



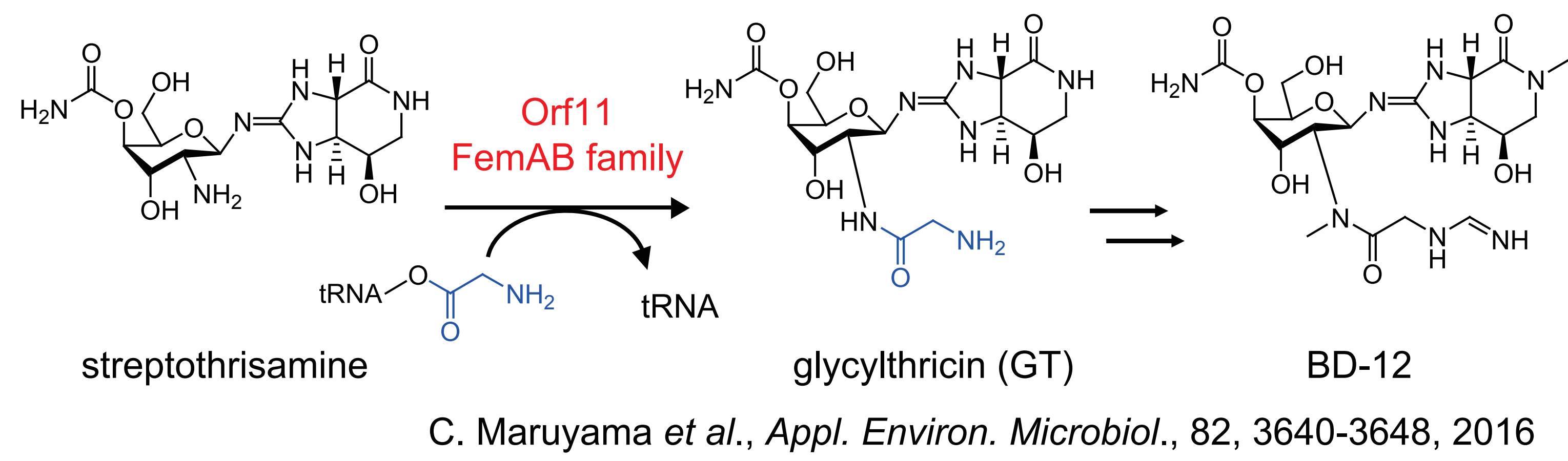
丸山 千登勢
(福井県立大学生物資源学部)

【目的】 近年、一部の微生物が生命活動に必須な一次代謝であるタンパク質翻訳システムからアミノアシル-tRNA^{aa} (aa-tRNA^{aa})をハイジャックし、抗生物質などの二次代謝産物を生合成することが認められた。最近、申請者らにおいても、放線菌がaa-tRNA^{aa}依存的なアミド合成酵素により抗生物質を生合成していることを見出した (*Appl. Environ. Microbiol.*, 82, 3640-3648, 2016)。本酵素Orf11は、Gly-tRNA^{Gly}を基質として利用し、抗生物質glycylthricin (GT)におけるGly側鎖のアミド合成を触媒することを明らかにした (**Panel 1**)。タンパク質翻訳システムにおいては、Gly-tRNA^{Gly}を含め20種のaa-tRNA^{aa}が存在する。従ってOrf11ホモログ酵素の中にGly以外のaa-tRNA^{aa}を基質として認識する同様の酵素が存在すれば、『tRNA依存型ペプチド合成酵素におけるtRNA基質認識機構の解明』のみならず、『応用利用による新規アミノ酸側鎖を有する化合物の創製』が可能である。そこで本研究ではOrf11ホモログ酵素遺伝子を探索、及びtRNA基質認識機構の解明を試みた。

