細菌の C-P 結合開裂酵素†

村田 幸作, 木村 光

(京都大学食糧科学研究所)

1. はじめに

炭素-リン結合 (C-P 結合) は、熱化学的にも、光化学的にも極めて安定であり、有機化学的にこの結合を開裂することは不可能に近い。しかしながら、C-P 結合は、除草剤、抗カビ剤、殺虫剤、神経性ガス、あるいは、抗生物質など多くの有用化合物の分子構造を規定する特徴的な結合であり、C-P 結合の生成と開裂機構の解析は、リン酸関連化学の基礎のみならず、その応用性においても大きな意義を持っている。

C-P 結合の開裂に関与する酵素として、phosphonate (図1) が細菌から単離されている⁽¹⁾。この酵素は、一種の加水分解酵素であり、例えば、アルデヒド基に隣接し不安定化された C-P 結合にのみ作用し、それを開裂する。Methylphosphonic acid ($\text{CH}_3\text{-PO}_3^{2-}$) のような、安定な、未だ不安定化されていない C-P 結合を開裂することはできない。したがって、phosphonate の反応解析から得られる基礎化学的、応用的知見は多くないであろう。一方、C-P 結合の生成に関与する酵素として、最近、phosphoenolpyruvate phosphomutase (図1) が単離され、この酵素が C-P 結合を含む多くの生体内 C-P 化合物の合成において重要な役割を持っていることが明らかにされてきている⁽²⁾。しかし、この酵素は mutase であり、炭素とリンを直接に結合させる synthase ではない。

安定な C-P 結合を含む化合物を唯一のリン酸源として生育可能な微生物が存在することから、上述した phosphonate とは異なる C-P 結合開裂酵素の存在が予想され、その酵素の実体解明に多くの努力が払われた。この酵素は、C-P lyase (図1) と称され、この酵素

により安定な C-P 結合が開裂されるならば、新しい化学反応の存在を実証したことになり、また同時に、有機化学的に不可能な反応が酵素化学的に可能であるということより、酵素の持つ超化学的な機能をも指摘することができよう。しかしながら、この C-P lyase の活性は細菌細胞を破壊することによりほぼ完全に消失し、この酵素の実体解明はここ数年間まったく進展しなかった。ここでは、phosphonic acid (一般式 R-PO_3^{2-}) を唯一のリン酸源として生育可能な菌株の検索と、その株の有する C-P 結合開裂酵素の性質について述べる。

2. 安定な C-P lyase の検索と性質

C-P 結合を含む化合物を唯一のリン酸源として生育可能な微生物を指標とする従来の C-P lyase の検索法は、極めて不安定で酵素化学的解析すら不可能な C-P lyase しか与えない。そこで、安定な C-P lyase を得るため、C-P 結合を含む化合物 phosphonoacetic acid ($\text{HOOC-CH}_2\text{-PO}_3\text{H}_2$) を唯一のリン酸源として生育可能であり、かつ、C-P 結合を裂開して培養液中に無機リン酸を蓄積する能力を持つ微生物という検索条件を与えた。約 200 種の自然サンプルについて検索した結果、ほとんどのサンプル中には C-P 結合を開裂して良好な生育を示す細菌の存在が認められたが、培養液中に無機リン酸を蓄積しえた細菌は、*Enterobacter aerogenes* IFO 12010 と未同定の土壌単離細菌 CP 1, CP 9 および CP 10 の4株のみであった (表1)。これらの菌株は、phosphonoacetic acid を唯一のリン酸源としてスクリーニングされたが、他の phosphonic acid をもリン酸源として生育に利用することができる (図2)⁽⁴⁾。特に著量の無機リン酸を蓄積した *E. aerogenes* IFO 12010, CP 9 および CP 10 株は、無細胞系でも C-P 結合開裂活性を示し (表1)、始めて酵素化学的解析に耐え得る C-P lyase の取得が期待された⁽³⁻⁷⁾。特に、CP 10 株は異常に巨大な細菌 (図3) であり、得られた4株の中では最も広い基質特異性を示す C-P 結合開裂酵素を有している (表

† Carbon-Phosphorus Bond Cleavage Enzymes in Bacteria.

