

「翻訳後修飾によるトリプトファン残基のイソプレニル化」

岡田 正弘*

Post-translational Isoprenylation of a Tryptophan Residue

Masahiro OKADA*

1. はじめに

生物は生き延びるために様々な環境の変化に対する適応行動をとっており、その中の一つに集団の数、密度がある。例えば、我々ヒトは満員電車や過密状態のエレベーターなどでは、できるだけ他者との関わりを閉ざすように振る舞うようになる。これをエレベーター効果と呼んでいる。また、サバクトビバッタでは個体群密度の上昇に伴い、体色や飛翔距離などのそもそもの能力が異なる個体が成長する、相変異と呼ばれる現象が引き起こされる。一方で、増殖の速い細菌にとっては、集団の数、密度は特に重要な環境要因であり、クオラムセンシングと呼ばれる微生物特有の集団密度依存的な遺伝子発現機構が存在する。このクオラムセンシングにより、様々な現象が引き起こされる。最もわかりやすい現象が生物発光で、有名な例としてはダンゴイカの発光があり、これはダンゴイカの足などにある発光器官に高密度状態で発光性細菌が共生することで引き起こされる。その他にも、感染症や歯垢、水処理膜の目詰まりなどの原因であり、粘性の高い高分子などを分泌することで物理的、化学的耐性を向上させるバイオフィルムの形成や、抗生物質や毒素の生産、胞子形成や形質転換などがある。細菌の振る舞いは集団の密度に依存していると言っても過言ではないぐらい、細菌に特徴的な実に多くの現象がクオラムセンシングによって制御されている。その密度感知方法は単純明快であり、クオラムセンシングフェロモンと呼ばれる化学物質を常時分泌することである。つまり、細胞密度が低い場合は分泌された環境中のフェロモンも少ないので何も起こらないが、細胞密度の上昇に伴いフェロモン濃度も上昇し、閾値を超えると受容体が感知して、シグナルが伝達された結果、特定の遺伝子が発現し、先に述べたような様々な現象が誘導される。すなわち、細菌は集団の細胞密度をフェロモンの濃度に置き換えて感知しているのである(図1)。一般的に細菌は、それぞれ種ごとあるいはグループごとに異なったフェロモンを分泌し、分泌されたフェロモンは特異的に作用する。また、複数のフェロモンを分泌する細菌もいる。従って、細菌はクオラムセンシングフェロモンというケミカルシグナルを用いてお互いにコミュニケーションを取っており、言い換えれば、クオラムセンシングフェロモンという様々な言語を用

いて会話しているのである。また、近年の研究によれば、病原性細菌のクオラムセンシングフェロモンに応答して宿主が免疫応答を行う例も報告されている。いわば、他の生物も細菌の会話を盗み聞きして適応行動をとっているのである。

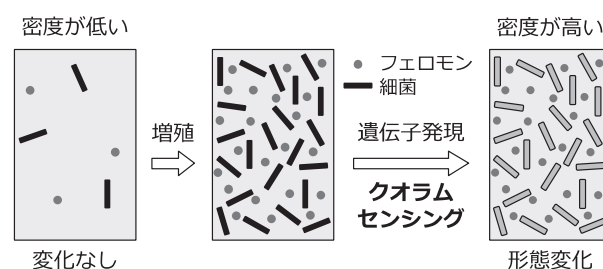


図1. クオラムセンシングの概略

2. 枯草菌由来のクオラムセンシングフェロモン、ComX フェロモン

グラム陽性細菌の枯草菌は、胞子の形成、抗生物質の生産、DNA形質転換を行うといった特徴を有しているが、これらは全て細胞密度依存的に引き起こされる。すなわち、クオラムセンシングにより制御されていることが明らかとなっている。枯草菌はモデル生物として、特に168株はその標準株として、かなり早い時期からゲノム解析や分子遺伝学的研究が進められきた。クオラムセンシングにおけるシグナル伝達機構についても詳細な遺伝学的解析が行われた結果、主にDNA形質転換に関与する*comQXPA*₁₆₈遺伝子クラスターの役割が明らかとなっている(図2)。それによると、まず、55アミノ酸残基からなる前駆体ペプチドComX₁₆₈が生合成された後、翻訳後修飾酵素ComQ₁₆₈によってC末端付近のトリプトファン残基が残基が翻訳後修飾を受け、さらにそのトリプトファン残基を含むC末端側のアミノ酸残基が切り出されてオリゴペプチドであるComX₁₆₈フェロモンとなり細胞外に放出される。常時分泌されているComX₁₆₈フェロモンの濃度が細胞密度に依存して上昇し、その濃度がある一定の閾値に達すると、受容体である膜貫通型ヒスチジンキナーゼComP₁₆₈に結合し、ComP₁₆₈のヒスチジン残基の自己リン酸化を誘導する。続いてレスポンスレギュレーターであるComA₁₆₈にリ

