

3. チロシンフェノールリアーゼの遺伝子および 発現調節機構の解析

近年, *Escherichia intermedia* や *E. herbicola* の TPL 遺伝子が *E. coli* にクローン化され, 塩基配列の解析が行われ, TPL の一次構造が明らかになった.³⁻⁶⁾ また, 本酵素の発現調節機構の解明が行われている. 鈴木らは *E. herbicola* TPL の誘導的生合成が転写レベルで調節されていることを明らかにし, カタボライトリプレッションによる調節機構をも解明した. さらに, 構造遺伝子上流域を解析することにより, 芳香族アミノ酸の生合成の調節因子である TyrR の結合サイトの存在を明らかにした. この結果, 芳香族アミノ酸生合成に関与する DNA 結合調節タンパク質 TyrR が, TPL という分解系酵素の生合成をも調節している可能性を示した.⁷⁾ この推察は, 最近 *Citrobacter freundii* の TPL プロモーターの TyrR による活性化として証明されている.⁸⁾ また, 片山らは *E. herbicola* での同様の調節機構を証明するとともに, 同菌の TyrR 遺伝子のクローン化に成功している.⁹⁾

文 献

- 1) Yamada, H. and Kumagai, H.: *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 19 (D. Perlman, ed.), 249-288, Academic Press, Inc., New York (1975).
- 2) 江井 仁, 中沢英次, 土田隆康, 滑川俊雄, 熊谷英彦: バイオサイエンスとインダストリー, **54**, 11-15 (1996).
- 3) Iwamori, S., Yoshino, S., Ishiwata, K., and Makiguchi, N.: *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 147-151 (1991).
- 4) Kurusu, Y., Fukusima, M., Kohama, K., Kobayashi, M., Terasawa, M., Kumagai, H., and Yukawa, H.: *Biotechnol. Letts.*, **13**, 762-772 (1991).
- 5) Iwamori, S., Oikawa, T., Ishiwata, K., and Makiguchi, N.: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **16**, 77-85 (1992).
- 6) Suzuki, H., Nishihara, K., Usui, N., Matsui, H., and Kumagai, H.: *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 145-148 (1993).
- 7) Suzuki, H., Katayama, T., Yamamoto, K., and Kumagai, H.: *Biosc. Biotech. Biochim.*, **59**, 2028-2032 (1995).
- 8) Smith, H. and Somerville, R. L.: *J. Bacteriol.*, **179**, 5914-5921 (1997).
- 9) 片山高嶺, 鈴木秀之, 山本憲二, 熊谷英彦: 農化 (大会講演要旨), **72**, 244 (1998).

ポリプレニルニリン酸合成酵素の構造と機能

—はじめて明らかにされた Z 型プレニル鎖延長酵素の構造—

古山 種俊

自然界に著しい構造の多様性を示して存在する化合物群, イソプレノイドはその炭素骨格構造が示すように, すべて C₅ のイソプレノ単位が直列に連なったプレニルニリン酸が生合成の基本となっており, 分子量数百万にも及ぶ天然ゴムに至るまで, 多種多様なイソプレノイドが生合成されている.

このプレニルニリン酸の合成反応を触媒するプレニル鎖延長酵素は一般に「プレニルトランスフェラーゼ」と総称されるが, その触媒する反応は有機化学的に見てもユニークで興味深い.^{1,2)}

Fig. 1 に示すように, プレニルトランスフェラーゼ反応はアリル性プレニルニリン酸のニリン酸基が脱離して生じるプレニルカチオンに「活性イソプレノ単位」と称されるイソペンテニルニリン酸 (IPP) が二重結合の移動を伴って縮合することで C-C 結合が形成され, イソプレノ単位 1 個の鎖延長がなされ, アリル性プレニルニリン酸が合成される. この生成物に IPP の立体特異的縮合反応が繰り返され, 個々の酵素に定められたプレニル

鎖長になると反応が停止する. IPP が縮合する度に形成される二重結合が E 型 (トランス) になるか Z 型 (シス) になるかによってプレニルトランスフェラーゼは二種類に大別される. 現在までに E 型プレニル鎖延長酵素は 10 種, Z 型プレニル鎖延長酵素は 5 種程がいろいろな生物より分離同定され, キャラクタライズされている.

