

2-7 環境持続型産業に有用な糖質環化酵素 20 kDa サブユニットの機能解明

- 代表者 為我井秀行 (化学 准教授)
- 分担者 飯野熙彦 (総合文化 教授)
- 澤田博司 (総合文化 教授)

【研究の目的および概要】

2-デオキシ-*scyllo*-イノソース (DOI) 合成酵素は2-デオキシストレプタミン (DOS) 含有アミノグリコシド抗生物質生合成の必須酵素であり、グルコース6-リン酸を一段階で炭素六員環化合物であるDOIに変換する。DOIは簡単な化学反応で容易に芳香化するため、本酵素は糖質というバイオマスから芳香族化合物という化学工業的に有用な原料を生産するための有用酵素として期待されている。

DOS含有型アミノグリコシドの1つであるブチロシンの生産菌*Bacillus circulans*における研究の結果、本酵素は40 kDaサブユニット (BtrC) と20 kDaサブユニット (BtrC2) からなるヘテロダイマーであり、BtrCが触媒サブユニットであることが明らかとなっている。一方非触媒サブユニットであるBtrC2は、*B. circulans*において抗生物質生合成酵素のサブユニットとしてだけでなく、生育に関わる一次代謝にも関与していることが示唆されている。BtrC2のアミノ酸配列は枯草菌Pdx2 (ビタミンB₆生合成に関与) と有意な相同性を示す。しかしながらビタミンB₆の一種であるピリドキシンを投与してもその生育はほとんど回復しない。このようにBtrC2の生理的役割に関しては未だに不明な点が多い。

そこで本研究ではDOI合成酵素20 kDaサブユニットの生理的役割を明らかにすることを目的とした。抗体を用い、ウエスタン法によってBtrCおよびBtrC2の発現時期に関して研究を行う。BtrCは抗生物質生合成に特異的なタンパク質なので定常期頃での発現が予想されるが、BtrC2が一次代謝にも関与するならば対数増殖期にも発現が見られるはずである。一方*btrC2*欠損株を用いて、生育およびブチロシン生産能を相補する化合物を同定する。また*btrC2*欠損株、および相同遺伝子を相補した株における生育状況、BtrCの挙動を調べることにより、BtrC2がどのような代謝系に関与するのか、またブチロシン生産にどのような影響を持つのかが明らかになるとと思われる。

【研究の結果】

これまでの研究により、*B. circulans btrC2*破壊株は野生株に比べて生育が遅くなり、また抗菌活性も失うことが明らかとなっている。この*btrC2*破壊株に対し、ピリドキサルを投与することによって生育を回復させることができた。一方これまでの研究結果と同様、ピリドキシンの投与では効果がほとんど見られなかった。また*btrC2*破壊株に対して*btrC2*を相補した株でも同様に生育の回復が見られた。

*B. circulans*野生株と、共同研究者によってすでに作製されている抗BtrC抗体、および昨年度の自然科学研究所共同研究において作製した抗BtrC2抗体を用いたウエスタン解析の結果、BtrCは対数増殖期後期から発現が見られたのに対し、BtrC2は培養時期によらず構成的に発現していた。また*btrC2*破壊株を用いたウエスタン解析の結果、BtrCはやはり対数増殖期後期に発現してくるが、長時間の培養中にその量が大きく減少した。これはピリドキサルによって生育が回復した場合も同様であった。*btrC2*破壊株に対して*btrC2*を相補した株を用いた場合のみBtrCの減少を押し返すことができた。

野生株は50時間の培養で抗菌活性を示した。一方*btrC2*破壊株は抗菌活性を示さないが、ピリドキサルを投与した場合、もしくは*btrC2*を相補した場合には抗菌活性が回復した。しかし50時間培養した後に菌体を集菌し、新しい培地に懸濁して再度25時間培養した場合、野生株および*btrC2*破壊株に*btrC2*を相補した株では再び抗菌活性が見られるが、*btrC2*破壊株ではピリドキサルを添加してももはや抗菌活性は見られなかった。

【研究の考察・反省】

*btrC2*破壊株に対してピリドキサールを投与することによって生育が回復することから、BtrC2は一次代謝において枯草菌Pdx2と同様にピリドキサール生合成に関与していることが示唆された。*btrC2*破壊株に対するピリドキシンの効果がピリドキサールに比べて大きくないことに関しては、化合物の菌体内への取り込み能力の違いに起因するものと思われる。このことは枯草菌ビタミンB6合成欠損株における知見と同様である。

ウェスタン解析の結果から*btrC2*破壊株においてもBtrCは発現していた。また*btrC2*破壊株にピリドキサールを投与した場合に抗菌活性が回復した。これらの結果からBtrCは*in vivo*において単独でもDOI合成酵素として機能すること、*btrC2*破壊株が最初の50時間培養において抗菌活性を示さないのは、プチロシン生合成に関与するアミノ基転移酵素の補因子であるピリドキサールの欠乏によるためであることが示された。*btrC2*破壊株が50時間後にピリドキサールを添加しても抗菌活性を示さなくなるのはBtrC量の減少に起因すると考えられる。これまでの研究から、BtrCは*in vitro*において単独でも活性を持つが、BtrC2と複合体を形成しているときに比べてタンパク質としての安定性が大きく損なわれていることが示されていた。本研究の結果から、*in vivo*でも同様のことが言えることが示された。

以上の結果から、BtrC2は一次代謝においては枯草菌Pdx2と同様にピリドキサール生合成に関与し、二次代謝においてはDOI合成酵素を安定化することによってプチロシン生合成能の長期安定化に寄与していると考えられる。

【研究発表】

本研究の内容は下記の通り学会発表、および原著論文として公開した。

学会発表

アミノグリコシド抗生物質生合成に関与する糖質環化酵素20 kDaサブユニットの生理的意義
為我井秀行, 澤田博司, 南後恵理子, 青木里恵, 平川暖果, 飯野熙彦, 江口 正
日本農芸化学会2010年度大会 平成22年3月 東京

論文

Roles of 20 kDa Protein Associated with Carbocycle-Forming Enzyme Involved in Aminoglycoside Biosynthesis in Primary and Secondary metabolisms

Tamegai, H., Sawada, H., Nango, E., Aoki, R., Hirakawa, H., Iino, T and Eguchi, T. (2010)

Biosci. Biotechnol. Biochem. in press