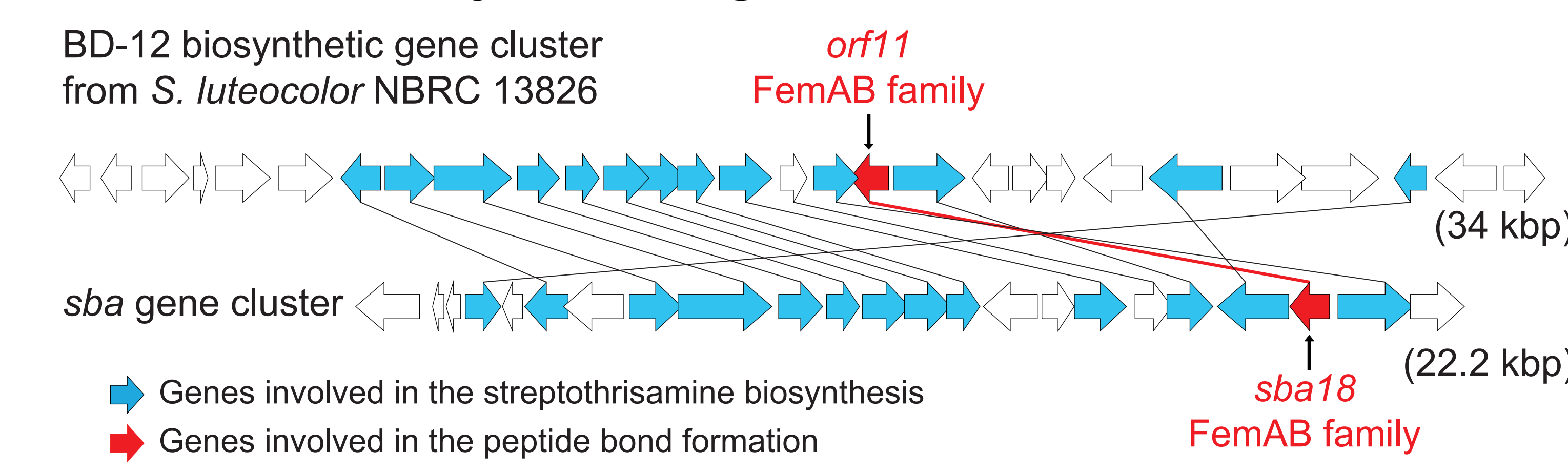
【方法】 放線菌ゲノムデータベースよりOrf11に高い相同性を示し、その近傍にGT類似化合物に共通する骨格の生合成遺伝子群を有する酵素遺伝子を探索した結果、Orf11ホモログ酵素Sba18を新たに見出した (**Panel 2**)。そこでSba18組換え酵素を用い、大腸菌由来のaa-tRNA^{aa}を基質に酵素反応を行ったところ、Sba18がGly-tRNA^{Gly}だけでなくAla-tRNA^{Ala}およびSer-tRNA^{Ser}を基質として新規化合物を生産することが判明した (**Panel 3**)。さらに詳細にSba18のtRNA^{aa}構造に対する基質認識機構を解析するために、tRNA^{Gly}, tRNA^{Ala}, tRNA^{Ser}を*in vitro*合成し、人工RNA触媒Flexizymeを使って非天然型Gly-tRNA^{aa}を調製し、酵素反応を行った (**Panel 4**)。

【結果と考察】 その結果、Sba18は全てのGly-tRNA^{aa}を基質認識し、GTを生合成した。さらに興味深いことに、tRNA^{Gly}のacceptor stem構造のみからなるtRNA mimic基質Microhelix RNAを基質とした場合においても、Sba18はGTを生合成したことから、Sba18のtRNA^{aa}基質認識にはacceptor stem構造が重要であることが判明した。また、aa-tRNA^{aa}におけるアミノアシル基に対する基質特異性を調べるために、microhelix RNAにFlexizymeを使って様々なアミノ酸でアミノアシル化した人工基質を用いて評価したところ、Gly, Ala, Ser以外にも多くの人工基質を認識し、新規GT類似化合物の創製に成功した (**Panel 5**)。従ってOrf11とSba18は高い相同性(75%)を示しながらその基質特異性は大きく異なり、Sba18は広い基質特異性を有するアミド合成酵素であることが判明した。

