

アミノ基キャリアタンパク質を介したリジン等天然化合物の 新規合成システムに関する研究



東京大学大学院農学生命科学研究科 西山 真

はじめに

微生物は遺伝的な多様性が極めて高く、ユニークなシステムを発達・進化させ多種多様な天然化合物を合成することはよく知られている。筆者は高度好熱性細菌において新たなキャリアタンパク質であるアミノ基キャリアタンパク質 (Amino-group carrier protein; AmCP) を介する新規のリジン合成経路を発見し、その全容の解明をすべく研究を行ってきた。また、アーキアにおいて AmCP を介した合成システムがオルニチンやアルギニンの合成に関わることも明らかにした。そこからは、関連する代謝が生み出されていった進化の歴史を垣間見ることが可能になった。さらに、同様な AmCP を介したシステムが、放線菌において非タンパク質性アミノ酸を作り出す二次代謝に転用されていることも明らかにしてきた。ここでは、AmCP を介したリジン合成システムの発見ならびにその後展開してきた筆者の研究を概説する。

1. AmCP を介したリジン合成システムの発見

リジン合成経路としては、細菌や植物が有するジアミノピメリン酸 (DAP) 経路、およびカビや酵母が有する α アミノアジピン酸 (AAA) 経路が知られている。前者はアスパラギン酸を初発物質として DAP を経由する経路、後者は α ケトグルタル酸を初発物質として AAA を経由する経路で、両者に共通の反応や生成中間体化がないことから、この両合成経路は独立の起源を持つと信じられてきた。筆者らは化学変異剤を用いて高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* のリジン要求性変異株を取得し、リジン要求性を相補する DNA 断片を取得した。その結果、同 DNA 断片には AAA 経路を構成するホモアコニターゼ遺伝子が見出され、それを破壊した *T. thermophilus* の変異株はリジン要求性を示した。ホモアコニターゼ遺伝子破壊株は AAA の添加によりリジン要求性が相補されることから、*T. thermophilus* は細菌として初めて AAA を経るリジン合成を有することが明らかになった。

カビや酵母は AAA 経路でリジンを合成するが、*T. thermophilus* のリジン合成はその後半部分、すなわち AAA からリジンへの変換プロセスがカビや酵母のものとは異なっていた。そのプロセスに関わる酵素の多くはリジンと同じ塩基性アミノ酸であるアルギニン合成に関わる酵素と類似しており、アルギニン合成では初発物質のグルタミン酸がオルニチンを経てアルギニンへと変換される。AAA は炭素鎖が1つ長いだけのグルタミン酸の構造類似化合物である。したがって、AAA を基質として同様な反応が起こればオルニチンよりも1炭素長い分子であるリジンが合成される。アルギニン合成では、まずグルタミン酸の α アミノ基がアセチル化され、側鎖の変換後に、付加したアセチル基が除去されて、オルニチンが生成される。このアセチル基は α アミノ基と生成中間体のセミアルデ

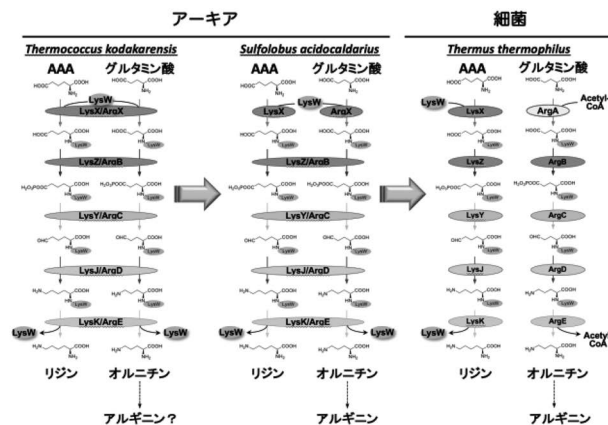


図1. AmCP を介したリジンおよびオルニチン合成

ヒドが脱水環化することを防ぐ保護基として働くと考えられている。AAA からリジンへの変換においては LysX が α アミノ基に保護基を付加すると推測されたが、LysX は ATP-grasp 構造を持つリガーゼと相同性を示したため、別の保護システムが予想された。試行錯誤の末に、LysX が AAA の α アミノ基とリジン合成遺伝子クラスター (BGC) 中にコードされる小タンパク質 LysW の C 末端グルタミン酸側鎖のカルボキシ基を結合させることを突き止めた。このシステムでは AAA は LysW に結合した状態でリジンへと変換され、最終段階でリジンとして LysW から切り出される (図1)。

