C-P 結合生成酵素について——ビアラホスの生合成を中心に†

日高 智美, 瀬戸 治男

(東京大学応用微生物研究所)

はじめに

C-P 化合物はタンパク質 (ホスホノプロテイン), 糖質 (ホスホノグリカン), 脂質 (ホスホノリピド), 低分子の生理活性物質 (ホスホマイシン⁽¹⁾) や, ビアラホス^(2,3) など広範囲にわたって存在することが知られており, それらの生物活性には C-P 結合が重要な役割を果たすことが判明している. しかしながら, この C-P 結合の生成機構については, 種々仮説が提唱されてきたにもかかわらずいづれも実験的な証明はほとんどなされず, 不明のまま残されていた. 著者らは放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* の生産する除草剤であり, ユニークな C-P-C 結合を有するビアラホス^(2,3) (図 1) を対象として, C-P 結合の生成機構の研究に着手し, ビアラホス生合成経路中に存在する 3 種類の C-P 結合生成酵素の存在を見出した. 本稿では著者らの結果を中心に C-P 結合の生成を触媒する酵素について簡単に紹介する.

1. ビアラホス生合成における C-P 結合反応

著者らは, ビアラホスの生合成経路を詳細に研究し, 少なくとも 13 段階の経路からなることを明らかにしている⁽⁴⁾. また, 著者らと共同研究を行っている明治製菓のグループは各種ビアラホス非生産変異株を宿主として生合成遺伝子のクローニングを行い, 約 35 kb よりなるビアラホス生合成遺伝子クラスターを明らかにしている⁽⁵⁾. ビアラホスの生合成経路中には, 3 種の C-P 結合生成過程, すなわちステップ 1 の PEP ホスホムターゼ反応 [図 1, (1)], ステップ 5 の CPEP ホスホムターゼ反応 [図 1, (5b)], ステップ 12 のリンのメチル化反応 [図 1, (12)] が存在する. 以下にそれぞれの反

応を触媒する酵素を見出した経緯, その特徴等について述べる.

2. PEP ホスホムターゼ (EC 6.4.2.9)

ビアラホス全生合成経路の第 1 段階, すなわちホスホエノールビルビン酸 (PEP) の分子内転位によりホスホノビルビン酸 (Pnpy) が生成する C-P 結合生成反応 [図 1, (1)] はすべての C-P 化合物生産生物に共通する, C-P 化合物生合成における最初の反応であると考えられていたが実験的な証明はなされていなかった. 著者らは, ビアラホス生産菌の無細胞系において, この反応が可逆反応であり, 反応の平衡が PEP を生成する逆反応の側に著しく偏っていることを見出し, 逆反応を指標として本酵素を精製した⁽⁶⁾. これまで C-P 結合はエステル結合よりはるかに安定であると考えられており, 安定な結合 (Pnpy の C-P 結合) が開裂する, すなわち大きなエネルギーを要する方向に平衡が偏っているということは通常の条件では起こりえないというのが通説であった. これまでに本酵素の活性を検出しようとする試みがいずれも成功しなかったのは, この先入観のためであると考えられる. 実際, 著者らもビアラホス高生産株を用いて PEP から Pnpy が生成する正反応の検出を種々の方法で試みたが, Pnpy の生成を直接検出することはできなかった.

著者らが確立した PEP ホスホムターゼ活性の検出方法は次の通りである. 逆反応については, Pnpy を基質とし, 逆反応により生じる PEP をラクトートデヒドロゲナーゼ/NADH-ピルベートキナーゼ/ADP のカップル法により定量することにより行った. また, この逆反応が正反応と同一酵素により触媒されることを証明するために, 精製酵素について再度正反応の検出を試みた. その結果, 正反応生成物である Pnpy をマレートデヒドロゲナーゼによりホスホノ乳酸に変換し, 平衡を Pnpy 生成方向に移動させることにより初めて正反応を検出することができた.