プレニルトランスフェラーゼの遺伝子クローニングは 1987 年にラット肝臓の (E,E)-フェルネシルニリン酸 (FPP, C₁₅) 合成酵素について Edwards³⁾ らにより行われて以来, 現在までに 7 種類の E 型プレニル鎖延長酵素について報告されている. われわれは中等度好熱性細菌, *Bacillus stearothermophilus* の FPP 合成酵素⁴⁾ を皮切りに, C₃₀ のヘキサプレニルニリン酸合成酵素,⁵⁾ C₃₅ のヘプタプレニルニリン酸 (HepPP) 合成酵素^{6,7)} および C₅₀ のデカプレニルニリン酸合成酵素⁸⁾ 遺伝子を各種の細菌よりクローン化しているが, これらはいずれも E 型鎖延長反応を触媒するプレニルトランスフェラーゼである.

B. stearothermophilus の FPP 合成酵素遺伝子のクローン

著者紹介 東北大学反応化学研究所 (教授)

〒980-8577 仙台市青葉区片平2-1-1 TEL. 022-217-5621 FAX. 022-217-5620 E-mail: koyama@icrs.tohoku.ac.jp

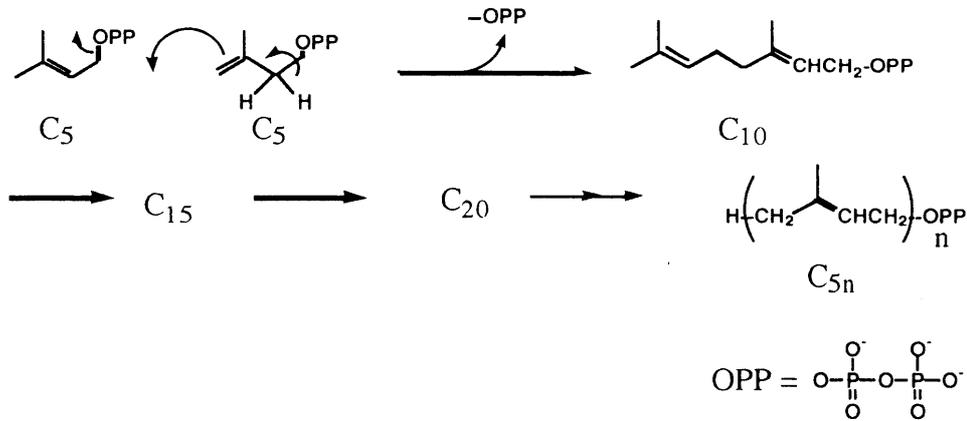


Fig. 1. Reactions catalyzed by prenyltransferases.

化により、その塩基配列に基づいて一次構造を推定し、その当時クローン化されていた他の生物由来の FPP 合成酵素 4 種を含む 7 種のプレニルトランスフェラーゼの一次構造の相同性比較を行った結果、プレニルトランスフェラーゼには生物起源や酵素の種類に関わらず 7 つの進化上よく保存された領域 (I~VII) が存在することが分かった。⁴⁾ この保存領域のアミノ酸配列を基にプライマーをデザインし、各種細菌のゲノム DNA をテンプレートとして PCR を行うことで他のプレニルトランスフェラーゼ遺伝子のプローブを作製し、クローン化を進めたわけである。

