



富山県立大学
工学部生物工学科
准教授
博士（農学）
尾仲 宏康

1993年 東京大学農学部農芸化学科卒業
1995年 東京大学農学生命科学研究科
修士課程終了
1998年 同 博士課程修了
1999年 富山県立大学工学部 助手
2006年 同 講師
2010年 同 准教授

リボゾーム翻訳系により生合成される複素環ペプチド・ゴードスポリンの翻訳後修飾機構の解明

はじめに

構造の複雑な有機化合物を、生体システムを用いて効率的に生産する技術は、環境負荷の小さな次世代技術である。一方、抗生物質は微生物が生産する有用物質だが、その構造が複雑なため化学合成が難しい。そこで微生物体内での抗生物質合成の仕組みを遺伝子レベルで解明し、その遺伝子を組換えることによる新しい抗生物質の菌体内合成が試みられている。

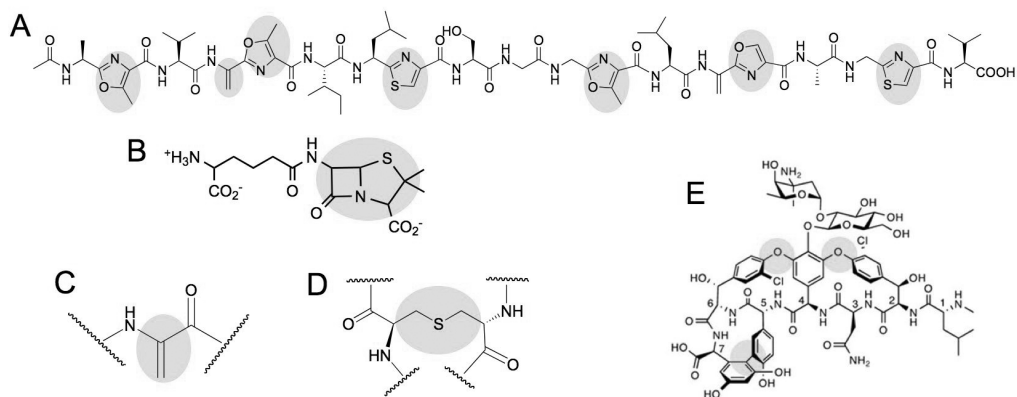


図1 ペプチドにおける構造を固定化させる修飾、A, ゴードスポリンに見られるチアゾール環及びオキサゾール環、デヒドロアラニン。B, ベータラクタム環。C, デヒドロアラニン。D, ランチオニン構造。E, バンコマイシンに見られるアミノ酸同士の架橋

生物の作る有機化合物の主なものにペプチドがある。ペプチドはアミノ酸が短くつながった分子であるため、タンパク質のように高次構造がとれず、構造柔軟性が高いという特徴がある。微生物の中には構造を固定化させる修飾をペプチド分子内に施すことによって、ペプチド分子に抗生物質や生理活性を与えているものがある。ペニシリンに見られるβラクタム構造や lantibiotics のランチオニン構造、バンコマイシンに見られるアミノ酸同士の架橋構造などはその代表的なものであり(図1)、抗生物質活性を生じさせるためにはこれらの構造が必要不可欠である(1)。

ゴードスポリンは、放線菌 *Streptomyces* sp. TP-A0584 が生産する二次代謝産物であり、他の放線菌に対して孢子形成、二次代謝誘導及び生育阻害活性を有する(2)。ゴードスポリンは 19 個のアミノ酸からなるペプチド化合物であるが、その内部にはチアゾール環及びオキサゾール環、デヒドロアラニン等の構造を固定化させる修飾が施されており、これらの構造が生理活性に重要である事が明らかになっている(図1)(3)。また、我々によるゴードスポリン生成遺伝子クローニングの結果、ゴードスポリンはその前駆体アミノ酸配列が遺伝子として染色体にコードされており、リボゾームによって前駆体が翻訳合成され、翻訳後修飾によって生合成されることが明らかとなっている(図2)(4)。本研究では、ゴードスポリンのこれらペプチドの構造を固定化させる修飾を施す生合成酵素の解析を行い、新たな生理活性物質の創製へつなげることを目的として研究を行った。