*教授 物質生命化学科

Professor, Department of Material and Life Chemistry,

ン酸基を受け渡し、いわゆる二成分制御系と呼ばれるシグナル伝達機構を介して形質転換関連遺伝子の転写を活性化することで最終的に形質転換を誘導する。

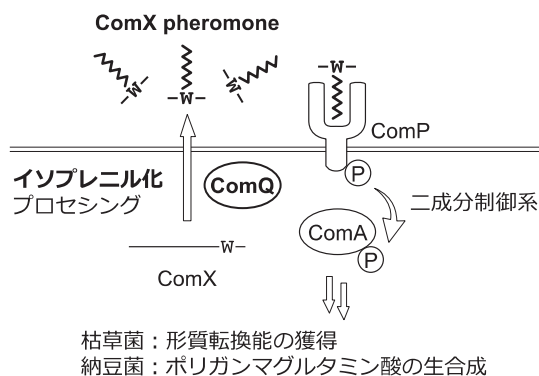


図 2. ComX フェロモンのシグナル伝達経路の概要

一方で、アミノ酸配列解析の結果や、修飾酵素 ComQ がイソプレニルリリン酸合成酵素と相同性があったことから、ComX フェロモンの修飾様式はトリプトファン残基のイソプレニル化ではないかと考えられていた。なお、イソプレニル化とはイソプレニル基の付加のことであり、イソプレニル基とは炭素数 5 単位からなる炭化水素基の総称のことで、ジメチルアリル基 (C5)、ゲラニル基 (C10)、ファルネシル基 (C15)、ゲラニルゲラニル基 (C20) などが知られている。しかしながら、ComX フェロモンは化学的に不安定であり、また、分泌量も少なかったために修飾構造は決定されていなかった。そこで、我々は ComX フェロモンの化学構造の解明研究を行い、RO-E-2 株由来の ComX_{RO-E-2} フェロモンが翻訳後修飾によりゲラニル化され、さらにプロリン様の 5 員環が形成された修飾トリプトファン残基を有するヘキサペプチドであることを明らかにした (図 3)¹⁾。

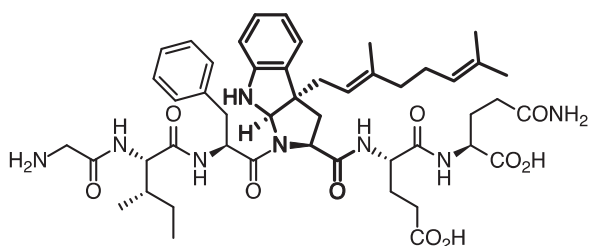


図 3. ComX_{RO-E-2} フェロモンの化学構造

続いて行った構造活性相関研究の結果、ComX_{RO-E-2} フェロモンの修飾トリプトファン残基以外のアミノ酸残基は DNA 形質転換誘導活性にはそれほど重要ではなく、アラニンへの置換や削除を行ってもそれほどフェロモン活性には影響がないのに対して、修飾トリプトファン残基はその立体化学を含めた環状構造や、ゲラニル側鎖を含めた全ての化学構造が DNA 形質転換誘導活性に重要な役割を果たしていることが明らかとなった^{2,3)}。さらに、枯草菌 6 菌株および近縁種の納豆菌の ComX フェロモンの構造を明らかにしたところ、

ComX フェロモンは菌株によってそのアミノ酸配列が大きく異なった、アミノ酸 6~10 残基からなるオリゴペプチドであり、唯一共通に存在するトリプトファン残基が翻訳後修飾により環化を伴うイソプレニル化 (ゲラニル化またはファルネシル化) を受けていることが明らかとなった (図 4)⁴⁻⁹⁾。

Bacillus strain	Amino acid sequence	Chemical structure of W*	Modification
168	ADPITRQW*ED		n = 3 farnesylation
RO-C-2	TREW*DG		
natto	KW*PPIE		n = 2 geranylation
RO-E-2	GIFW*EQ		
RO-H-1	MLDW*KY		
RS-B-1	MMDW*HY		
RO-B-2	YTNGW*VPS		

