

T. thermophilus のポリアミン生合成経路:S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素の特異的な性質
**Polyamine Synthetic Pathway of *T. thermophilus*: S-adenosylmethionine decarboxylase
 of *Thermus thermophilus* HB8 is a novel enzyme**

大島 泰郎¹、古橋 めぐみ^{1, 2}

Tairo Oshima¹ and Megumi Furuhashi^{1, 2}

(¹ 共和化工・環境微生物学研, ² 明治大学大学院・農学研究科)

(¹Inst. Environ. Microbiol., Kyowa-kako, ²Faculty of Agriculture, Meiji Univ.)

e-mail: tairo.oshima@kyowa-kako.co.jp

ポリアミンは細胞内で分裂増殖や高分子生合成を調節している生理活性物質である。ポリアミンはごく例外的な細菌を除いて、ウイルスから細菌、微生物、植物、動物のすべての細胞に広く分布しているが、多くの場合、プトレシン(化学式は $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$)、スペルミジン($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$)、スペルミン($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$)の3種の「標準」ポリアミンに限定されている。しかし、高度好熱菌、超好熱菌はしばしば長鎖ポリアミンや分岐したポリアミンを生産し、これらは好熱菌細胞内では核酸類や細胞膜の熱安定性にかかわっていると推定されている²。たとえば、*Thermus thermophilus* の高温下の無細胞系タンパク質合成は、ポリアミンの添加を必要とし、特に分岐ポリアミンの存在下で最も高い活性を示す。また、これらの特異なポリアミンは、好熱菌を高温下で増殖させたときに多く生産される。ポリアミン生合成系遺伝子をノックアウトし、これらの特異ポリアミンを作れなくした変異株は、70℃では増殖できるが、75℃以上では、長鎖や分岐ポリアミン(または生合成の前駆体)を添加しないと増殖できない。

「丸ごと一匹」プロジェクトのおかげで、ゲノム情報が入手できるようになったので、ポリアミン生合成系の逆遺伝学的な実験が可能となり、*T. thermophilus* のポリアミン生合成系の前半部分、スペルミジンやスペルミンの生合成までの経路が明らかになった¹。残念ながら、長鎖や分岐鎖ポリアミンがどのような経路で作られているかは明らかでない。また、ポリアミンは増殖などの調整にかかわっているため、細胞内濃度は厳密にコントロールされているが、*T. thermophilus* では経路の一部が明らかになったのみで、各段階の代謝調節機構には踏み込めていない。

T. thermophilus のゲノムには、ポリアミン生合成にかかわる以下の5つの遺伝子が「帰属」されている(ここでは発現産物の酵素名で示す)。

SpeA: アルギニン脱炭酸酵素=アルギニンからアグマチンを作る酵素

SpeB: アグマチナーゼ=アグマチンから尿素を放出してプトレシンを作る酵素

SpeD1: S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素= SAM から CO_2 を放出し、アミノプロキル基の供与体となる分子を作る酵素、反応産物の系統名は長いので、deSAM などと略記されている

SpeD2: 通常、SpeD をコードしている遺伝子は一つであるが、*T. thermophilus* は2個持っている(後述)

SpeE: スペルミジン合成酵素=プトレシンに deSAM からアミノプロキル基を転移させスペルミジンを作る酵素、多くの生物では、類似の酵素スペルミン合成酵素(スペルミジンにアミノプロキル基を転移する)があり、SpeE とは別の遺伝子にコードされていることが多いが *T. thermophilus* には相同な遺伝子は1個しかない

SpeC はオルニチン脱炭酸遺伝子で、オルニチンからプトレシンを作る反応を触媒する。高等動物ではポリアミン代謝系の中で最も重要な酵素で、多くの研究がされてきたが、*T. thermophilus* のゲノム中には