AAA の α アミノ基保護にタンパク質が必要な理由を明らかにするため、筆者らは各合成酵素・LysW 複合体の構造を X 線結晶構造解析により決定した。その結果、合成酵素はいずれも活性中心周辺の分子表面が正に帯電し、そこに負に帯電した LysW が相互作用することが明らかになった (図2)。一方

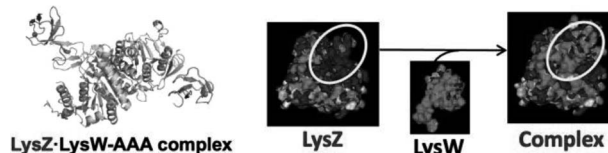


図2. リジン合成酵素 LysZ と LysW 複合体の結晶構造

で、これらの酵素は LysW が付加していない低分子に対しては、活性が著しく低下する。これらの事実は、LysW が単に基質、生成中間体のアミノ基を保護するだけでなく、自身に付加した基質を合成酵素へ運ぶキャリアタンパク質として機能することを示している。筆者らはこうしたタンパク質を AmCP と名付けることにした。

2. 超好熱性アーキアの AmCP を介したリジン・アルギニン生合成と推測されるアミノ酸生合成の進化

多くの超好熱性アーキアが *T. thermophilus* と同様に AmCP を用いてリジンを生合成することが推測された。 *Thermococcus* を対象にリジン生合成酵素について調べたところ、リジン生合成の前半に関わるホモイソクエン酸脱水素酵素が、リジン生合成における当該反応だけでなく、TCA 回路（アルギニン・オルニチン生合成）におけるイソクエン酸脱水素反応、ロイシン生合成における 2-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素反応を行うことが明らかになった。さらに、同アーキアのリジン生合成の後半の酵素群はいずれもオルニチン生合成酵素として機能しうることが分かった（図1）。一方 *Sulfolobus* はリジン生合成の後半に関わる遺伝子群として、*lysX* ホモログを 2 つ、それ以降の酵素遺伝子ホモログを 1 セットのみ有している。この 2 つの *lysX* ホモログにコードされるタンパク質の一方は AmCP に AAA を、他方は AmCP にグルタミン酸を付加する活性を有する。一方で、それ以外のホモログ酵素は *Thermococcus* 同様に AmCP に付加した AAA とグルタミン酸の構造の差を認識せずに両反応を行うことができた。さらに、AmCP をコードする遺伝子の破壊株がリジン、アルギニンの二重栄養要求性を示した。以上のことから、同リジン生合成酵素遺伝子群が実際にリジン・アルギニン（オルニチン）の両生合成を担うことが明らかになった（図1）。原始生命体は基質特異性の寛容な多重機能酵素を有しており、それらをコードする遺伝子がゲノム上で重複し、その遺伝子産物が基質特異性を獲得していったと考えられている。したがって、本研究で対象としたような多重機能を持つ祖先型酵素群が、現在の独立したロイシン生合成、リジン生合成、アルギニン生合成へと進化したとするのが最も合理的である。新規のリジン生合成の発見から、期せずして主要代謝系進化の歴史の一部を紐解くことができたと考えている。