図 4. 各菌株由来の ComX フェロモンのアミノ酸配列と化学構造

3. 翻訳後修飾によるイソプレニル化

翻訳後修飾とは、主にタンパク質やペプチドが翻訳により生成した後に起こる化学修飾のことを言い、タンパク質やペプチドの 20 種類に限定されたアミノ酸残基に構造的な多様性を与えるだけでなく、多くのタンパク質は翻訳後修飾を受けて初めて生理的な機能を有する成熟型となることから、タンパク質の機能発現の動的制御機構でもある。これまでに、様々なアミノ酸上において様々な修飾様式が発見されており、その中の一つとしてシステイン残基のイソプレニル化が知られていた。この修飾様式は C 末端のシステイン残基のチオール基がイソプレニル化 (ファルネシル化またはゲラニルゲラニル化) されるというもので、担子菌の交配時の接合管形成を誘導するペプチドフェロモンにおいて初めて発見された。その後、他の生物にも存在することが明らかとなり、イソプレニル修飾を受けるための基質のコンセンサス配列が解明された結果、システイン残基のイソプレニル化は真核生物に普遍的に存在し、タンパク質やペプチドの機能発現に必須な翻訳後修飾であることが判明した。例えば、ヒトのガン遺伝子産物であり、ガンの転移に関与すると考えられている K-Ras タンパク質においてもシステイン残基のイソプレニル化によりその機能が制御されていることが明らかとなったことから、イソプレニル化酵素を標的タンパク質とした抗ガン剤の開発が進められるなど、システイン残基のイソプレニル化に関する研究は現在も精力的に進められている。

一方で、原核生物においてはシステイン残基も含めた全てのアミノ酸残基において翻訳後修飾によるイソプレニル化は確認されていなかったため、枯草菌のクオラムセンシングフェロモンに見られるトリプトファン残基のイソプレニル化 (ゲラニル化またはファルネシル化) は、トリプトファン残基の新規翻訳後修飾様式であるというだけでなく、原核生物における初の翻訳後修飾によるイソプレニル化の発見ということになった。なお、シアノバクテリアの環状ペプチドであるカワグチペプチン A から翻訳後修飾によるトリプトファン残基のイソプレニル化 (ジメチルアリル化) が発見されてい

るが、ComX フェロモンとは立体構造が異なっており、その役割も不明である (図 5)^{10, 11)}。また、カワグチペプチン A のイソプレニル化酵素である KgpF についても ComQ とはほとんど相同性がないため、それぞれ独立して進化してきたのではないかと考えられる。

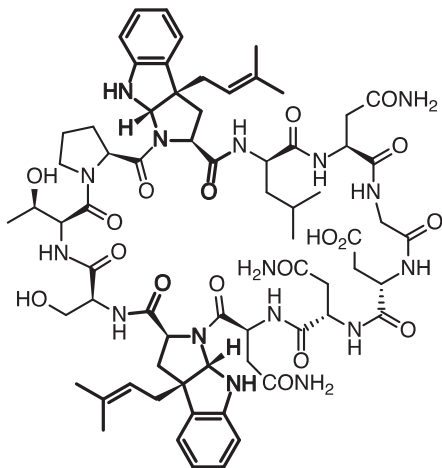


図 5. カワグチペプチン A の化学構造

4. おわりに

修飾ペプチドの生合成においては、翻訳後修飾酵素が基質の特定のコンセンサス配列を認識して修飾した後に、その配列が切り出されて生合成される場合が多いが、興味深いことに、RO-E-2 株由来の修飾酵素 ComQ_{RO-E-2} は菌株ごとに大きく異なる C 末端側のアミノ酸配列のみを有するペプチドも基質として認識してゲラニル化を触媒する酵素として十分に機能したため、ComQ は基質に特定のコンセンサス配列を必要としないと考えられる^{12, 13)}。さらに、納豆菌の場合は、基質ペプチドにおける被修飾トリプトファン残基の位置も C 末端付近には限定されていなく^{8, 9)}。今後、詳細な ComQ の反応機構の解明を行うことで、ComQ もしくはその変異体を用いた化学合成では困難な立体選択的環化を伴うイソプレニル化もしくは類似反応を、様々なトリプトファン残基あるいはトリプトファン様物質に対して達成できる可能性があり、生合成リデザインによる修飾酵素を用いたペプチドライブラリーの構築や、新規有用物質の創成研究にも興味が持たれるところである。