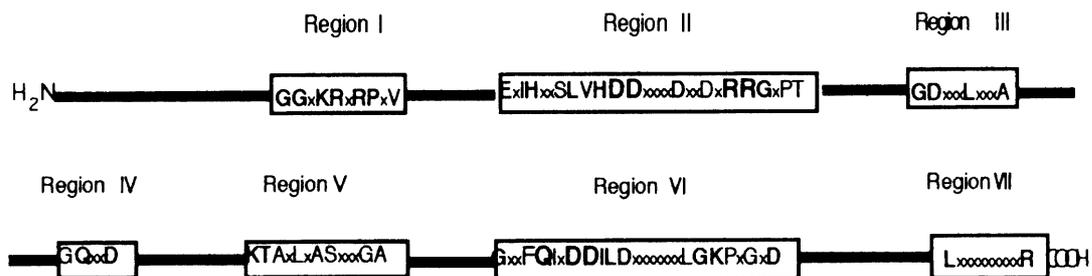
E 型プレニル鎖延長酵素の 7 つの保存領域のコンセンサス配列を Fig. 2 に示すが、特に領域 II と VI に保存されている Asp に富んだ DDXXD モチーフはプレニルトランスフェラーゼの触媒機能発現に必須であり、基質の結合にも重要な役割をしていることが、部位特異的変異導入研究⁹⁻¹¹⁾ で明らかとなった。

では *Z* 型プレニル鎖延長酵素の構造はいかがであろうか？ 前述した *E* 型プレニル鎖延長酵素の保存領域に基づく PCR では *Z* 型プレニル鎖延長酵素の遺伝子と考えられる DNA の増幅はまったく得られないのである。

われわれは以前、基質 IPP に関する *E* 型プレニル鎖

延長酵素での絶対立体化学と *Z* 型プレニル鎖延長酵素でのそれを枯草菌の HepPP 合成酵素¹²⁾ とウンデカプレニルニリン酸 (UPP) 合成酵素¹³⁾ について証明した。Fig. 3 にその結果を示すが、いずれも IPP の二重結合の *Si* 面側にアリル性プレニルカチオンが付加して C-C 結合が形成され、IPP の 2 位の脱離する水素 (*E* 型鎖延長反応では *pro-R*, *Z*-型鎖延長酵素反応ではすべて *pro-S* の水素が脱離する。) との関係はいずれも *syn* 型となっている。このことはプレニルトランスフェラーゼ反応を司る酵素の活性部位は *E* 型であれ *Z* 型であれ、類似した立体構造を有していることを暗示している。

Z 型プレニル鎖延長酵素として代表的な、ウンデカプレニルニリン酸 (UPP) 合成酵素の遺伝子クローニングを目的に各種細菌の UPP 合成酵素の精製を進めてきたが、クローン化に必要な種々の情報を得るのに十分な量の純化された UPP 合成酵素を得ることがなかなかできなかった。そこで、当研究室の大学院生清水直人君が簡便なスクリーニング方法を開発した。¹⁴⁾ ゲノム DNA ライブラリーのレプリカフィルターをそのまま放射性標識された IPP を含む UPP 合成酵素のアッセイ用反応液でインキュベートし、オートラジオグラフィーにかけることにより、UPP 合成酵素を発現している大腸菌コロニー

Fig. 2. Seven conserved regions of *E*-prenyl chain elongating enzymes.