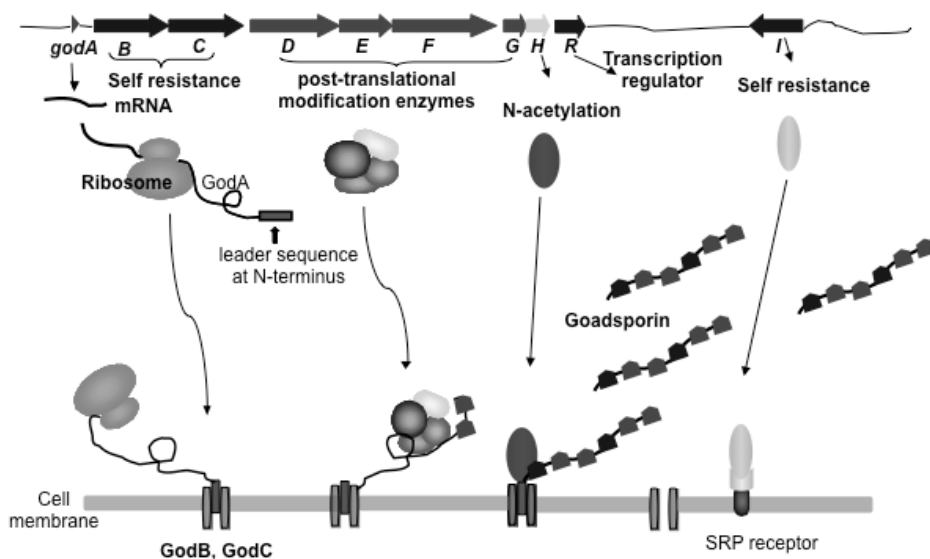


図2、ゴードスポリン生合成遺伝子クラスターと推定生合成経路。godAは構造遺伝子であり、ゴードスポリンの前駆体ペプチドをコードしている。godD, E, F, G, Hが翻訳後修飾酵素をコードしており、翻訳後修飾によってゴードスポリンが生合成される。godIは自己耐性遺伝子をコードしており、godRは生合成遺伝子クラスターの転写を活性化する転写調節因子である。

方法及び結果

ゴードスポリン生合成遺伝子の遺伝子破壊による機能解析

ゴードスポリンの生合成酵素は全部で9個の遺伝子産物 *godA*, *godB*, *godC*, *godD*, *godE*, *godF*, *godG*, *godH*, *godI* からなる (図2)。ゴードスポリン生合成において、構造柔軟性を失せ、ペプチドの構造を固定化させる修飾はセリン及びスレオニンのオキサゾール環化、システインのチアゾール環化、セリンのデヒドロアラニン化である。これら3種の修飾に関わる遺伝子は *godD*, *E*, *F*, *G* であることは同定されているが、それぞれの遺伝子産物の役割まではわかっていない。そこで、これら遺伝子の破壊株を作製し、生合成中間体を同定することによって、それぞれの遺伝子の機能を推定することにした。既に、これらの *god* 遺伝子クラスターを含む全長 14 kb の遺伝子断片を染色体組み込み型ベクター pTYM19(5)にクローニングして、*Streptomyces lividans* を形質転換し、ゴードスポリンの異種生産に成功している。本研究ではこの異種生産株を用いて *godD*, *godE*, *godF*, *godG*, *godH* 遺伝子破壊株を作製した。それぞれの遺伝子を二回相同組換えにより欠失させた $\Delta godD$, $\Delta godE$, $\Delta godF$, $\Delta godG$, $\Delta godH$ 株を取得した。これらの生産物を HPLC によって同定したところ、 $\Delta godF$ にゴードスポリンとは異なる溶出位置にゴードスポリンと同じ UV 吸収を持つピークが認められた (図3)。その他の破壊株においてはゴードスポリンの溶出ピークは消失していたが、残念ながら、その生合成中間体と思われる類縁体の溶出ピークは検出できなかった。検出できなかった理由は不明であるが、可能性の一つとして、生合成中間体が不安定で分解した可能性が考えられた。