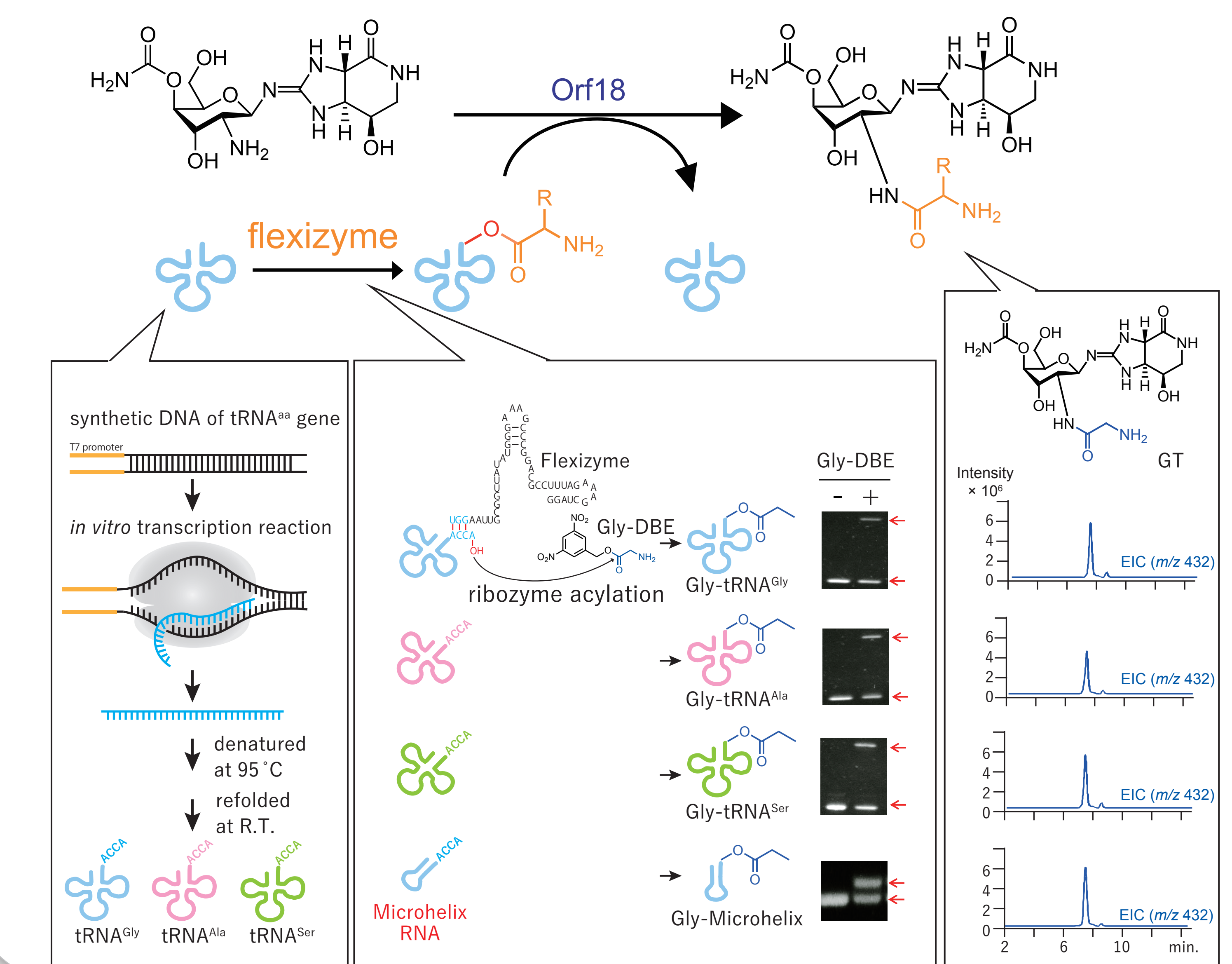
Panel 1. The sba gene cluster homologous to the BD-12 biosynthetic gene cluster