存在しない。

上記の酵素をコードしている遺伝子をノックアウトして、ポリアミンの組成変化を調べ、*T. thermophilus* では従来知られていない全く新規な経路でスペルミジンが生合成されていることがわかった。下図のAは多くの細菌や植物などで見られるポリアミン生合成系路で、プトレシンはオルニチン and/or アルギニンから合成され(図では省略されているが、アグマチンからプトレシンへの転換はもう一つ別なマイナーな経路が存在する)、これに順次アミノプロピル基が付加されてスペルミジン、スペルミンが作られる。これに対し、*T. thermophilus* では(図B)、オルニチンからの経路は存在せず(あるいは常時は強く抑制され)ポリアミンはアルギニンのみから作られている。アルギニンはまず、アグマチンとなるが(ここまではAとおなじ)、これに SpeB は作用せず、SpeE が働いて、新規物質であるアミノプロピルアグマチンが出来る。これに SpeB が働いて、いきなり(プトレシンを経由せず)スペルミジンが合成される。すなわち、SpeB はアグマチナーゼではなく、アミノプロピルアグマチナーゼである。in vitro の実験から、SpeE はアグマチンのほか、スペルミジンにも働きスペルミンを、また、nor-スペルミジン(構造は 3-3)も基質とし、テルミン thermine(3-3-3)を合成する反応も触媒するので、こちらもスペルミジン合成酵素ではなく、系統名でいうとアグマチン/トリアミン・アミノプロピル転移酵素と呼ぶべき酵素である。

図1A 細菌などのポリアミン生合成系

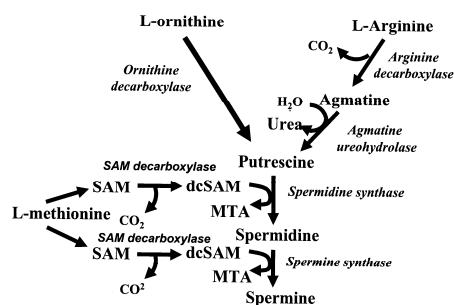
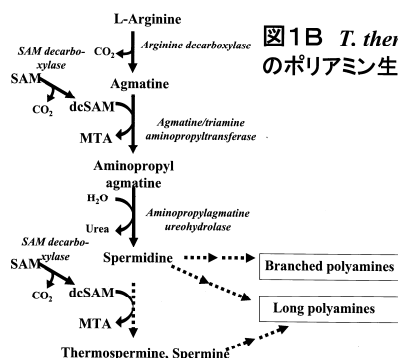


