

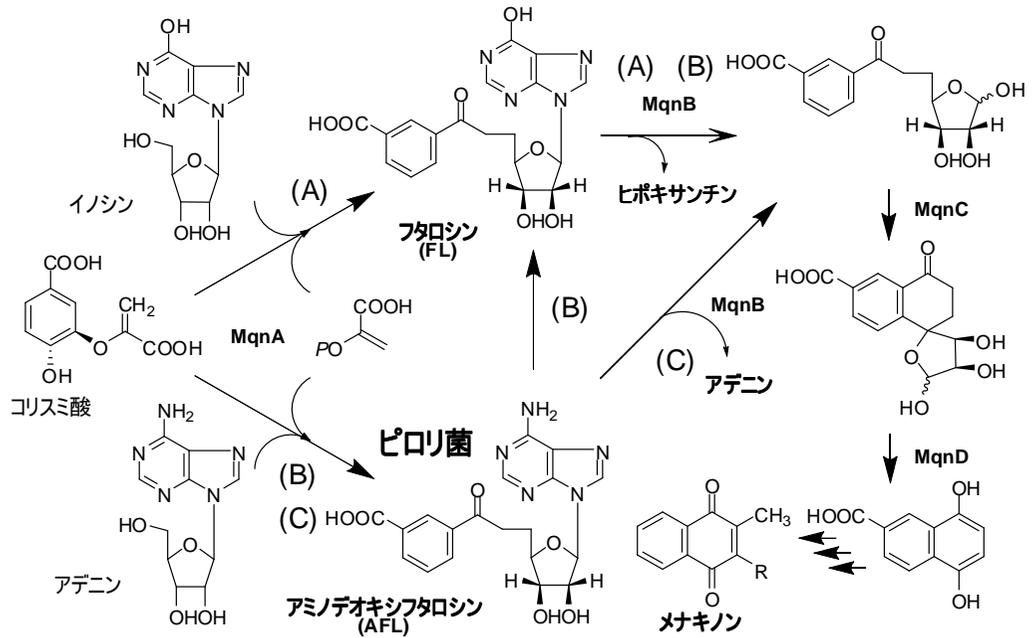
補酵素類の生合成に關与する新規酵素の解析と応用

北海道大学大学院工学研究院 大利 徹



微生物のゲノムデータベースを精査すると、補酵素類の生合成では既知の生合成遺伝子群を見出せない場合がある。補酵素は生育に必須であることを考えると、この事実は新規な生合成経路の存在を示唆している。実際、補酵素ピリドキサル（PLP）のピリジン環は、大腸菌では 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) と 3-amino-1-deoxyacetone-1-phosphate から 7 段階で生合成されるのに対し、枯草菌では、ribulose-phosphate、glyceraldehyde-phosphate、アンモニアから 1 つの酵素反応で生合成される (*Nat. Prod. Rep.*, 23, 15, 2006)。逆に NAD の生合成では、従来真核生物にしか存在しないと考えられていたトリプトファンキヌレン経路が Xanthomonadales や Flavobacteriales に存在することが明らかにされるなど (*Mol. Biol. Evol.*, 26, 399, 2009)、補酵素生合成の多様性が明らかにされつつある。

メナキノン：このような背景下、筆者らは胃がんの原因菌として知られている *Helicobacter* 属細菌（ピロリ菌）は、呼吸の際にメナキノンを利用するにも関わらず、大腸菌で明らかにされたメナキノン生合成経路の遺伝子群を持っていないことに気づき、新規経路を持つ微生物群に特異的に存在する遺伝子群のバイオインフォマティクスによる絞り込みと生化学実験による実証により新規経路の概略を明らかにした (*Science*, 321, 1670, 2008)。さらに近年、本経路の初発反応には多様性があり、菌株により 3 つの多



様性があることも明らかにした (*Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 913, 2011) (図 (A) から (C))。応用面では、図中、(C) の経路はピロリ菌に特有であることから、本反応の阻害剤は特異的抗ピロリ菌剤となり得ることから、現在天然物に阻害剤を探索し候補化合物を得た。

4-アミノ安息香酸 (PABA) : 乳酸菌は多くの栄養要求性を示す一方で、近年明らかにされたゲノムサイズは何れも数 Mbp 程度と比較的大きいことから、補酵素の新規生合成経路を探索した。その結果、*Lactobacillus fermentum* と *Lactobacillus reuteri* では、コリスミ酸から PABA を合成する遺伝子が存在しないにも関わらず PABA 要求性を示さなかったため、その詳細を検討した結果、これらの株では PABA が新規経路で生合成される可能性が示された (*Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 7299, 2010)。最近、既知経路の PABA 合成に関与する *pabA*, *B*, & *C* 欠損大腸菌を宿主に用い、新規経路を有すると推定され、かつ入手可能な *L. fermentum* *Xanthomonas oryzae*, *Nitrosomonas eutropha* 等を DNA 供与体としてショットガンクローニングを行った結果、*N. eutropha* から pyrroloquinoline quinone (PQQ) synthase と弱い相同性を持ち、機能未知と annotation されている候補遺伝子を得た。本遺伝子のオーソログは、同じく新規経路を持つと予想されるクラミジアでは、他の葉酸生合成遺伝子と染色体上でクラスターを成していることから、PABA の生合成に関与する可能性が強く示唆された。そこで、現在、組換え酵素を調製し、コリスミ酸などシキミ酸経路中間体を中心に基質を探索している。不思議なことに、*L. fermentum*、*X. oryzae* のゲノムデータベースに本遺伝子のオーソログを探索すると、本来の PQQ 生合成遺伝子クラスター内に、PQQ synthase が存在するのみである。この事実は、PQQ 生合成酵素が PQQ と PABA の両方に関与する bi-functional 酵素であるか、これら 2 株では既知経路や *N. eutropha* とは異なる第 3 の経路が存在する可能性を示唆する。そこでその詳細についても解明を試みている。

グルタチオン : グルタチオンは、人間や大腸菌では抗酸化の役割を担う重要な化合物である。他方、*Streptomyces* 属放線菌や結核菌では、グルタチオンの代わりにマイコチオールが用いられている。しかし、放線菌 *S. coelicolor* は、グルタチオン生合成の初発反応を触媒する glutamate-cysteine ligase (EC 6.3.2.2) と 37% の identity を示すオーソログを有する (SC0910)。本株ではグルタチオン生合成上次の反応を触媒する glutathione synthase (EC 6.3.2.2) オーソログは見いだせないが、SC0910-913 の合計 4 つの遺伝子 (いずれも機能未知) がクラスターを成していることから、これらの機能解明を行った。最初に本遺伝子の破壊を行った結果、破壊株は過酸化水素 0.5 mM 存在下では生育できなかったことから本遺伝子クラスター産物は何らかの抗酸化活性を有することが判明した。現在、個々の遺伝子の機能解明を試みている。