† Studies on C-P Bond Forming Enzymes—Biochemical Mechanisms of C-P Bond Formation in Bialaphos.
Tomomi HIDAKA and Haruo SETO (Institute of Applied Microbiology, The University of Tokyo)

図 1 ビアラホスの C-P 結合生成過程

PEP, phosphoenolpyruvate; Pnpy, phosphonopyruvate; PF, phosphonofornic acid; CPEP, carboxyphosphoenolpyruvate; PPA, phosphinopyruvate; N-Ac DMPT, N-acetyldemethylphosphinothricin; N-Ac PT, N-acetylphosphinothricin).

なお、著者との共同研究によりハーバード大の J. R. Knowles らは原生動物であるテトラヒメナから PEP ホスホムターゼの精製を行い、N 末端のアミノ酸配列を明らかにした⁽⁷⁾。また、当研究室においても C-P 化合物生産能を有する微生物のスクリーニングを行い、ヒドロキシエチルホスホン酸を生産する *Pseudomonas gladioli* が PEP ホスホムターゼを有することを見出した⁽⁸⁾。これら 3 種類の PEP ホスホムターゼは分子量、サブユニット構造は異なっているが、EDTA により阻害され、その阻害が Mg^{2+} により回復する点においては共通している。

また、著者らは C-P 結合を有する抗生物質であるホスホマイシン、FR 33289 生産菌などにおいても PEP ホスホムターゼ活性を検出しており、したがって本酵素は C-P 化合物を生産する生物に共通の酵素であると考えられる。

先にも述べたように本酵素の反応の平衡は C-P 結合の分解する逆反応の側に著しく偏っている。それにもか

かわらず多量のビアラホスが生産されるのは、この強い逆反応を克服する機構が存在し、おそらくそれもすべての C-P 化合物の生合成に共通のはずである。この解明のためには PEP ホスホムターゼ反応の次の反応の解明が必須であろう。

3. CPEP ホスホムターゼ

ビアラホスの生合成の 5 段階目の反応については、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) とホスホノギ酸 (PF) から C-P 化合物であるホスフィノピルビン酸 (PPA) が生成する反応過程であることを著者らは既に明らかにしていた (図 1)。この段階で C-P 結合の生成とホスホン酸からホスフィン酸への還元が行われる。著者らはこの反応に未同定の中間体が関与することを予想し、ビアラホス生合成遺伝子クラスターのステップ 5 に関与する部位を不活化して作成した新しいタイプの変異株から、新規中間体カルボキシホスホノエノールピルビン酸 (図 1, CPEP) を単離した^(9,10)。この物質は PEP と PF からエステル交換反応 [図 1, (5b)] により生合成さ

図 2 ビアラホス生成遺伝子クラスター⁽⁵⁾と各 C-P 結合生成酵素をコードする領域
図中数字は生成の各段階に相当する。

れ、PEP の水酸基がカルボキシル基に置換した構造を有する。さらに CPEP を基質とする C-P 結合生成酵素 CPEP ホスホノムターゼを見出し、その触媒する反応が CPEP のカルボキシホスホ基の転位による C-P 結合生成反応であることを明らかにした [図 1, (5b)]⁽¹¹⁾。なお、転位反応後に起こる脱炭酸反応は非酵素的に起こると考えられている。CPEP ホスホノムターゼは、分子量 64,000、サブユニット分子量 32,000 の 2 量体であり、至適 pH 6.5、至適温度 35~40°C、CPEP に対する K_m 値は 0.25 mM であり、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} により活性化される。本酵素はビアラホス高生産株において菌体内全蛋白質の約 20% を占めるほど著量に産生されることから、この CPEP ホスホノムターゼ反応はビアラホス生成における律速段階の 1 つであると考えられる。なお、著者らは本酵素遺伝子の塩基配列、また精製酵素の部分アミノ酸配列を決定し、一次構造に関するほぼ完全な知見を得ている⁽¹²⁾。また、著者らは前述したビアラホス生産菌の PEP ホスホノムターゼ遺伝子の塩基配列の決定も行っている⁽¹³⁾。図 2 にビアラホス生成遺伝子クラスターおよび C-P 結合生成酵素をコードする領域を示す。今後はこれらの結果を利用して構造活性相関等の研究も可能であろう。

