

学位論文題名

Studies on the synthetases and transport systems of
nonribosomal peptides, arthrofactin and pyoverdine,
in *Pseudomonas* sp. MIS38

(シュードモナス属細菌 MIS38における非リボソームペプチド,
アルスロファクチンとピオヴェルディン,
合成酵素および輸送システムに関する研究)

学位論文内容の要旨

近年、微生物がさまざまな生理活性や界面活性を有するペプチドを生産することが知られている。これらのペプチドには通常のタンパク質には存在しないD-型アミノ酸、オルニチン、ジアミノ酪酸やさまざまな修飾アミノ酸を構成分子とするものが多く見られる。さらにはリボペプチドなどの複合ペプチドや環状ペプチドなどその構造の多様性は極めて広い。これらは微生物固有のリボソームを介しない、いわゆる非リボソームペプチド合成酵素により合成される。非リボソームペプチド合成酵素は基質アミノ酸を合成酵素に固定するチオレーションドメイン (T)、アミノアシル化反応により基質アミノ酸を活性化するアデニレーションドメイン (A)、および2つのアミノ酸基質あるいはペプチドとアミノ酸を連結する縮合ドメイン (C) から基本的に構成される。またこれら以外にアミノ酸の異性化を触媒するエピメラーゼドメイン (E) やペプチド産物を合成酵素から切り出す機能をもつチオエステラーゼドメイン (TE) などが含まれる。すなわち、一つの構成アミノ酸ごとに一組の C/A/T (これを基本モジュールと呼ぶ) が配置されたマルチモジュール酵素である。非リボソームペプチド合成酵素は生命進化の視点から興味深いが、このモジュールを入れ替えることによって新しいペプチドを設計できることが1995年に報告されて以来、次世代の生理活性ペプチド合成法としても注目されている。

本研究で対象とするシュードモナス属細菌MIS38は高活性型リボペプチド型バイオサーファクタントであるアルスロファクチンを合成することが知られている。アルスロファクチンはユニークな双頭 C/E-ドメインを有する非リボソ-

ムペプチド合成酵素 (ArfABC) によって合成されることが既に報告されている。そこで MIS38 における非リボソーム型ペプチド合成酵素およびその産物ペプチドの輸送システムについてより深く検討する目的で以下の研究を進めた。MIS38 は鉄欠乏培地で培養すると黄緑色の蛍光物質 (ピオヴェルディン; PVD38) を生産したので、その物質を精製し構造解析を行った。その結果、PVD38 は分子量 1064 であり Ala, Glu, Gly, (OHOrn), Ser, Thr を 2: 1: 1: (1): 1: 1 の割合で含む新規化合物であることが判明した。続いてピオヴェルディン合成酵素 (Pvd38-*chr*) をコードする遺伝子 (*pvd38-*chr**) を取得した。ArfABC とは対照的に Pvd38-*chr* は従来型の C-, E-ドメインを有する酵素であった。*pvd38-*chr** のうち E-ドメイン遺伝子を破壊した変異株を作成したところ PVD38 の生産性は完全に失われていたが、アルスロファクチンを正常に生産した。また ArfABC を破壊した変異株でもピオヴェルディンは正常に生産された。これらの結果は MIS38 においてアルスロファクチン合成酵素およびピオヴェルディン合成酵素はいずれも活性を有しており、かつお互いが独立して機能していることを示唆する。

次に産物ペプチドの膜輸送システムについて比較した。まず、ピオヴェルディンの膜輸送に関与することが予想される ABC トランスポーター遺伝子 (*pvd38-*abc**) が *pvd38-pep* の直下流に存在したのでこれを破壊した。破壊株の PVD38 生産性は野生株に比べて 9% 程度まで低下していた。そこで同様に *arfABC* の直下流に存在する ABC トランスポーター遺伝子およびペリプラズムタンパク質遺伝子を同時に破壊した。その結果、驚いたことにアルスロファクチン生産性は培養 6 時間後において野生株の 50% 程度まで低下したが 18 時間後においてはほぼ 100% の生産性を示した。この結果はピオヴェルディンとは異なりアルスロファクチンは複数の輸送系によって細胞外へ運搬されていることを示唆する。アルスロファクチンがその界面活性によって自ら膜透過を行っているのかについてはまだ不明であるが、本研究により非リボソーム型ペプチドの生産システムに関する理解が格段に深まった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 森 川 正 章
副 査 教 授 福 井 学
副 査 准教授 山 崎 健 一
副 査 助 教 鷲 尾 健 司

学 位 論 文 題 名

Studies on the synthetases and transport systems of nonribosomal peptides, arthrofactin and pyoverdine, in *Pseudomonas* sp. MIS38