一方、今のところ、翻訳後修飾によるトリプトファン残基のイソプレニル化は、基質の特徴的なコンセンサス配列も見られず、また、進化的関連性の低いカワグチペプチン A を除けば、近縁種の納豆菌を含めた枯草菌の ComX フェロモンにおいて確認されているのみである。しかしながら、類似の翻訳後修飾であるシステイン残基のイソプレニル化が、担子菌のペプチドフェロモンにおいて初めて発見された後に、普遍的翻訳後修飾であることが判明したように、翻訳後修飾によるトリプトファン残基のイソプレニル化も他の細菌などの生物に存在する可能性が考えられる。もしかしたら、細菌のケミカルシグナルを介したコミュニケーションに、翻訳後修飾によるトリプトファン残基のイソプレニル化が重要な役割を担っているのかもしれない。

5. 参考文献

- [1] 1) Okada, M.; Sato, I.; Cho, S. J.; Iwata, H.; Nishio, T.; Dubnau, D.; Sakagami, Y. Structure of the *Bacillus subtilis* quorum-sensing peptide pheromone ComX. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 23–24.
- 2) Tsuji, F.; K. Kobayashi, K.; Okada, M.; Yamaguchi, H.; Ojika, M.; Y. Sakagami, The geranyl-modified tryptophan residue is crucial for ComX_{RO-E-2} pheromone biological activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4041–4044.
- 3) Okada, M.; Yamaguchi, H.; Sato, I.; Cho, S. J.; Dubnau, D.; Sakagami, Y. Structure–activity relationship studies on quorum sensing ComX_{RO-E-2} pheromone. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1705–1707.
- 4) Okada, M.; Yamaguchi, H.; Sato, I.; Tsuji, F.; Dubnau, D.; Sakagami, Y. Chemical structure of posttranslational modification with a farnesyl group on tryptophan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2008**, *72*, 914–918.
- 5) Okada, M.; Yamaguchi, H.; Sato, I.; Tsuji, F.; Qi, J.; Dubnau, D.; Sakagami, Y. Acid labile ComX pheromone from *Bacillus mojavensis* RO-H-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2007**, *71*, 1807–1810.
- 6) Okada, M.; Sugita, T.; Abe, I. Posttranslational isoprenylation of tryptophan in bacteria. *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, *13*, 338–346.
- 7) Okada, M. Post-translational isoprenylation of tryptophan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2011**, *75*, 1413–1417.
- 8) Hayashi, S.; Usami, S.; Nakamura, Y.; Ozaki, K.; Okada, M. Identification of a quorum sensing pheromone posttranslationally farnesylated at the internal tryptophan residue from *Bacillus subtilis* subsp. *natto*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2015**, *79*, 1567–1569.
- 9) Okada, M.; Nakamura, Y.; Hayashi, S.; Ozaki, K.; Usami, S. Chemical structure and biological activity of a quorum sensing pheromone from *Bacillus subtilis* subsp. *natto*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 4293–4296.
- 10) Okada, M.; Sugita, T.; Akita, K.; Tian, T.; Li, C.; Mori, T.; Abe, I. Stereospecific prenylation of tryptophan by a cyanobacterial post-translational modification enzyme. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 9639–9644.
- 11) Parajuli, A.; Kwak, D. H.; Dalponte, L.; Leikoski, N.; Galica, T.; Umeobika, U.; Trembleau, L.; Bent, A.; Sivonen, K.; Wahlsten, M.; Wang, H.; Rizzi, E.; De Bellis, G.; Naismith, J.; Jaspars, M.; Liu, X.; Houssen, W.; Fewer, D. P. A unique tryptophan C-prenyltransferase from the kawaguchi-peptin biosynthetic pathway. *Angew. Chem Int. Ed.* **2016**, *55*, 3596–3599.
- 12) Tsuji, F.; Ishihara, A.; Nakagawa, A.; Okada, M.; Kitamura, S.; Kanamaru, K.; Masuda, Y.; Murakami, K.; Irie, K.; Sakagami, Y. Lack of the consensus sequence necessary for tryptophan prenylation in the ComX pheromone precursor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2012**, *76*, 1492–1496.
- 13) Tsuji, F.; Ishihara, A.; Kurata, A.; Nakagawa, A.; Okada, M.; Kitamura, S.; Kanamaru, K.; Masuda, Y.; Murakami, K.; Irie, K.; Sakagami, Y. Geranyl modification on the tryptophan residue of ComX_{RO-E-2} pheromone by a cell-free system. *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 174–179.