

薬用植物や共生微生物における プレニルトリプトファン合成酵素の機能解析研究

申請代表者 岡田 正弘 東京大学大学院薬学系研究科天然物化学教室 准教授
所内共同研究者 森田 洋行 資源開発部門天然物化学分野 教授

■背景・目的

翻訳後修飾とは、タンパク質が翻訳を受けた後に起こる化学修飾などのことであり、20種類のアミノ酸残基に構造的多様性を与えるだけでなく、多くのタンパク質は翻訳後修飾を受けて初めて生理的な機能を有する成熟型となることから、翻訳後修飾によりタンパク質の機能発現が動的に制御されている。これまでに、様々なアミノ酸上において様々な修飾様式が知られており、その中の一つにイソプレニル化がある。この修飾様式は、担子菌類の交配時の接合管形成を誘導するペプチドフェロモンのC末端のシステイン残基において初めて発見された。その後、イソプレニル修飾を受けるためのコンセンサス配列が解明された結果、様々な生物にも存在することが明らかとなり、システイン残基のイソプレニル化は真核生物に普遍的に存在し、機能発現に必須な翻訳後修飾であることが判明した。また、ヒトのガン遺伝子産物であり、ガンの転移に関与すると考えられているK-Rasにおいてもシステイン残基のイソプレニル化によりその機能が制御されていることが明らかとなったことから、イソプレニル化酵素を標的タンパク質とした抗ガン剤の開発が進められるようになるなど、システイン残基のイソプレニル化に関する研究が精力的に進められている。

一方で、原核生物には翻訳後修飾によるシステインのイソプレニル化は今のところ見つかっていないが、我々は、グラム陽性細菌である枯草菌の形質転換を誘導するクオラムセンシングフェロモンであるオリゴペプチド、ComXフェロモンのC末端付近に存在するトリプトファン残基がイソプレニル化されていることを初めて発見した。増殖の早い細菌にとって集団の数は重要な環境要因であり、クオラムセンシングと呼ばれる細胞密度依存的な遺伝子発現により様々な現象を引き起こしており、例えば、バイオフィルムの形成、抗生物質や毒素の生産、胞子形成や形質転換、生物発光など、特徴的な現象の多くがクオラムセンシングによって制御されている。細菌の密度感知方法は単純明快であり、フェロモン分子を常に分泌することで、集団の数（細胞密度）をフェロモンの濃度に置き換えて感知しており、言い換えれば、細菌の振る舞いはフェロモンによって制御されているのである。従って、ComXフェロモンの生合成機構の詳細が明らかとなれば、クオラムセンシングによって制御されている特徴的な現象の制御機構が明らかとなる可能性が高い。後述するように、枯草菌の近縁種の納豆菌においては、イソプレニルトリプトファンを有する納豆ペプチドであるComXnattoフェロモンがネバネバの原因となるバイオフィルムの形成を制御していることが明らかとなり、また、枯草菌と同属の炭疽菌においては芽胞形成に*comX*関連遺伝子の関与が示唆されている。さらに、未発表ながら様々な細菌からトリプトファン残基のイソプレニル化酵素の候補遺伝子を既に見い出しており、これらの酵素もクオラムセンシングフェロモンの生産に関与していることが多分に予想される。クオラムセンシングは、近年、創薬ターゲットとして注目されているため、本研究では、枯草菌由来新規トリプトファンプレニル化酵素の生体内での役割及び既に見いだした類似酵素の機能の同定を目的とする。天然物化学を基盤としながらも、分子生物学から構造生物学に至るまで多岐に渡る方法論を駆

