

Tabtoxin 合成細菌からの新規 L-アミノ酸リガーゼの取得

石倉 峻・有村 泰宏・新井 利信・木野 邦器
早稲田大学大学院 先進理工学研究科 応用化学専攻
〒169-8555 東京都新宿区大久保 3-4-1 電話: 03-5286-3211
Fax: 03-3232-3889 E-mail: kkino@waseda.jp

Tabtoxin は Tabtoxinine-β-lactam と Threonine が縮合したジペプチドで、*Pseudomonas syringae* が合成するタバコ野火病の原因物質である。我々は Tabtoxin のペプチド結合形成に L-アミノ酸リガーゼ (Lal) が関与することを予測し、*P. syringae* NBRC14081 の Tabtoxin 生合成遺伝子クラスターから、*tabS* と命名する新たな Lal 遺伝子を取得した。TabS は、タンパク質構成アミノ酸に β-Alanine を加えた計 21 種類のアミノ酸を基質にすると、136 種類に及ぶ組み合わせでジペプチドを合成するなど広範な基質特異性を示すとともに、少量ではあるが Lal としては初めて C 末端に Proline を含有したジペプチド Prolyl-proline や、高い発毛抑制作用を示す Phenylalanyl-β-alanine も合成可能であった。

1. はじめに

ペプチドはアミノ酸がアミド結合を介して縮合した化合物で、構成するアミノ酸単体には見られない新たな生理活性が発現したり、熱安定性、溶解度等の物理化学的性質が改善したりする例が多数見られ、様々な分野での応用展開が期待されている。

2005 年に、協和発酵バイオ (旧: 協和発酵工業) の田畑らによって、保護基を持たない遊離の L-アミノ酸 2 分子を ATP の加水分解反応と共役して直接縮合 (図 1) する酵素、L-アミノ酸リガーゼ (Lal, EC 6.3.2.28) が報告された [1]。輸液等に利用される Ala-Gln の生産で当該酵素を利用した発酵プロセスが開発されるなど、Lal の工業利用が進んでいる [2]。しかしながら、本法により合成可能なジペプチドの種類は、酵素の基質特異性に制限されるため、合成ジペプチドの多様化・拡張を考えると新たな Lal の取得が必要となる。

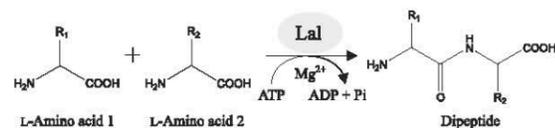


図 1. Lal によるジペプチドの合成反応

筆者らは新たな基質特異性を有する Lal を探索するにあたり、(a) 既知の Lal との相同性に基づく、ゲノム情報を活用した *in silico* 探索、(b) ペプチド性二次代

謝産物に着目し、その生合成に関与すると推定される Lal の探索、という 2 つの戦略を実践してきた [3]。後者においては、ペプチド性抗生物質 Rhizocticin や植物病原性ペプチド Phaseolotoxin を生産する微生物からペプチド結合形成に関わるタンパク質を推定し、基質特異性の異なる新規 Lal を見出すことに成功している [4-6]。

本研究では、ある特定の *P. syringae* が生産するタバコ野火病の原因物質 Tabtoxin に着目した。Tabtoxin (図 2) は Tabtoxinine-β-lactam と Thr が縮合したジペプチドで、このペプチド結合形成を Lal が担っていると予測し、Tabtoxin 合成細菌からの Lal の取得を試みた。

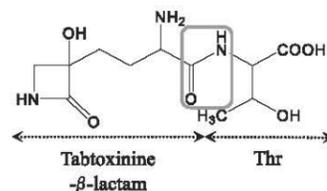


図 2. Tabtoxin の化学構造

2. Tabtoxin 合成細菌由来の新規 Lal の探索

Tabtoxin においては *P. syringae* BR2 由来の生合成遺伝子クラスターが報告されていた [7]、生合成機構については未だ明らかとされていなかった。そこで、BR2 株由来の遺伝子クラスターを詳細に解析したところ、AAP13071 遺伝子にリガーゼ酵素に特有な ATP-Grasp motif [8] が存在することを見出した。BR2 株が適当な

分譲機関にリストされていなかったことから、同じく Tabtoxin 合成活性を有する *P. syringae* NBRC14081 のゲノム DNA を鋳型として、該当する遺伝子を AAP13071 遺伝子の塩基配列を基に PCR 法により増幅した。取得した遺伝子を *tabS* と命名し、塩基配列を決定した結果、AAP13071 遺伝子と塩基配列で 99%、アミノ酸配列では完全に一致していた。