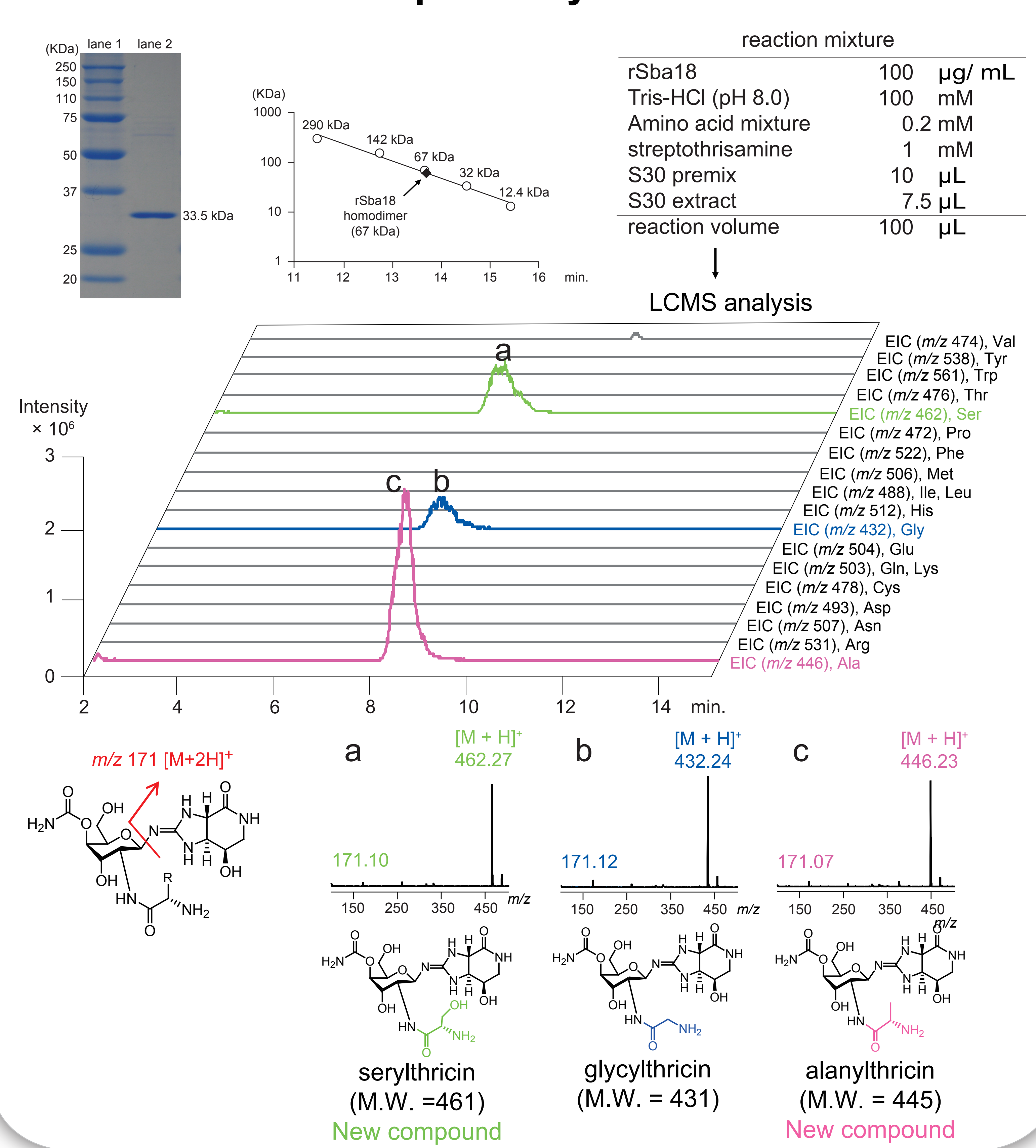
Panel 2. The sba gene cluster homologous to the BD-12 biosynthetic gene cluster