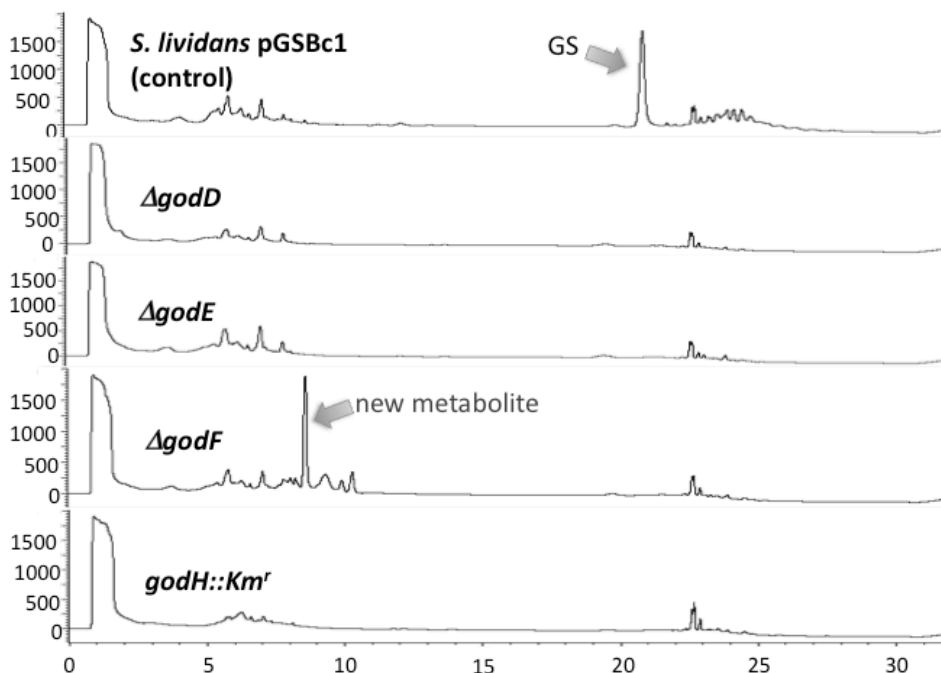


図3 生合成遺伝子破壊株の培養粗抽出物の HPLC プロファイル。control 中の GS はゴードスポリンのピークを示す。他の破壊株においてはゴードスポリンに該当するピークは見られなかった。 $\Delta godF$ 株においては、新たな生産物ピークが認められた。

次に、 $\Delta godF$ の生産物の精製を行った。培養 7 日目の培養液 20 L をブタノールで抽出し、溶液分画の後、LH-20, ODS, 逆相 HPLC の 3 段階のカラム精製を行い、最終的に 26.9 mg の純品を得た (図 4)。

NMR および MS による構造決定を行ったところ、ゴードスポリンに二カ所存在するデヒドロアラニン部位がセリン残基に置換したゴードスポリン類縁体であることが明らかとなった (図 5)。

以上のことから、 $\Delta godF$ 産物はセリン残基を脱水し、デヒドロアラニンに変換する酵素であることが明らかとなった。また、このゴードスポリン類縁体の生物活性を調べたところ、他の放線菌に対する孢子形成、二次代謝誘導及び生育阻害活性を消失していた。以上のことから、ゴードスポリンの構造において、デヒドロアラニン構造は生物活性に重要な構造であることが明らかとなった。