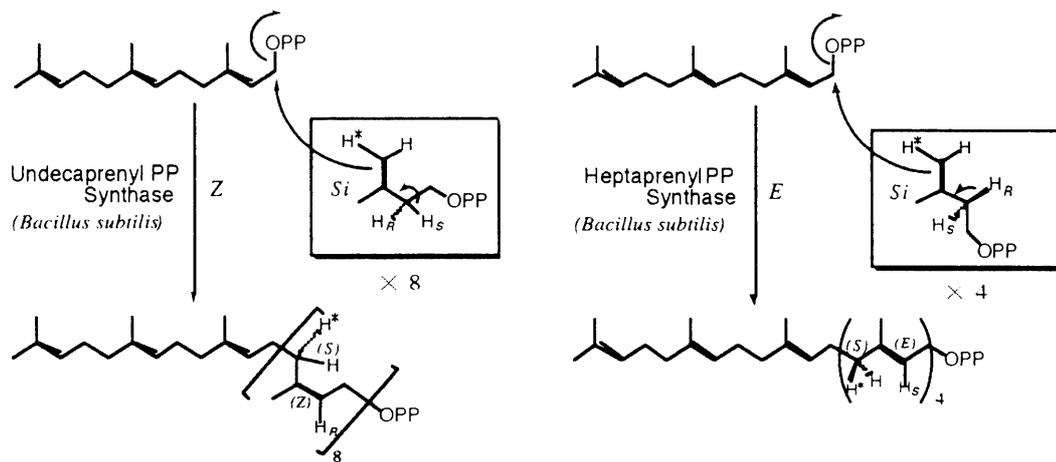


Fig. 3. Absolute stereochemistry of (*E*)-medium- (right) and (*Z*)-long-chain (left) prenyl diphosphate synthase reactions.

が選別されたのである。この方法は本質的には Raetz が 1978 年に大腸菌の膜脂質生成に関与する一連の酵素の変異体の検出のために開発した「コロニーオートラジオグラフィ法」¹⁵⁾ と同一であることが判明したが、使用する放射性標識基質が大腸菌細胞内に取り込まれれば他の酵素の遺伝子クローニングにも応用可能な方法と思われる。IPP が凍結乾燥処理した大腸菌やある種の細菌に対し、ある程度膜透過性であることが西野らによって報告されている。^{16,17)}

Micrococcus luteus B-P 26 のゲノムライブラリーから上記のスクリーニング法で単離したクローンの DNA 塩基配列を決定し、発現系を構築して大腸菌内で過剰生産させたタンパク質を精製し、その酵素活性を確認したところ、まぎれもなく FPP に IPP を 8 分子 *Z* 型に縮合させる UPP 合成酵素であることが分かった。¹⁴⁾ 今まで懸案となっていた *Z* 型プレニル鎖延長酵素の遺伝子クローニングに初めて成功したのである。

驚くべきことに、この *M. luteus* B-P 26 の UPP 合成酵素遺伝子の塩基配列より推定される一次構造 (Fig. 4) には、Fig. 2 に示した *E* 型プレニルニリン酸合成酵素に高度に保存されている領域に相当するアミノ酸配列がほとんど見られないことが分かった。すべてのプレニルトラ

ンスフェラーゼに特徴的で、触媒機能発現に必須と考えられていた 2 組の DDXXD モチーフも相当する位置に存在せず、117 位に 1 つ存在するだけである。¹⁴⁾

タンパク質データベースによって *M. luteus* B-P 26 の UPP 合成酵素と相同性のあるタンパク質を検索した結果、全ゲノム配列が公表されている各種バクテリアや酵母について、機能未知の未同定タンパク質がいくつか検出された。そのうちの 1 つ、大腸菌の遺伝子 *o253* のコードするタンパク質を PCR により増幅し、発現されてくるタンパク質の酵素活性を調べたところ、予想通り UPP 合成酵素としての活性が確認できた。すなわち、大腸菌の未同定遺伝子 *o253* は UPP 合成酵素をコードしていることが示された。¹⁸⁾

酵母のゲノム中にも *M. luteus* B-P 26 の UPP 合成酵素と高い相同性を示す未同定の読み枠が見いだされたが、これは真核生物の糖タンパク質生成に重要な糖キャリアリピド、ドリコールの合成前駆体を合成するデヒドロドリキルニリン酸 (DeDolPP) 合成酵素であると考えられるので、現在その遺伝子の機能立証に向けて努力しているところである。