Kousaku MURATA and Akira KIMURA (Research Institute for Food Science, Kyoto University, Uji, Kyoto 611, Japan)

表 1 C-P Bond Cleavage Activities in Cell Extracts of Strains
E. aerogenes, CP1, CP9 and CP10

Phosphonates	Structure	Activity*			
		<i>E. aerogenes</i>	CP1	CP9	CP10
Methylphosphonate	$\text{CH}_3\text{-PO}_3\text{H}_2$	28.9	ND	ND	83.4
Phosphonoacetate	$\text{HOOC-CO-PO}_3\text{H}_2$	23.4	ND	40.2	72.0
Phenylphosphonate	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-PO}_3\text{H}_2$	13.7	ND	ND	74.4
2-Aminoethylphosphonate	$\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-PO}_3\text{H}_2$	—	ND	5.2	101
2-Amino-4-phosphonobutyrate	$\text{HOOC-CHNH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-PO}_3\text{H}_2$	—	ND	ND	90.6
Glyphosate	$\text{HOOC-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-PO}_3\text{H}_2$	ND	ND	ND	62.4
Fosfomycin	$\text{CH}_3\text{-CH-CH-PO}_3\text{H}_2$ $\quad \quad \quad \diagup \quad \diagdown$ $\quad \quad \quad \text{O} \quad \text{O}$	18.9	ND	ND	85.8

* μmol of inorganic phosphate liberated/h/mg of protein.

ND, not detected.

—, not determined.

(1) Phosphonate

(2) PEP-phosphomutase

(3) C-P lyase

図 1 C-P 結合の生成と開裂に関する酵素

図 3 C-P 結合分解活性を有する細菌の電子顕微鏡写真 ($\times 10,000$ 倍)
A, CP1 株; B, CP9 株; C, CP10 株+CP9 株 (矢印).

1).

E. aerogenes IFO 12010 の持つ C-P lyase は、タンパク化学的にも、触媒化学的にも極めて興味深い性質を有している⁽⁴⁻⁶⁾。この酵素は、イオン交換クロマトグラフィーではほぼ安定に回収されるが、ゲル濾過クロマトグラフィーで分画すると 99% 以上活性が消失し、極少量の活性 (図 4, 上, ピーク P1) が認められるに過ぎない。しかしながら、消失した活性はブルー 2 (図 4,

図 2 *E. aerogenes* による C-P 結合性リンの利用
E. aerogenes を種々の C-P 化合物を唯一のリン酸源として含む培地で培養 (30°C, pH 7.2, 好氣的) した場合の生育を示す. ○, 0.5 mM KH_2PO_4 ; △, 0.5 mM methylphosphonic acid; ●, 0.5 mM phosphonoacetic acid; ▲, 0.5 mM phenylphosphonic acid; □, リン酸源無添加.

上, 打点領域) に回収されることより、この酵素は活性発現に 2 種以上のタンパク質の共存を必要とすることが示唆された。実際、これら 2 種のタンパク質はブルー 2 をゲル濾過で再分画することにより、ピーク P2, P3 (P2 と P3 に含まれるタンパク質成分をそれぞれ E2, E3 とする) として得ることができる (図 4, 下)。すなわち、E2, あるいは、E3 単独では活性を発現せず、これら 2 種の成分が共存する時のみ C-P 結合の開裂が可能となる。E3 の分子量は 110,000 であり、分子量 55,000 の同一サブユニット 2 個から成るタンパク質

図4 安定な C-P lyase を構成するタンパク質成分 (E2 と E3) の分離と分子構造

(上): TSK でのゲル濾過による C-P lyase 活性の分画. 各フラクションについて活性を測定すると, P1 で示す微弱な活性ピークが得られる. 各フラクションをプール 1, 2 および 3 に分別するとプール 2 (打点部分) にのみ活性が回収される.

(下): TSK でのゲル濾過による E2 と E3 の分別とそれらの分子構造. (上) で得られたプール 2 を再びゲル濾過するとピーク P2, P3 で示すように両者を混合した場合にのみ C-P lyase 活性が発現するタンパク質成分 (E2 と E3) が得られる. 左右の挿入図は E2 と E3 の SDS-電気泳動パターンを示す. レーン a は, 分子量マーカー.

