

非天然型アミノアシル基を有する

新規ストレプトスリシンの戦略的酵素合成

福井県立大学 生物資源学研究所 丸山 千登勢

【略歴】

1999年 3月 福井県立大学生物資源学研究所 修士課程修了
2004年 10月 福井県立大学生物資源学部生物資源学科 研究員
2007年 4月 福井大学医学部分子生命科学領域 教務職員
2008年 9月 福井県立大学生物資源学部生物資源学科 NEDO 研究員
2012年 9月 福井県立大学生物資源学部 博士(生物資源学)取得
2013年 1月 福井県立大学生物資源学部 博士研究員
2013年 8月 次世代天然物化学技術研究組合 特別研究員
2017年 4月 福井県立大学大学院生物資源学研究所 講師
2019年 4月 同上 准教授

ストレプトスリシン (ST) およびその類縁化合物 生合成研究から見出した新規アミド合成酵素

微生物から見出された天然由来の生理活性物質の多くは、有用な生理活性を持ちながらも様々な理由から未利用のままである。このような未利用資源を医薬品として実用化できれば、現代社会が求める創薬スピードを加速させることが可能である。数多くの放線菌が生産する抗生物質 streptothricin (ST、図1) とその類縁化合物 glycylothricin (GT、図1) もその一例であり、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として利用されていない。ST 類化合物の化学構造は共通して、アミノ糖とアミノ酸誘導体からなる streptothrisamine 骨格 (図1) 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)]、あるいは glycine(Gly) または Gly 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。streptothrisamine 骨格は全く抗菌活性を示さないのに対し、アミノ酸側鎖構造を有する ST 類縁化合物は強力な抗菌活性を示すことから、ST 類縁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。また興味深いことに、これまでに天然より単離された ST 類縁化合物の側鎖構造は、 β -Lys タイプまたは Gly 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、側鎖構造の生合成メカニズムの解明は、その応用利用による新規 ST 類縁化合物の創製を可能にすると考えた。