さて、いまだ *Z* 型プレニル鎖延長酵素として同定できた遺伝子は少ないが、これらの塩基配列に基づいて推

MFPIKKRKAI	KNNNINAAQI	PKHIAIIMDG	NGRWAKQKKM	PRIKGYEGM	50
QTVKKITRYA	SDLGVKYLTL	YAFSTENWSR	PKDEVNYLMK	LPGDFLNTFL	100
PELIKENVKV	ETIGFIDDLP	DHTKKAVLEA	KEKTKHNTGL	TLVFALNYGG	150
RKEIISAVQL	IAERYKSGEI	SLDEISETHF	NEYLFTANMP	DPELLIRTSG	200
EERLSNFLIW	QCSYSEFVFI	DEFWPDFNEE	SLAQCSIIYQ	NRHRRFGGL*	249

Fig. 4. Amino acid sequence of the UPP synthase of *M. luteus* B-P 26.

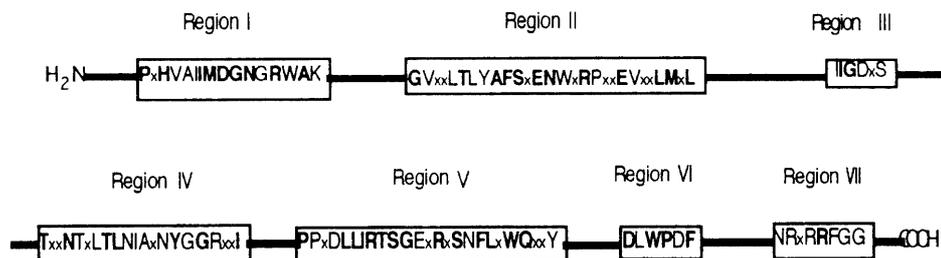


Fig. 5. Possible conserved regions of Z-prenyl chain elongating enzymes.

定される各酵素の一次構造を比較して、Z型プレニル鎖延長酵素に保存されているコンセンサス配列と考えられる領域をピックアップしたものがFig. 5である。Fig. 2に示したE型プレニル鎖延長酵素の保存領域と比較してみると、まったく異なるコンセンサス配列を持っていることがわかる。特にE型プレニル鎖延長酵素にもっとも特徴的で、触媒機能発現に必須の役割をしている2組のDDXXDモチーフに相当するものが見当たらないのが意外である。すなわち、*M. luteus* B-P 26のUPP合成酵素にあるDDXXDはコンセンサス配列として保存されていない。

Edwardsらはアリル性プレニルニリン酸を基質とするプレニル基転移酵素(tRNAやサイトカイニンの生合成関連酵素)やIPPイソメラーゼにおいてもDDXXDモチーフの存在を指摘しており^{19,20}さらに最近続々とクローン化されている各種のテルペン合成酵素²¹)などもDDXXDモチーフは保存されているようである。しかし、Z型プレニル鎖延長酵素はアリル性プレニルニリン酸とIPPを基質とするプレニルトランスフェラーゼであるにもかかわらずDDXXDモチーフは保存されていないようである。

Z型プレニル鎖延長酵素は前述したUPP合成酵素やDeDolPP合成酵素などのように原核生物の細胞壁生合成や真核生物の糖タンパク質生合成に必須な糖キャリアリピドの供給に重要な酵素の他にも、多くの植物に多量に存在しているポリプレノール(ベツラプレノール、フィカプレノールなど)や天然ゴムなどの生合成を直接担っているものであるが、進化的にはE型プレニル鎖延長酵素とはまったく別のルートを辿ってきたと考えられる。

1994年にPoulterとSacchettiniら²²)によりヒナドリのFPP合成酵素の結晶構造が解明され、サブユニットあたり10個の α ヘリックスが3方向にほぼ平行に並んだ特徴的構造を持つことが示されたが、この三次構造はスクアレニシクラーゼ²³)やペンタレン合成酵素^{24,25})にも