PEP ホスホノムターゼと CPEP ホスホノムターゼはともにエステル結合から分子内転位により C-P 結合が生ずる反応を触媒し、その基質および生成物はたがいアナログの構造をとっている。しかし両酵素とも基質特異性が高く、他方の基質に対してはまったく反応性を示さなかった。また、それぞれの化合物が他方の酵素活性におよぼす影響を調べたところ、CPEP が 2 mM 以上で PEP ホスホノムターゼ逆反応を阻害した以外には顕著なアナログ阻害は認められなかった⁽¹⁴⁾。したがって両酵素はビア

ラホス生産条件下で独立して機能していると考えられる。

4. リンのメチル化酵素

上記の 2 つの C-P 結合生成酵素がエステル結合から C-P 結合への分子内転位を触媒するのに対し、第 3 番目のリンのメチル化酵素はまったくタイプの異なる酵素である。この反応により *N*-アセチルデメチルホスフィトリシンがメチル化され、特異的な C-P-C 結合が生成する。このような結合を有する化合物は現在までに、ビアラホス以外知られていない。また *O*-メチル化、*N*-メチル化、*C*-メチル化等は一般に広く知られているが、*P*-メチル化酵素に関してはこれまでにまったく報告されていない。

ビアラホス生産菌無細胞系における *P*-メチル化酵素の活性は極めて微弱であり、¹⁴C-ラベルした基質を用いることにより初めて反応の検出に成功した。さらに本酵素遺伝子を特定し (図 2, *P*-methylation enzyme)、発現ベクターに連結してビアラホス生産菌以外の放線菌 *S. lividans* で発現させ、その無細胞系を用いて *P*-メチル化酵素のメチル供与体、基質特異性の検討を行った。その結果、直接のメチル供与体はメチルコバロリンであるという興味深い結果を得た。また本酵素の基質特異性を検討したところアミノ基がアセチル化されていることが必須であることも明らかとなった⁽¹⁵⁾。リンのメチル化酵素に関する報告例はこれが最初である。今後は本酵素を精製し、反応機構を解明していきたいと考えている。

- (1) M. L. Schinetti *et al.*: *Drug. Exp. Clin. Res.*, 5, 363 (1979).
- (2) Y. Kondo *et al.*: *Sci. Reports of Meiji Seika Kaisha*, 13, 34 (1973).
- (3) Y. Ogawa *et al.*: *Sci. Reports of Meiji Seika Kaisha*, 13, 42 (1973).
- (4) H. Seto *et al.*: *Biochem. Biophys. Res.*

- Commun.*, 111, 1008 (1983).
- (5) T. Murakami *et al.*: *Mol. Gen. Genet.*, 205, 42 (1986).
- (6) T. Hidaka *et al.*: *J. Antibiotics* 42, 491 (1989).
- (7) H. M. Seidel *et al.*: *Nature*, 335, 457 (1988).
- (8) H. Nakashita *et al.*: *Agric. Biol. Chem.*, 55, 印刷中.
- (9) T. Hidaka *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 8012 (1989).
- (10) T. Hidaka *et al.*: *Agric. Biol. Chem.*, 54, 2121 (1990).
- (11) T. Hidaka *et al.*: *J. Bacteriol.*, 172, 3066 (1990).
- (12) T. Hidaka *et al.*: 投稿中.
- (13) T. Hidaka *et al.*: 投稿中.
- (14) T. Hidaka *et al.*: *Agric. Biol. Chem.*, 54, 2467 (1990).
- (15) K. Kamigiri *et al.*: 投稿中.
-