である (図4, 下). 超遠心的に均一な E2 は, 変性条件下の電気泳動で少なくとも 6 種類のタンパク質成分に分離され, 分子篩より求められる分子量は 650,000 である (図4, 下). この結果を考慮すると, E2 は 6 種類のタンパク質成分の会合体 (分子量 100,000) が 6 個集まった極めて高次なタンパク質構造体であることが予想される.

3. 不安定な C-P lyase の検索と性質

上述した C-P 結合開裂酵素は, 細菌の細胞抽出液中に安定に存在する酵素であり, 無機リン酸非存在下で誘導合成されることより, phosphate starvation inducible (PSI) regulon に含まれる遺伝子によってコードされていると考えられる. この酵素とは別に, 細胞を破壊することにより, 容易にその活性が失われる C-P 結合開裂酵素の存在が認められた (例えば, 表1の CP1 株の酵素). この不安定な酵素を持つ多くの細菌は, 種々の C-

P 化合物をリン酸源として利用するが, 培地中に無機リン酸を蓄積する能力はないようである. この極めて不安定な C-P lyase の実体を明らかにするため, この酵素をコードしていると考えられる遺伝子が単離された⁽⁸⁻¹⁰⁾. この遺伝子は, C-P 化合物を唯一のリン酸源として生育できない大腸菌変異株に, C-P 化合物のリン酸利用活性を賦与する DNA 因子として単離され, その全塩基配列と C-P lyase をコードしていると考えられる最小領域が決定された. その結果, この不安定な C-P lyase の活性発現には, 約 8 種のタンパク質成分が必要であることが明らかにされた. 2 節で述べた安定な C-P lyase の場合と同様, この不安定な C-P lyase も巨大なタンパク質構造体を形成することが活性発現に必須であると考えられる.

4. おわりに

細菌は 2 種類の C-P 結合開裂酵素 (C-P lyase) を有している. 1 つは, 細胞抽出液中に安定に含まれる酵素であり, 他の 1 つは, 極めて不安定で細胞の破壊とともにその活性が消失する酵素である. 後者は, 膜を含む細胞内構造物との間で高次の立体構造を形成しており, その構造物内での電子リレーにより還元的に C-P 結合を開裂すると考えられている^(8,9). リン結合の還元的開裂は, 通常の生体反応では極めて稀な反応であり, 新しい生化学反応として重要であろう. この不安定な酵素の活性発現に, 膜を含む複雑な立体構造の形成が不可欠であるなら, この酵素の機能解明には幾多の困難が予想される. したがって, 筆者が始めてその存在を明らかにした「安定な」C-P 結合開裂酵素は, C-P 結合開裂の化学的側面のみならず, リン酸代謝の詳細の解明に役立つことが期待される.

協同研究者の長村暢恵氏に感謝する.

- (1) J. M. La Nauze, H. Roseberg and D. C. Shaw: *Biochim. Biophys. Acta*, **212**, 332 (1970).
- (2) H. M. Seidel, S. Freeman, H. Seto and J. R. Knowles: *Nature*, **335**, 457 (1988).
- (3) K. Murata, N. Higaki and A. Kimura: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **157**, 190 (1988).
- (4) K. Murata, N. Higaki and A. Kimura: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1225 (1989).
- (5) K. Murata, N. Higaki and A. Kimura: *J. Bacteriol.*, **171**, 4504 (1989).
- (6) K. Murata, N. Higaki and A. Kimura: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1419 (1989).

- (7) N. Osamura, K. Murata and A. Kimura : *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 128 (1991).
 - (8) L. P. Wackett, S. L. Shames, C. P. Venditti and C. T. Walsh : *J. Bacteriol.*, **169**, 710 (1987).
 - (9) L. P. Wackett, B. L. Wanner, C. P. Venditti and C. T. Walsh : *J. Bacteriol.*, **169**, 1753 (1987).
 - (10) W. W. Metcalf and B. L. Wanner : *J. Bacteriol.*, **175**, 587 (1991).
-