共通の立体構造であることが示され、SacchettiniとPoulterは“isoprenoid synthase fold”という名称を提案している。²⁶)Z型鎖延長酵素の場合もこれらと同様の三次構造を持っているのだろうか? E型とZ型のプレニル鎖を合成する機構の違いは何なのだろうか? Z型プレニル鎖延長酵素の三次構造の解明が待たれるところである。

文 献

- 1) Koyama, T. and Ogura, K.: *Comprehensive Natural Products Chemistry Vol. 2: Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids* (Barton, D. H. R. and Nakanishi, K. eds.), Pergamon, Oxford (1998). in press.
- 2) Ogura, K. and Koyama, T.: *Chem. Rev.*, **98**, 1263-1276 (1998).
- 3) Clarke, C. F., Tanaka, R. D., Svenson, K., Wamsley, M., Fogelman, A. M., and Edwards, P. A.: *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 3138-3146 (1987).
- 4) Koyama, T., Obata, S., Osabe, M., Takeshita, A., Yokoyama, K., Uchida, M., Nishino, T., and Ogura, K.: *J. Biochem.*, **113**, 335-363 (1993).
- 5) Shimizu, N., Koyama, T., and Ogura, K.: *J. Bacteriol.*, **180**, 1578-1581 (1998).
- 6) Koike-Takeshita, A., Koyama, T., Obata, S., and Ogura, K.: *J. Biol. Chem.*, **270**, 18396-18400 (1995).
- 7) Zhang, Y.-W., Koyama, T., and Ogura, K.: *J. Bacteriol.*, **179**, 1417-1419 (1997).
- 8) Takahashi, S., Koyama, T., and Nishino, T.: in preparation.
- 9) Joly, A. and Edwards, P. A.: *J. Biol. Chem.*, **268**, 26983-26989 (1993).
- 10) Song, L. and Poulter, C. D.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **91**, 3044-3048 (1994).
- 11) Koyama, T., Tajima, M., Sano, H., Doi, T., Koike-Takeshita, A., Obata, S., Nishino, T., and Ogura, K.: *Biochemistry*, **35**, 9533-9538 (1996).
- 12) Ito, M., Kobayashi, M., Koyama, T., and Ogura, K.: *Biochemistry*, **26**, 4745-4750 (1987).
- 13) Kobayashi, M., Ito, M., Koyama, T., and Ogura, K.: *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 4588-4589 (1985).
- 14) Shimizu, N., Koyama, T., and Ogura, K.: *J. Biol.*

- Chem.*, **273**, 19476-19481 (1998).
- 15) Raetz, C. R. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, **22**, 2274-2278 (1975).
- 16) Takatsuji, H., Nishino, T., Miki, I., and Katsuki, H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **110**, 187-193 (1983).
- 17) Fujisaki, S., Nishino, T., Izui, K., and Katsuki, H.: *Biochem. International*, **8**, 779-785 (1984).
- 18) Shimizu, N., Koyama, T., and Ogura, K.: in preparation.
- 19) Ashby, M. N., Spear, D. H., and Edwards, P. A.: *Molecular Biology of Atherosclerosis: 20th Steenbock Symposium*, (Attie, A. D. ed.) p. 27-34, Elsevier, Amsterdam (1990).
- 20) Ashby, M. N., Kutsunai, S. Y., Ackerman, S., Tzagoloff, A., and Edwards, P. A.: *J. Biol. Chem.*, **267**, 4128-4136 (1992).
- 21) Steele, C. L., Crock, J., Bohlmann, J., and Croteau, R.: *J. Biol. Chem.*, **273**, 2078-2089 (1998).
- 22) Tarshis, L. C., Yan, M., Poulter, C. D., and Sacchettini, J. C.: *Biochemistry*, **33**, 10871-10879 (1994).
- 23) Wendt, K. U., Poralla, K., and Schulz, G. E.: *Science*, **277**, 1811-1815 (1997).
- 24) Starks, C. M., Back, K., Chappell, J., and Noel, J. P.: *Science*, **277**, 1815-1820 (1997).
- 25) Lesburg, C. A., Zhai, G., Cane, D. E., and Christianson, D. W.: *Science*, **277**, 1820-1824 (1997).
- 26) Sacchettini, J. C. and Poulter, C. D.: *Science*, **277**, 1788-1789 (1997).