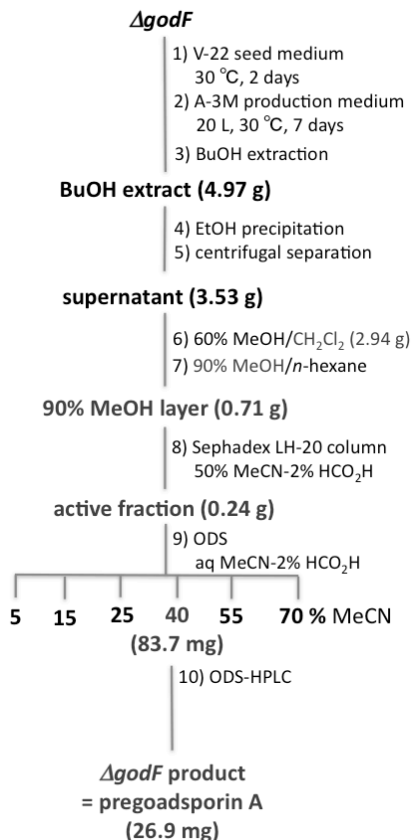
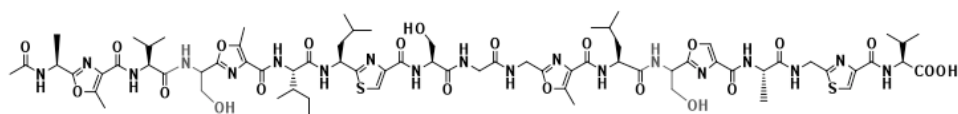


図 4 $\Delta godF$ の生産物の精製スキーム



molecular weight : 1647
Molecular formula : C₇₂H₁₀₁N₁₉O₂₂S₂

図 5 $\Delta godF$ 生産物の化学構造

おわりに

ペプチドは生体内において重要な役割を果たしており、多様なアミノ酸の組み合わせ配

列により様々な生体分子と相互作用を行うことができることは、抗体の作用機構から容易に推察できる。ゴードスポリンはリボゾーム翻訳により生合成されるペプチドであり、その基本骨格構造が遺伝子配列としてコードされているという特徴を有している。このことから塩基配列の置換により容易に多様な類縁体を創製することが可能である。更にゴードスポリン生合成においては翻訳後修飾機構が存在しており、ペプチドに架橋構造を加えることにより、多様な生理活性を生じさせることができる。今後は、今回の研究成果を踏まえ、多様なゴードスポリン類縁体の合成を行い、有用ペプチド化合物創製を目指したい。

参考文献

1. Walsh, C. T., and Nolan, E. M. (2008) Morphing peptide backbones into heterocycles, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5655-5656.
2. Onaka, H., Tabata, H., Igarashi, Y., Sato, Y., and Furumai, T. (2001) Goadsporin, a chemical substance which promotes secondary metabolism and morphogenesis in streptomycetes. I. Purification and characterization, *J Antibiot (Tokyo)* 54, 1036-1044.
3. Igarashi, Y., Kan, Y., Fujii, K., Fujita, T., Harada, K., Naoki, H., Tabata, H., Onaka, H., and Furumai, T. (2001) Goadsporin, a chemical substance which promotes secondary metabolism and Morphogenesis in streptomycetes. II. Structure determination, *J Antibiot (Tokyo)* 54, 1045-1053.
4. Onaka, H., Nakaho, M., Hayashi, K., Igarashi, Y., and Furumai, T. (2005) Cloning and characterization of the goadsporin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. TP-A0584, *Microbiology* 151, 3923-3933.
5. Onaka, H., Taniguchi, S., Ikeda, H., Igarashi, Y., and Furumai, T. (2003) pTOYAMAcos, pTYM18, and pTYM19, actinomycete-*Escherichia coli* integrating vectors for heterologous gene expression, *J Antibiot (Tokyo)* 56, 950-956.

謝辞

本研究を助成いただきましたサッポロ生物科学振興財団に深く感謝致します。