(シュードモナス属細菌 MIS38における非リボソームペプチド,
アルスロファクチンとピオヴェルディン,
合成酵素および輸送システムに関する研究)

近年、微生物がさまざまな生理活性や界面活性を有するペプチドを生産することが知られている。これらのペプチドには通常のタンパク質には存在しない D-型アミノ酸、オルニチン、ジアミノ酪酸やさまざまな修飾アミノ酸を構成分子とするものが多く見られる。さらにはリボペプチドなどの複合ペプチドや環状ペプチドなどその構造の多様性は極めて広い。これらはリボソームを介しない、微生物固有のいわゆる非リボソームペプチド合成酵素により合成される。非リボソームペプチド合成酵素は基質アミノ酸を合成酵素に固定するチオレーションドメイン (T)、アミノアシル化反応により基質アミノ酸を活性化するアデニレーションドメイン (A)、および2つのアミノ酸基質あるいはペプチドとアミノ酸を連結する縮合ドメイン (C) から基本的に構成される。またこれら以外にアミノ酸の異性化を触媒するエピメラーゼドメイン (E) やペプチド産物を合成酵素から切り出す機能をもつチオエステラーゼドメイン (TE) などが含まれる。すなわち、一つの構成アミノ酸ごとに一組の C/A/T (これを基本モジュールと呼ぶ) が配置されたマルチモジュール酵素である。非リボソームペプチド合成酵素は生命進化の視点から興味深い、このモジュールを入れ替えることによって新しいペプチドを設計できることが 1995 年に報告されて以来、環境負荷が小さい次世代の生理活性ペプチド合成法としても注目されている。

本研究で対象とするシュードモナス属細菌 MIS38 は静岡県の油田より単離され、高活性型リボペプチド型バイオサーファクタントであるアルスロファクチンを合成する。アルスロファクチンはユニークな双頭 C/E-ドメインを有する

非リボソームペプチド合成酵素 (ArfABC) によって合成されることが既に報告されている。そこで MIS38 における非リボソーム型ペプチド合成酵素およびその産物ペプチドの輸送システムについてより深く検討する目的で以下の研究を進めた。MIS38 は鉄欠乏培地で培養すると黄緑色の蛍光物質 (ピオヴェルディン; PVD38) を生産したので、その物質を精製し構造解析を行った。その結果、PVD38 は分子量 1064 であり Ala, Glu, Gly, (OHOrn), Ser, Thr を 2: 1: 1: (1): 1: 1 の割合で含む新規化合物であることが判明した。続いてピオヴェルディン合成酵素 (Pvd38-*chr*) をコードする遺伝子 (*pvd38-*chr**) を取得した。ArfABC とは対照的に Pvd38-*chr* は従来型の C-, E-ドメインを有する酵素であった。*pvd38-*chr** のうち E-ドメイン遺伝子を破壊した変異株を作成したところ PVD38 の生産性は完全に失われていたが、アルスロファクチンを正常に生産した。また ArfABC を破壊した変異株でもピオヴェルディンは正常に生産された。これらの結果は MIS38 においてアルスロファクチン合成酵素およびピオヴェルディン合成酵素はいずれも活性を有しており、かつお互いが独立して機能していることを示唆する。

次に産物ペプチドの膜輸送システムについて比較した。まず、ピオヴェルディンの膜輸送に関与することが予想される ABC トランスポーター遺伝子 (*pvd38-*abc**) が *pvd38-pep* の直下流に存在したのでこれを破壊した。破壊株の PVD38 生産性は野生株に比べて 9% 程度まで低下していた。そこで同様に *arfABC* の直下流に存在する ABC トランスポーター遺伝子およびペリプラズムタンパク質遺伝子を同時に破壊した。その結果、驚いたことにアルスロファクチン生産性は培養 6 時間後において野生株の 50% 程度まで低下したが 18 時間後においてはほぼ 100% の生産性を回復した。この結果はピオヴェルディンとは異なりアルスロファクチンは複数の輸送系によって細胞外へ運搬されていることを示唆する。そこで阻害剤を用いた実験を行ったところアルスロファクチンがその界面活性によって自ら膜透過を行っている可能性は実験的に否定され、複数の ABC トランスポーターがアルスロファクチンの膜輸送に関与していることが強く示唆された。

本研究により油田細菌 MIS38 が有する非リボソーム型ペプチドの生産システムの多様性に関する理解が格段に深まった。本研究成果は従来の化学触媒法にくらべて環境負荷の小さな微生物発酵法による環状リボペプチド生産の基盤構築に寄与するものであった。

審査員一同は、これらの成果を評価するとともに、申請者の研究者としての誠実かつ熱心な研究態度および大学院博士課程における研鑽や単位の修得状況なども合わせて考慮し、申請者が博士 (地球環境科学) の学位を授与される資格を有するものと判定した。