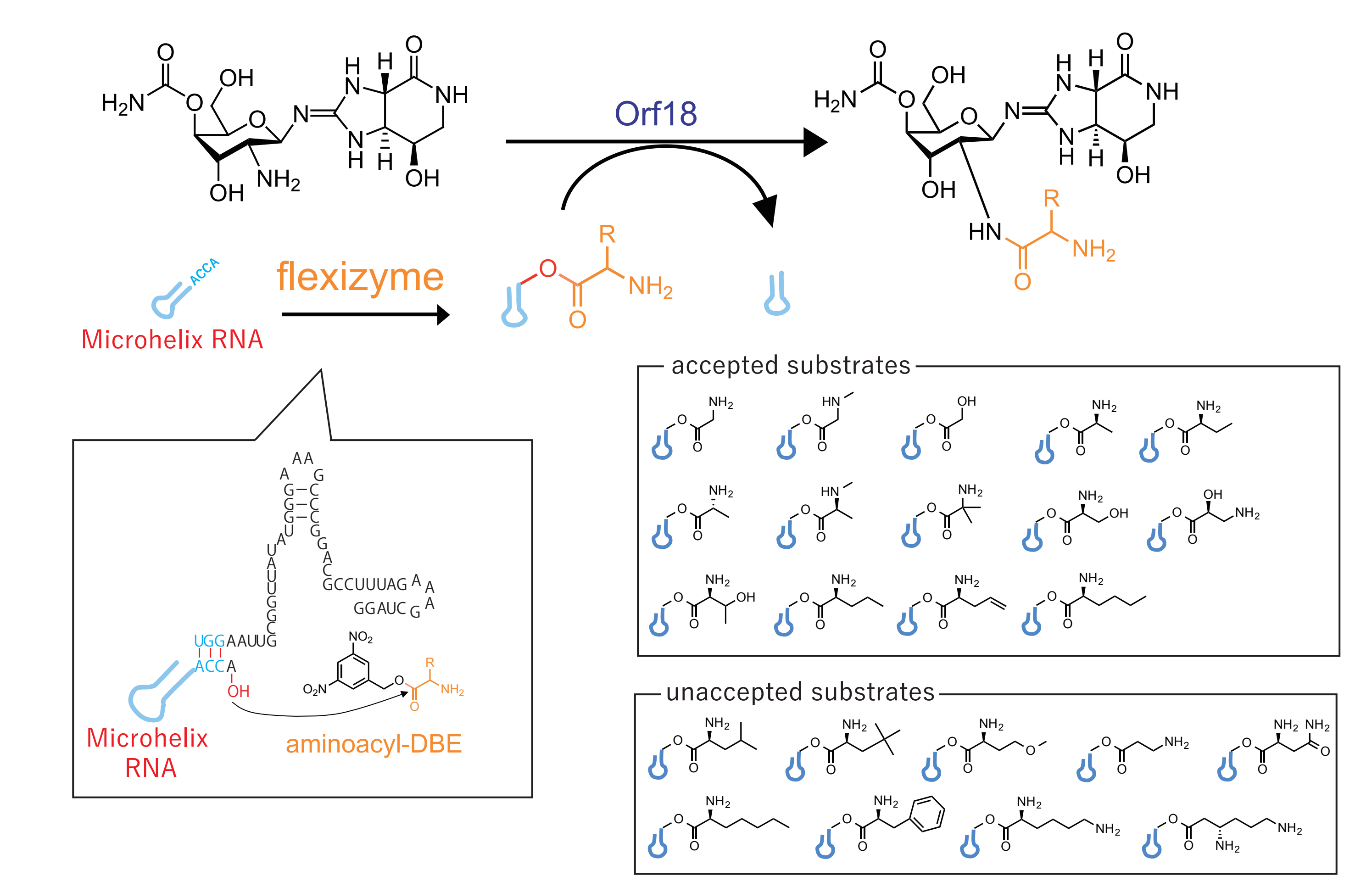
Panel 4. Substrate specificity of tRNA^{aa} molecules in Sba18



Panel 3. Substrate specificity of rSba18



Panel 5. Substrate specificity of aminoacyl-groups on aa-tRNA^{aa} in Sba18



Acknowledgement

本研究は、公益財団法人発酵研究所 (IFO), H30年度 一般研究助成を受けて行われました。

本研究の遂行にあたり、多くのご助言とご協力を賜りました、福井県立大学 濱野 吉十 教授に深謝申し上げます。

また、新規化合物 (alanylthricin, serylthricin) のNMR解析では、北海道大学 大利 徹 教授、小笠原 泰志 助教に、flexizymeを用いた基質調製では、東京大学 菅 裕明 教授、後藤 佑樹 教授をはじめとする菅研究室のみなさまに、放線菌ゲノムデータベースのご提供ではAIST 新家 一男 博士、JBIC 橋本 絢子 研究員に多くのご協力をいただきました。この場をお借りして暑く御礼申し上げます。