使うことにより、イソプレニルトリプトファン含有ペプチドの生命現象誘導の役割を解明する。

■結果・考察

納豆は、日本にとっては大変なじみ深い食品で、現在では健康食品として注目されており、古くは、香豉（こうし）の名前で生薬としても用いられてきた。納豆は、大豆を発酵させて作られるが、その際に用いる納豆菌は、枯草菌の近縁種にあたる。従って、両細菌は遺伝子情報が非常によく似ているのだが、表現型における枯草菌と納豆菌の最も大きな違いは、バイオフィルムの形成にあり、納豆菌は納豆特有のネバネバを生み出すポリ多糖や、ポリガンマグルタミン酸を生合成することでバイオフィルムを形成する。このポリガンマグルタミン酸の生合成に *comQXnatto* 遺伝子クラスターが関与していると報告された (LS Tran, *et al.*, *Mol. Microbiol.* **2000**, 37, 1159)。枯草菌由来の ComX フェロモンはアミノ酸 6~10 残基からなるオリゴペプチドであり、菌株ごとに大きく異なるアミノ酸配列を有しているが、C 末端から 3 番目もしくは 4 番目に存在するトリプトファン残基が、ゲラニル化もしくはファルネシル化され、さらにプロリン様の 5 員環が形成されている。これは、前駆体ペプチドである ComX が修飾酵素 ComQ によりイソプレニル化された後、N 末端側がプロセシングされて生合成されと考えられている。従って、納豆菌においても枯草菌と同様に、納豆菌由来の修飾酵素 ComQnatto により前駆体ペプチドである ComXnatto がイソプレニル修飾された後に ComXnatto フェロモンとなり、ポリガンマグルタミン酸の生合成を誘導すると容易に推測されるが、実際に ComXnatto フェロモンが確認されたことはなかった。そこで納豆菌由来の *ComXnatto* フェロモンと機能解明を目的に研究を行い、納豆菌由来の *comQXnatto* 遺伝子クラスターを発現させた大腸菌の培養液を LC-MS を用いて分析した結果、73 アミノ酸からなる ComXnatto の 53 番目から 58 番目のアミノ酸残基に相当する配列を有し、C 末端から 20 番目 (N 末端から 54 番目) のトリプトファン残基がファルネシル化された修飾ヘキサペプチドを見いだした (図 1)。さらに化学合成を行

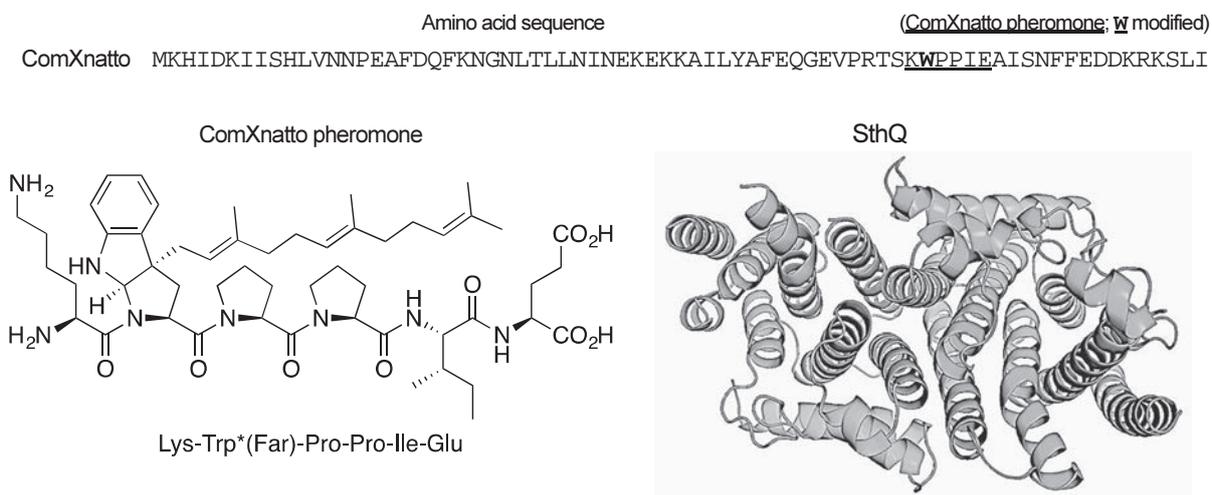


図 1. 納豆菌由来の ComXnatto のアミノ酸配列 (上) および、納豆菌由来の ComXnatto フェロモン (左) と、トリプトファンイソプレニル化酵素 SthQ (右) の構造。

い、このペプチドが納豆のネバネバの原因物質であるポリガンマグルタミン酸の生合成を促進させる ComXnatto フェロモンであることを明らかにした。

この結果は従来の枯草菌由来の ComX フェロモンとはいくつか異なっていた。まず、前駆体ペプチド ComXnatto の C 末端から 3 番目もしくは 4 番目にはトリプトファン残基が存在せず、C 末端

から 20 番目にトリプトファン残基 (N 末端から 54 番目) が唯一存在すること、さらに、そのトリプトファン残基が修飾酵素 ComQnatto により、環化を伴うファルネシル化されていること、また、ComXnatto の N 末端側だけでなく、C 末端側もプロセシングされて ComXnatto フェロモンが生合成されることである (図 1)。特に、枯草菌由来の修飾酵素 ComQ は C 末端から 2~4 番目に存在するトリプトファン残基を認識し、イソプレニル化するため、納豆菌由来の修飾酵素 ComQnatto は基質ペプチドに含まれるトリプトファン残基の認識機構や、基質許容性に大きな違いがあると考えられた。そこで、次に、納豆菌由来の *comQnatto* 遺伝子と *comXnatto* 遺伝子をそれぞれ発現させた大腸菌の培養液から修飾酵素 ComQnatto と前駆体ペプチド ComXnatto をそれぞれ精製し、ファルネシルニリン酸存在下、in vitro 反応を行った。得られた反応液を LC-MS を用いて分析した結果、C 末端から 20 番目のトリプトファン残基がファルネシル化された、73 アミノ酸残基からなるファルネシル ComXnatto を見いだした。続いて、様々な長さの ComXnatto 類縁体ペプチドを調製し、同様に in vitro 反応を行った結果、C 末端側が短い [1-58]ComXnatto、N 末端側が短い [53-73]ComXnatto、両末端側が短い [53-58]ComXnatto のいずれも修飾酵素 ComQnatto は基質として認識して、ファルネシル化することが明らかとなった。さらに、種々の基質を用いて検討した結果、驚くべきことに修飾酵素 ComQnatto はトリプトファン単体ですら基質として認識して、ファルネシル化できることが明らかとなった。以上の結果から、修飾酵素 ComQnatto は、極めて基質許容性が高いトリプトファン残基のファルネシル化酵素であることが明らかとなった。

