。

本研究を通して、ST 類縁化合物を生産する放線菌は、非タンパク性アミノ酸 (β -Lys) を構成成分とする場合には NRPS を、タンパク性アミノ酸 (glycine) を利用する場合は、tRNA 依存型ペプチド合成酵素を使い分けしているような、微生物が持つ巧みな生合成戦略を実感した。今後も、我々の想像を超えた巧妙な微生物酵素との出会いを楽しみに、新たな酵素の探索・活用を進めていきたい。そしていつか、我々が必要とする生理活性を持つ ST 類縁化合物をデザインし、論理的に生合成できることを目指していきたい。

(引用文献)

- 1) Waksman, S.A., Production and Activity of Streptothricin, *J. Bacteriol.*, Vol. 46, p 299-310, (1943)
- 2) Ji, Z., *et al.*, Two new members of streptothricin class antibiotics from *Streptomyces qinlingensis* sp. nov., *J. Antibiot.*, Vol. 60, p 739-744, (2007)
- 3) Maruyama, C., *et al.*, A stand-alone adenylation domain catalyzes multiple amide-bond formation in streptothricin biosynthesis, *Nat. Chem. Biol.*, Vol. 8, p 791-797, (2012)
- 4) Furumai T., *et al.*, New basic water-soluble antibiotics BD-12 and BY-81. I. Taxonomy of the producing organisms and antibiotic production, *J. Antibiot.*, Vol. 21, p 283-289, (1968)
- 5) Maruyama, C., *et al.*, tRNA-dependent aminoacylation of an amino-sugar intermediate in the biosynthesis of a streptothricin-related antibiotic, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 82, p 3640-3648, (2016)

謝 辞 ここに紹介させていただいた一連の研究は、福井県立大学生物資源学部分子機能科学研究領域にて行ったものです。研究員の頃から今に至るまでの長きに渡り、多くのご指導と女性研究者が働きやすい環境、そして研究者として生きる人生を与えてくださった濱野吉十先生に深く御礼申し上げます。また、いつも温かく、時には厳しくご指導くださり、本賞へのご推薦を賜りました北海道大学大利徹先生に、心より御礼申し上げます。また共同研究においてご教授くださった富山県立大学加藤康夫先生、AIST 新家一男先生、北海道大学小笠原泰志先生に深謝申し上げます。最後に、これまでの研究において、難解な生合成メカニズムの解明を、共に悩み、共に喜びを分かち合い、日々の多くの時間を一緒に過ごした研究室の学生の皆さんにこの場を借りて感謝申し上げます。