

非リボソーム型ペプチド合成酵素の解析と機能改変

北海道大学 大学院地球環境科学研究所 森川 正章

研究の背景

提案者らは 1993 年に世界最強の界面活性作用を有するリポペプチドバイオサーファクタント (Arthrofactin と命名, 以下 AF) 生産菌 *Arthrobacter* sp. (後に *Pseudomonas* sp.) MIS38 を油田土壌より発見した。AF は D 型 7 残基を含む 11 残基 (最多) のアミノ酸と炭素鎖長 8-12 の直鎖 β -ヒドロキシ脂肪酸からなる環状リポペプチドであり, 植物病害微生物に対する抗菌活性など有効な生理活性も有する (図 1)。AF をはじめ D 型アミノ酸や修飾アミノ酸あるいは脂肪酸などを含む複合ペプチド類の生合成反応は通常のタンパク質合成反応とは異なり, リボソームや mRNA/tRNA には依存せずに巨大合成酵素複合体 (non-ribosomal peptide synthetase: NRPS) によって組成アミノ酸が逐次活性化されて連結されることにより進行する。興味深いことに, NRPS はモジュール構造を持ちその順番と数は生産物であるペプチドと一致している。最終段階では合成酵素複合体末尾のチオエステラーゼ部分で生産物の切離しと環状化反応が同時に起こる。

既に 40 kb からなる AF 合成遺伝子クラスター (*arfABC*) の取得に成功し, その解析から *arfABC* が NRPS 遺伝子として従来にない革新的な構造を有することを見出した [1]。具体的には ArfA (234 kDa) は 2 つ, ArfB (474 kDa) は 4 つ, ArfC (648 kDa) は 5 つのモジュールを有していた。通常ひとつのモジュールは組成アミノ酸の活性化に重要なドメイン (A-domain) と (T-domain), ペプチド結合形成に重要な縮合ドメイン (C-domain), およびアミノ酸の D/L 変換反応に必須なエピメラーゼドメイン (E-domain) で構成される。そして最後のモジュールにのみ環状化反応および産物ペプチドの切り出しを触媒するチオエステラーゼドメイン (Te-domain) が含まれる。ところが, AF には D 型アミノ酸が 7 つ含まれているにも関わらず, *arfABC* には E-domain 遺伝子が全く含まれない (これまで研究例が多い *Bacillus* 属細菌由来の NRPS では D 型アミノ酸の数だけ E-domain が含まれる)。さらに, *arfC* 3' 末端部分にコードされる Te-domain が活性中心構造を 2 つ有する双頭構造という大変ユニークなものであった (図 2)。さらに, AF の D-Leu (1 番目) と L-Leu (7 番目) を活性化するドメインをコードする遺伝子領域をそれぞれ大腸菌内で大量発現し, 得られた組換え酵素の基質特異性を調べたところ, いずれも L-Leu のみを基質とした。

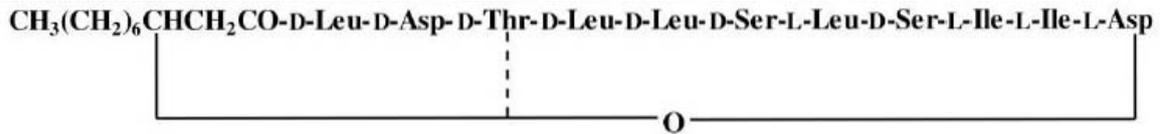


図 1. アルスロファクチン (AF) の化学構造

本研究の目的は NRPS として特殊な遺伝子構造を有する AF 合成酵素複合体 (ArfABC) の分子メカニズムを詳細に検討し, NRPS の分子進化と多様性を検討すると共に, 新規複合ペプチド合成系の開発を目指した基礎研究を推進することである。具体的には (1) 他の生物種の類似酵素遺伝子クラスターには通常含まれている産物ペプチドの組成アミノ酸を L 型から D 型へ逐次変換する活性を有するエピメラーゼ (E-domain) 遺伝子領域が *arfABC* には欠落している理由を探ること。および (2) *arfABC* 末尾にコードされているユニークな双頭型 Te-domain の構造機能相関解析を行うことを目的として研究を進めた。

研究の成果

(1) エピメラーゼ遺伝子の探索

推定 E-domain 遺伝子をゲノムより探索した。AF 生産菌 *Pseudomonas* sp. MIS38 と同属で比較的近縁な種である緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa* PA01) のゲノム解析が終了している。詳細なデータベース解析の結果同ゲノム中に, エピメラーゼ (あるいはラセマーゼ) として機能するのに必要な活性中心アミノ酸残基を含む機能未知の ORF (open reading frame: AAG05812) が存在することを見出した。同遺伝子部分を *P. aeruginosa* PA01 ゲノムから PCR 法を用いて増幅したものをプローブとして MIS38 株ゲノムの制限酵素消化物に対してサ