新酵素オピン脱水素酵素の発見とその有機合成への応用

浅野 泰久*・加藤 康夫

著者らは、有機合成化学のプロセスに微生物や酵素反応を組み込むために、さまざまな新規微生物酵素を開発している。すなわち、種々の手法を総合的に駆使することにより、温和な条件下で高選択的な反応を触媒する酵素反応を化学合成法と組み合わせ、よりすぐれた化学物質の生産法を確立することを目指している。¹⁾

オピンは、植物の腫瘍の一つであるクラウンゴールや海洋産の軟体動物の筋肉中に見いだされ、それらの構造は、二級アミンジカルボン酸、マンニチルオピン、およびリン酸化された糖の三種類に大別することができる。^{2,3)} 二級アミンジカルボン酸 1 の構造を有する化合物はもっともよく研究されており、エナラプリルやリジノプリルを代表とする、血圧降下剤としてのACE阻害剤の合成中間体としてその有用性が重視されている。我々は、NAD⁺やNADP⁺を補酵素とし、オピン型の二級アミンジカルボン酸に作用する新規脱水素酵素を発見することができれば、その反応の可逆性を利用して、L-アミノ酸 2 と α -ケト酸 3 からそれらの化合物を合成することが可能であると考えた (Fig. 1).

本稿では新規二級アミンジカルボン酸脱水素酵素であるオピン脱水素酵素の、土壌分離細菌である *Arthrobacter*

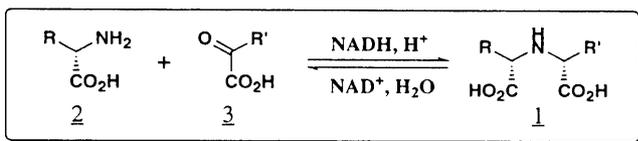


Fig. 1. Enzymatic synthesis of opine-type secondary amine dicarboxylic acids.

sp. 1C 株中における発見、精製および酵素学的諸性質の検討、本酵素遺伝子のクローニングおよび大量発現系の構築、X-線結晶構造解析による本酵素の高次構造解明、そしてNADH再生系のもと、L-アミノ酸および α -ケト酸からの各種のオピン類の高選択的合成について記述する。

1. 新規オピン脱水素酵素のスクリーニング、精製および諸性質^{4,5)}

まず、化学合成したさまざまな二級アミンジカルボン酸を含む培地を用いて、集積培養法¹⁾によりスクリーニングを行った。N-[1-DL-(carboxyl)ethyl]-L-phenylalanine

Table 1. Properties of opine dehydrogenase.

Molecular weight (native)	70,000
(subunit)	36,000 (SDS-PAGE)
	37,935 (gene sequencing)
Optimum pH (reduction)	8.0
(oxidation)	10.0
Optimum temperature	55°C
Inhibitors	Ag ⁺ , Hg ²⁺ , Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Cd ²⁺ , NEM ^a , DTNB ^b
<i>K_m</i> values for	
NAD ⁺	0.76 mM
NADH	0.029 mM
CEP ^c	14 mM
L-norvaline	2.2 mM
pyruvate	3.0 mM

^a N-ethylmaleimide, ^b dithiobis(2-nitrobenzoic acid), ^c N-[1-D-(carboxyl)ethyl]-L-phenylalanine.

*著者紹介 (代表) 富山県立大学工学部 生物工学研究センター (教授)

〒939-0398 富山県射水郡小杉町黒河5180 TEL. 0766-56-7500 ext. 530 FAX. 0766-56-2498

E-mail: asano@pu-toyama.ac.jp http://www.pu-toyama.ac.jp/BR/asano/