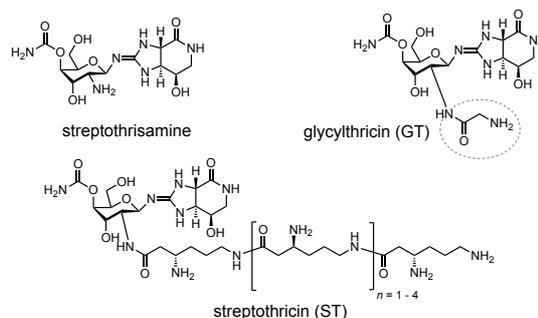


図1 ST および ST 類縁化合物の化学構造

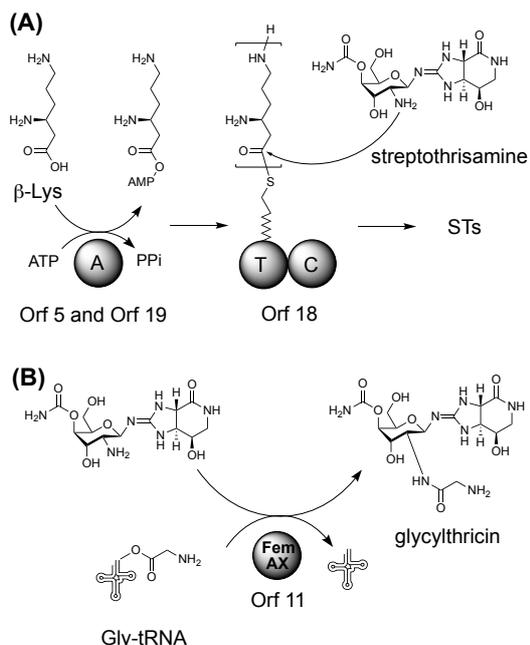


図2 (A) NRPS による oligo(β -Lys) 側鎖生合成
(B) tRNA^{aa} 依存型アミド合成酵素による Gly 側鎖生合成

そこでこれまでに我々は、ST 生産菌のゲノムライブラリーより、ST 生合成遺伝子を取得し、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) によって生合成されることを解明した¹⁾ (図 2A)。従って、側鎖に Gly を持つ ST 類縁化合物 GT においてもまた、ST の生合成と同じく NRPS によって Gly 側鎖形成が触媒されると予想した。しかしながら、予想に反し、GT 生合成遺伝子群には NRPS をコードする遺伝子が存在しておらず、FemAX family に相同性を示す Orf11 が、tRNA 依存的に Gly 側鎖の生合成を担っていることを明らかにした²⁾ (図 2B)。また、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 aa-tRNA^{aa} が存在することから、天然には Gly 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、GT だけでなく、Ala や Ser を側鎖に有する新規 ST 類縁化合物を生成することを明らかにした。従って Orf11 と Sba18 は高い相同性 (75%) を示しながら、その基質特異性は大きく異なり、Sba18 は aa-tRNA^{aa} 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。そこで次に、tRNA^{aa} 構造について詳細な基質認識機構を解析するために、tRNA^{Gly}、tRNA^{Ala}、tRNA^{Ser} を *in vitro* 合成し、人工 RNA 触媒 Flexizyme³⁾ を使って非天然型 Gly-tRNA^{aa} を調製し (図 3)、*in vitro* 酵素反応を行った。その結果、Sba18 は全ての Gly-tRNA^{aa} を基質認識し、GT を生成した。さらに興味深いことに、tRNA^{Gly} の acceptor stem 構造のみからなる tRNA mimic 基質 Microhelix RNA (図 3) を基質とした場合においても、Sba18 は GT を生成したことから、Sba18 の tRNA^{aa} 基質認識には、acceptor stem 構造が重要であることが判明した。

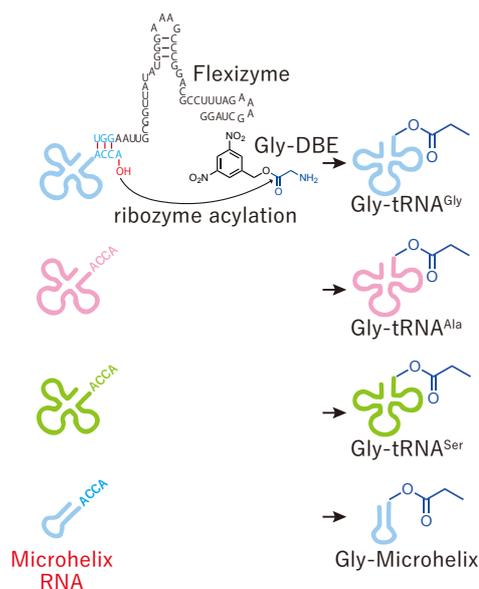


図 3 Flexizyme を利用した非天然型 Gly-tRNA^{aa} 人工合成

今後の展望

Sba18 はアミノアシル基に対しても幅広く基質認識する。これまでに、様々なアミノアシル基を有する合成基質を用いて酵素反応を行っており、すでに 20 種類を超える新規 ST 類縁化合物を創成した。今後は Sba18 の X 線結晶構造解析を進め、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。

謝辞

本研究は福井県立大学生物資源学部濱野研究室において行われたものであり、濱野吉十教授ならびに研究遂行に携わった学生諸氏に心より感謝申し上げます。

参考文献

1. C. Maruyama, J. Toyoda, Y. Kato, M. Izumikawa, M. Takagi, K. Shin-ya, H. katano, T. Utagawa, and Y. Hamano, A stand-alone adenylation domain forms amide bonds in streptothricin biosynthesis., *Nat. Chem. Biol.*, 8 (9), 791-797 (2012)
2. C. Maruyama, H. Niikura, M. Izumikawa, J. Hashimoto, K. Shin-ya, M. Komatsu, H. Ikeda, M. Kuroda, T. Sekizuka, J. Ishikawa, and Y. Hamano, t-RNA-dependent aminoacylation of an amino sugar intermediate in the biosynthesis of a streptothricin-related antibiotics., *Appl. Environ. Microbiol.*, 82 (12), 3640-3648 (2016)
3. M. Ohushi, H. Murakami, and H. Suga, The flexizyme system: a highly flexible tRNA aminoacylation tool for the translation apparatus, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 11 (5), 537-542 (2007)