一方で、修飾酵素 ComQ の基質認識機構やイソプレニル化の詳細を明らかにすべく、共同研究者である森田洋行教授らの研究グループとトリプトファンイソプレニル化酵素の X 線結晶構造解析を行った。残念ながら、ComQnatto の結晶化には現在のところ成功していないものの、クロロフレキサス門細菌である *Sphaerobacter thermophilus* 由来のトリプトファンイソプレニル化酵素 SthQ について結晶化に成功し、構造を明らかにすることが出来た (図 1)。トリプトファン残基のイソプレニル化酵素はシステイン残基のイソプレニル化酵素や、低分子二次代謝産物であるインドールアルカロイドなどのトリプトファン (もしくはインドール) のプレニル化酵素とはアミノ酸配列に相同性がないが、イソプレニルニリン酸合成酵素とある程度の相同性が見られる。このイソプレニルニリン酸合成酵素はファルネシルニリン酸もしくはゲラニルニリン酸と、イソペンテニルニリン酸を縮合し、ゲラニルゲラニルニリン酸もしくはファルネシルニリン酸を合成する酵素で、それぞれの基質認識部位が存在し、アスパラギン酸を多く有することからそれぞれ FARM(the First Aspartate Rich Motif)、SARM(the Second Aspartate Rich Motif) と呼んでいる。トリプトファンイソプレニル化酵素ではファルネシルニリン酸もしくはゲラニルニリン酸結合部位であると考えられる FARM は保存されているが、SARM は保存されていない。今回、得られた SthQ の結晶構造を既知のイソプレニルニリン酸合成酵素と比較すると、確かに両酵素の構造はよく似ており、また、ファルネシルニリン酸のミミックであるファルネシルチオニリン酸との複合体結晶の構造解析から、FARM がファルネシルニリン酸の結合部位であることが明らかとなった。しかしながら、トリプトファンイソプレニル化酵素固有の特徴もいくつか見られた。まず、イソプレニルニリン酸合成酵素は基質を取り込むことでオープンフォームからクローズドフォームへと構造が変化するのだが、SthQ ではアポ体とファルネシルチオニリン酸との複合体ではそれほど大きな構造変化が起きていなかった。興味深いことに、SthQ のアポ体とファルネシルチオニリン酸の複合体は、イソプレニルニリン酸合成酵素のオープンフォームよりもクローズドフォームとより構造が近かった。さらに、イソプレニルニリン酸合成酵素のクローズドフォームは FARM と SARM の C 末端側に存在するループ構造が変化して、基質結合ポケットに

フタをすることで引き起こされるのだが、SthQ では FARM と SARM の C 末端側にはループ構造が短いもしくは存在しないことが判明した。これらの特徴はイソプレニル二リン酸よりも大きな基質ペプチドを受け入れることを合理的に説明できることから、トリプトファンイソプレニル化酵素を特徴付けるものであると言える。

■結論

今回我々は、納豆菌由来のポリガンマグルタミン酸の生合成を誘導する ComXnatto フェロモンが、修飾酵素である ComQnatto によって基質である 73 アミノ酸残基からなる ComXnatto の C 末端から 20 番目 (N 末端から 54 番目) のトリプトファン残基がプロリン様の環化を伴うファルネシル化修飾を受け、さらに N 末端側だけでなく C 末端側もプロセシングされて 53 番目から 58 番目のアミノ酸残基に相当する修飾ヘキサペプチドとなって生合成されることを明らかにした。さらに、修飾酵素 ComQnatto は、全長の 73 アミノ酸からなる ComXnatto だけでなく、トリプトファン単体ですら基質として認識して、ファルネシル化できる極めて基質許容性が高い修飾酵素であることが明らかとなった。

一方で、クロロフレキサス門細菌由来のトリプトファンイソプレニル化酵素 SthQ についての X 線結晶構造解析を行い、その立体構造を明らかにするとともに、SthQ の基質認識機構の詳細を明らかにすることが出来た。