3. TabS の基質特異性評価と諸性質検討

TabS は、大腸菌を用いて、N 末端 His-tag 融合タンパク質として調製した。タンパク質構成アミノ酸に β-Ala を加えた計 21 種類のアミノ酸を組み合わせてペプチド合成反応 (12.5 mM Amino acid substrates, 12.5 mM ATP, 12.5 mM MgSO₄ · 7H₂O, and 0.1 mg/ml of TabS in 100 mM Tris-HCl buffer, pH8.0) を行い、生成物を LC-ESI-MS で解析した。その結果、使用した基質から予想されるジペプチドに相当する分子量ピークが数多く検出され、その組み合わせは 136 種類に及んだ (図 3)。なお、D-体のアミノ酸は基質として認識しなかった。

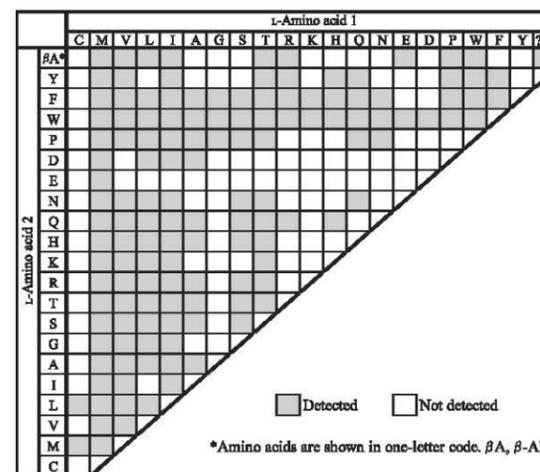


図 3. LC-ESI-MS 分析による TabS の基質特異性評価

Leu を基質とした際の最適温度は 40℃、最適 pH は 9.5 であった (反応時間 3 h)。また、加熱安定性については 40℃、15 分間の加熱までは高い安定性を示したが、45℃以上において急激に失活した。2 価の金属イオンとしては、Mg²⁺の他に Co²⁺も利用可能であった。

さらに、C 末端 Pro 含有ペプチドには血圧降下作用が、Phe-β-Ala には発毛抑制作用がそれぞれ報告されていることから、これらジペプチドの合成を検討した。先の条件を一部変更し、基質アミノ酸を (1) Ala (20 mM) + Pro (100 mM)あるいは (2) Phe (40 mM) + β-Ala (40 mM)

とする反応を行った (pH 9.0, 30℃, 20 h)。その結果、(1) では Pro-Ala (6.3 mM) が主生成物となったが、Pro-Pro (0.6 mM) も生成した。また、(2) においては、Phe-Phe に加えて Phe-β-Ala (0.12 mM) の生成を確認した。両合成活性ともに Lal としては初めての報告となる。

4. 今後の展望

最近、ジペプチドの多様な生理機能が明らかとなってきた。本研究により合成可能なジペプチドがさらに拡張したことで、今後は有用性の高いジペプチドの合成プロセスの構築が期待される。また、アミノ酸が 3 個以上結合したオリゴペプチドにも有用な生理活性を有するものが多い。筆者らはオリゴペプチド合成活性を有する Lal を複数見出して [6, 9]、これらを組み合わせた革新的なペプチド合成法の開発を検討している。

また、筆者らが *in silico* 解析にて取得した Lal の多くは微生物体内で果たす役割について未解明のままであるが、本研究の Tabtoxin や Rhizocticin、Phaseolotoxin 生産菌における Lal 研究は、微生物の二次代謝産物合成に関わる学術的知見の集積にも大きな役割を果たしている。

今後は、新たな基質特異性を有する Lal の探索と併せて、基質特異性や鎖長制御の機構を立体構造解析から明らかにし、新規 Lal の創製に挑戦していく予定である。

参考文献

- [1] Tabata K, *et al.*: J. Bacteriol., 187(15), 5195-5202 (2005)
- [2] Tabata K, and Hashimoto S: Appl. Environ. Microbiol., 73(20), 6378-6385 (2007)
- [3] 木野邦器: 生物工学会誌, Vol.87 No.4, 186-189 (2009)
- [4] Arai T, and Kino K: Biosci. Biotechnol. Biochem., 72(11), 3048-3050 (2008)
- [5] Kino K, *et al.*: Biosci. Biotechnol. Biochem., 73(4), 901-907 (2009)
- [6] Kino K, *et al.*: Biosci. Biotechnol. Biochem., 74(1), 129-134 (2010)
- [7] Kinscherf TG, and Willis DK: J. Antibiot., 58(12), 817-821 (2005)
- [8] Galperin MY, and Koonin EV: Protein Sci., 6(12), 2639-2643 (1997)
- [9] Arai T, and Kino K: Biosci. Biotechnol. Biochem., 74(8), 1572-1577 (2010)