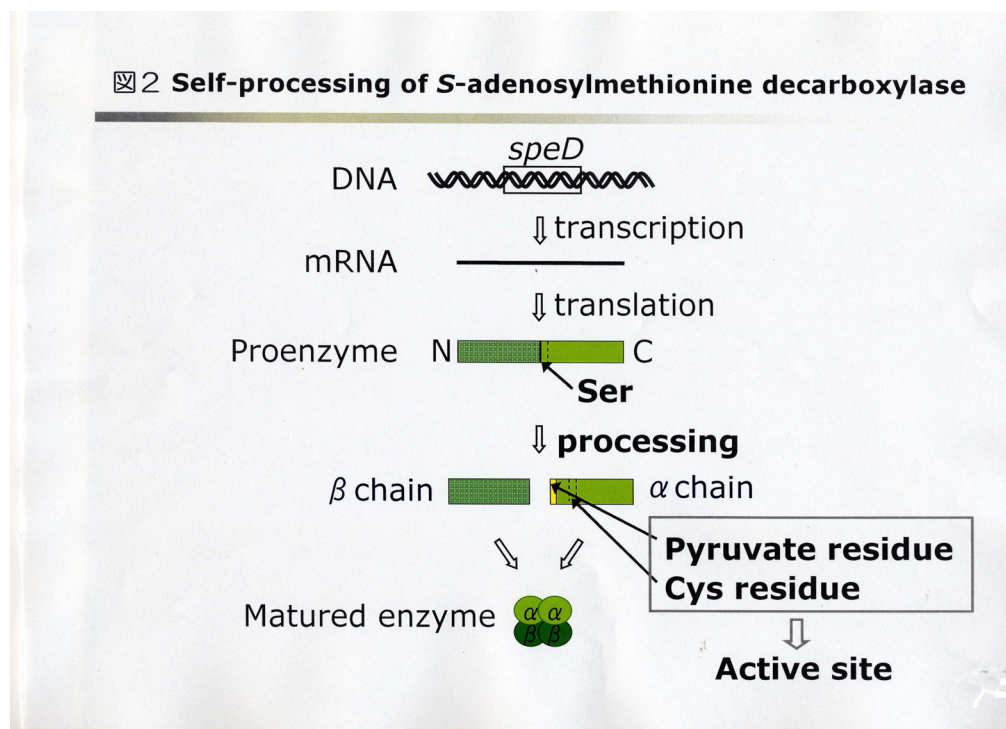
図1B *T. thermophilus* のポリアミン生合成系



今回は、SpeD について研究の進展状況を述べる。*T. thermophilus* にはなぜか二つの相同遺伝子が存在し、いずれも SpeD 遺伝子と帰属されているので、われわれは勝手に TTHA0825 を SpeD1、TTHA1457 を SpeD2 と呼んでいる。なお、TTHA0824 は SpeE であり、SpeE と SpeD1 は同じオペロン内であるが、SpeD2 はこれらの遺伝子とは独立の存在である。大腸菌でも SpeD と SpeE 遺伝子は並んで存在し塩基配列の一部がオーバーラップしているから、当初、SpeD1 が SAM 脱短酵素と見当をつけていたが、アミノ酸配列を見るとプロセッシングや触媒活性に必須のアミノ酸残基(当然、全生物の SpeD で保存されている)が欠失している。また、古細菌に属する *Sulfolobus tokodaii* のゲノムにも SpeD 相同遺伝子は2個存在する。

SpeD は蛋白質科学の上からは興味深い酵素である。酵素はヘテロサブユニット構造をしているが、遺伝子は1個であり、下図のように一旦、ポリペプチドが生合成されてから、自発的に中間で切断され、N 末側が β サブユニット、C末側が α サブユニットとなる。切断は単純なペプチドの加水分解ではなく、セリン残基の水酸基にその一つ前のアミノ酸残基のカルボキシル基が転移し、水の関与なしに切断が先に起こるので、N 末側は正常なポリペプチドであるが、C末側のN末に当たる残基はデヒドロアラニンとなり、このアミノ酸は直ちに水と反応してピルビン酸となるので、N末はなくピルビン酸残基を含むポリペプチドが出

来る。α サブユニットのピルビン酸残基は、酵素活性に必須の活性中心残基である。



SpeD1 はプロセッシングに必要な Ser 残基を欠失しているので、ポリアミン代謝には関係のない酵素と思っていたが、SpeD1 欠損株は長鎖も分岐ポリアミンも作らず、合成培地では 75℃で増殖できない。SpeD2 の欠損株は、SAM 脱炭酸酵素が欠失しているとして説明できるポリアミン組成を示した。そこで SpeD1、SpeD2 をそれぞれ精製して、酵素学的な研究を始めた。予想通り、SpeD1 は自己切断(プロセッシング)は起こらず、ヘテロサブユニット構造はとらない。SpeD2 は他の生物の SpeD と同じように、自発的に切断されヘテロサブユニット構造となる。ただし、切断には加熱が必要である。

酵素活性を調べると、予期に反して SpeD2 はわれわれの測定法では *in vitro* で触媒活性が見つからない(全くないかどうかは、わからない。活性が弱いだけで、もっと鋭敏な活性測定法を用いると検出できる可能性はある)。しかし、精製した SpeD1 タンパク質を添加すると、活性が検出できるようになった。SpeD1 は、少なくとも SpeD2 の活性化因子である。SpeD1 欠損株でもスペルミジンまでは合成されるので、*in vivo* では SpeD2 単独で活性があるらしい。SpeD1 がどのようにして SpeD2 の活性を賦活化しているかは今後の課題である。また、最近、相次いで微生物や植物にそれぞれ1例ずつであるが、SpeD 相同遺伝子を二つ持ち、一方が SpeD 酵素をコードし、一方は酵素の活性化因子として働くタンパク質をコードしている例が報告された^{3,4}。これらについても考察する。

Reference

- 1 Ohnuma, M., et al., JBC **280**(34):30073-30082 (2005)
- 2 Terui, Y., et al., Biochem. J. **388**, 427-433 (2005)
- 3 Willert, E.K., et al., ProNAS **104**, 8275-8280 (2007)
- 4 Giles, T.N. & Graham, D.E., (2008) JBC on-line