3. 放線菌における AmCP を介した非タンパク質性アミノ酸生合成と天然化合物多様性創出機構

筆者らは、多様な二次代謝を有し、様々な天然化合物を生産する放線菌にも AmCP をはじめ幾つかのリジン生合成酵素様のタンパク質をコードする BGC が存在することを見出した。放線菌は他の一般的な細菌と同様に DAP 経路によってリジンを生合成することが知られている。したがって、同 BGC は二次代謝産物の生合成に関わると推測し、*Streptomyces* sp. SANK 60404 株を対象として同 BGC によって生合成される天然物を解析することにした。その結果、同菌の BGC にコードされる酵素群により、まずグルタミン酸が AmCP に付加した後、付加されたグルタミン酸は AmCP 上で非タンパク質性の新規アミノ酸 (2S,6R)-diamino-(5R,7)-dihydroxy-heptanoic acid (DADH) へと変換されること、そしてそれを基質とした修飾、結合反応により Vazabotide A と名付けたアジリジン環を含有する新規天然物が生合成されることを明らかにした。アジリジン環含有化合物としては抗腫瘍化合物 Azinomycin B や抗菌化合物 Ficellomycin のみが知られており、その BGC も明らかにされていたものの、アジリジン環を形成する機構は明らかにされていなかった。それらの BGC には DADH 生合成遺伝子が保存されていたことから、これらのアジリジン環も類似の機構で生合成されることが示唆された。そこで、Vazabotide A, Azinomycin B, および Ficellomycin を対象に研究を行った。そ

の過程で、Azinomycin B と Ficellomycin は DADH の 5,6 位の立体異性体（共に S）を中間体として生合成されることを見出し、放線菌が DADH の立体化学を制御することでアジリジン環含有化合物の立体にも多様性を生み出すことが分かった。さらにアジリジン環の生合成においては、生成した DADH の 6 位の水酸基がスルホ化され、隣接する 7 位のアミノ基からの求核攻撃により硫酸基の脱離を伴ってアジリジン環が形成されることを明らかにすると共に、責任酵素の結晶構造解析などからアジリジン合成機構を明らかにすることにも成功している（図 3）。

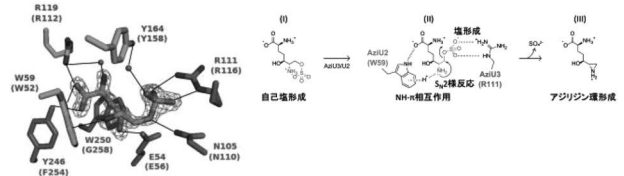


図3. アジリジン生合成機構

おわりに

筆者のアミノ酸生合成研究は、当時自分が研究していた酵素の遺伝子の近傍に AK をコードする遺伝子を見つけたことから始まった。単なるちょっとした興味で研究を開始したものが、新しいキャリアタンパク質を介するアミノ酸生合成システムの発見へと繋がっただけでなく、二次代謝産物の生合成研究へと大きく発展した（図4）。研究開始当初はこのような展開になるとは全く想像していなかったが、微生物の多様性には驚く

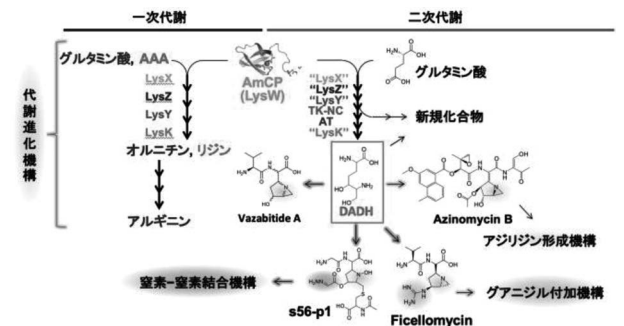


図4. AmCP を介した天然物生合成の多様性

ばかりである。現在、AmCP を介して造られる二次代謝産物の探索を継続しており、同システムからは幾つかの非タンパク質性アミノ酸骨格が造られることが分かってきた。それらの化合物の多くはこれまで必ずしも主たる研究対象となつてこなかった親水性化合物であり、新たな生物活性物質の発見も期待される。AmCP を介した天然物の構造多様性を創出する機構の全貌を明らかにすべく、今後も研究を続けていきたい。

謝辞 筆者を厳しくも楽しい研究の世界へと導いていただいた別府輝彦先生、故堀之内末治先生に深く感謝申し上げます。また、助教授時にご指導いただいた田之倉優先生、山根久和先生にも厚く御礼申し上げます。本研究の多くは、東京大学生物生産工学研究センター、および改組後の大学院農学生命科学研究科アグロバイオテクノロジー研究センター細胞機能工学研究室で行われたものであり、研究室をともに運営した葛山智久先生、古園さおり先生、富田武郎先生、吉田彩子先生、白石太郎先生をはじめ、多数の共同研究者のご協力、学生諸氏の頑張りによってなされたものです。心より御礼申し上げます。