ザン解析を行ったところ、明瞭な単一シグナルが得られた。そこで本遺伝子領域および近傍領域をクローニングし、塩基配列決定および遺伝子構造解析を行った結果、本遺伝子領域には鉄イオンの取り込みに重要な環状ペプチド：シデロフォア的一种である Pyoverdine (Pvd38) 合成酵素がコードされていることが予想された。次に本遺伝子領域内に E-domain として機能するのに十分な ORF の存在を確認したので MIS38 株染色体上で同遺伝子領域を破壊した。その結果、Pvd38 の生産性は完全に失われた。以上のことから本遺伝子は Pvd38 合成遺伝子であることが証明された。さらに、遺伝子破壊体の AF 生産物には D-アミノ酸が含まれていたことから Pvd38 の E-domain は ArfABC とは無関係であることが判った。一方、我々が遺伝子提供した米国の研究グループによって ArfABC の縮合活性ドメイン (C-domain) が縮合活性と同時にエピメラーゼ活性を有することが報告された [C. J. Balibar *et al.* 2005]。すなわち、ArfABC には独立した形ではなく dual E/C-domain という全く新しいハイブリッド酵素としてアミノ酸異性化反応を触媒する機能が含まれていたのであった。そこで、ArfABC を含む種々の NRPS C-domain の一次構造について系統解析を行って見たところ、D-peptidyl donor 型と L-peptidyl donor 型に明確に分けられることが判った [2]。

(2) チオエステラーゼドメインの構造機能相関解析

次に *arfABC* (AF 合成酵素複合体遺伝子) のうち *arfC* 3' 末端にコードされているチオエステラーゼドメインに関する機能解析を行った。本酵素はエステラーゼ活性中心モチーフ [Ser/Asp/His: Gly-Xxx-Ser-Xxx-Gly] を 2 組含んでいる他に例を見ない双頭酵素 (ArfC_Te1/Te2) である。本酵素が触媒する反応は合成酵素複合体からのペプチド産物 (AF) の切離しと環状化反応である。そこで、Te1, Te2 それぞれの活性中心を別々に破壊した変異酵素遺伝子を MIS38 株内で構築し、変異酵素によって生産される AF の構造を解析した。第一番目の活性中心について作製した ArfC_Te1:S89A, ArfC_Te1:S89T, ArfC_Te1:E26G/F27A 変異酵素はいずれも AF 生産性を完全に失っていた。一方、第二番目の活性中心変異あるいは欠失酵素 ArfC_Te2:S92A, ArfC_Te2:S92A/D118A, ArfC Δ Te2 は正常酵素の 5% 程度の活性が保持されていた。また産物 AF は環状ペプチド構造を維持していた。これらの結果から、Te1 は単独で機能し得ると共に AF 合成に必須であり、Te2 は Te1 による産物ペプチドの環状化および切り出し効率をさらに上昇させるのに寄与していることが明らかとなった [3]。

以上、本研究課題の推進によって *Pseudomonas* 属細菌が有する特異なりボソーム非依存型ペプチド合成酵素 (ArfABC) の分子進化的特徴付けおよびその活性発現機構の未解明な点がいくつか明らかとなった。

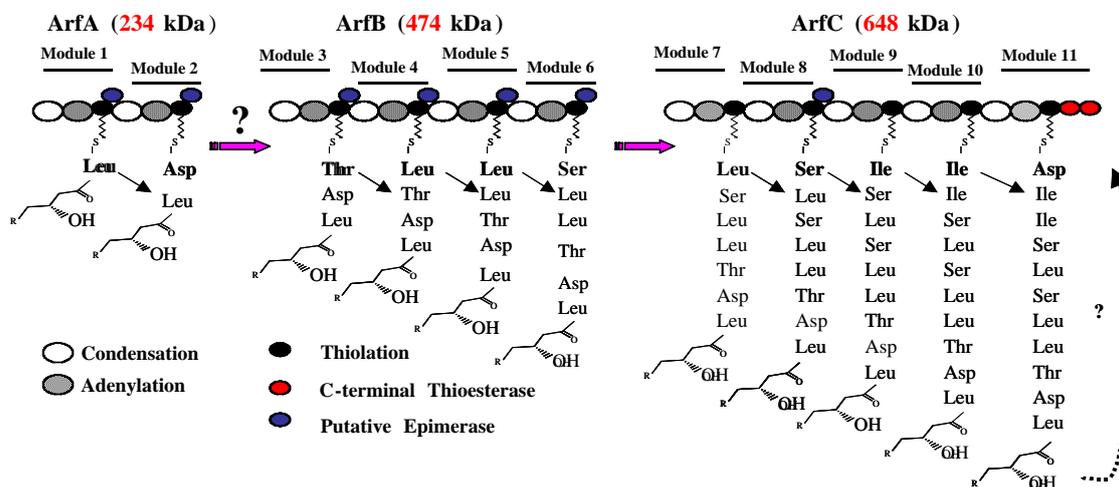


図2. アルスロファクチン合成酵素反応概念図

- [1] Roongsawang N, Hase K, Haruki M, Imanaka T, Morikawa M, Kanaya S. (2003)
Cloning and characterization of the gene cluster encoding arthrfactin synthetase from *Pseudomonas* sp. MIS38.
Chem. Biol. **10**, 869-880
- [2] Roongsawang N, Lim S-P, Washio K, Takano K, Kayana, Morikawa M. (2005)
Phylogenetic analysis of condensation domain in the nonribosomal peptide synthetases.
FEMS Microbiol. Lett. **252**, 143-151
- [3] Roongsawang N, Washio K, Morikawa M. (2007)
In vivo characterization of Tandem C-terminal thioesterase domains in arthrfactin synthetase.
ChemBioChem in press (DOI: 10.1002/cbic.200600465)