

## 科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金) 研究成果報告書

平成 25 年 4 月 19 日現在

機関番号：33910

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658098

研究課題名(和文) イソプレニルトリプトファン含有ペプチドの探索

研究課題名(英文) Screening of posttranslationally modified peptide containing isoprenylated tryptophane residue.

研究代表者

岡田 正弘 (OKADA MASAHIRO)

中部大学・応用生物学部・講師

研究者番号：40377792

研究成果の概要(和文)：翻訳後修飾によるトリプトファン残基のイソプレニル修飾の普遍性を検証することを目的とした研究を行い、枯草菌由来のイソプレニルトリプトファン含有ペプチドである ComX フェロモンの前駆体である ComX ペプチドと、その修飾酵素である ComQ、およびイソプレニル 2 リン酸、マグネシウムイオンのそれぞれを用いた *in vitro* 酵素反応による修飾反応に成功した。

研究成果の概要(英文)：In order to confirm that isoprenylation of tryptophan residues is a universal posttranslational modification, I developed a cell-free assay system by which the tryptophan residue in the ComX pheromone precursor can be isoprenylated by the modifying enzyme, ComQ, with isoprenyl pyrophosphate and magnesium ion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：翻訳後修飾、イソプレニル化、トリプトファン、枯草菌、クオラムセンシング

## 1. 研究開始当初の背景

翻訳後修飾は、タンパクやペプチドの機能発現の制御を行うための中心的な役割を担うシステムであり、様々なアミノ酸残基上の様々な修飾様式が報告されている。その一つであるシステイン残基のイソプレニル化は、坂神らによって、担子菌の接

合管形成フェロモンであるオリゴペプチド *tremerogen* から初めて発見された。当初はペプチドフェロモン中のみで見られる特殊な翻訳後修飾であったが、その後、ヒト Ras タンパクなどからも確認され、現在では真核生物に普遍的に存在する機能発現に必須な翻訳後修飾であることが明ら

かとなっている。一方、原核生物からは、申請者らが枯草菌の形質転換誘導フェロモンであるオリゴペプチド ComX フェロモンが、トリプトファン残基のプロリン様の環化を伴うイソプレニル化という新規翻訳後修飾を受けていることを明らかにした。この修飾も形質転換誘導に必須な翻訳後修飾であるものの、現在までに枯草菌の6菌株においてのみしか確認されていない。申請者は、両修飾様式の類似性 (図 1) から、翻訳後修飾によるイソプレニル化は全生物に普遍的に存在しており、その1種であるトリプトファンのイソプレニル化は、翻訳後修飾によるイソプレニル化のプロトタイプであり、進化の過程でシステイン残基へと変化していったのではないかとの着想に至った (図 2)。この仮定が本当ならば、枯草菌以外の原核生物や、一部の真核生物からもイソプレニルトリプトファンを有するタンパクやペプチドが発見出来るはずである。

プレニル化されているペプチドやタンパクが普遍的に存在することを証明することを目的とした研究を行う。最終的な目標としては、なぜ、真核生物ではシステイン残基のイソプレニル化が機能発現に必須な翻訳後修飾として普遍的に使用されることになったのか、原核生物では全く使用されていないのかという疑問に対して、有機化学的な視点からの解答を提示し、翻訳後修飾によるイソプレニル化の進化についての全容を解明することを目指す。

### 3. 研究の方法

まず、イソプレニル基様の側鎖を有する修飾トリプトファン残基を含むペプチドを化学合成し、それをハプテンに抗原を作製し、抗体を作製する。次に、細菌を中心とした様々な微生物の培養を行い、それぞれの培養液に対して、不溶性、不安定性を考慮した抽出、粗精製を行い、各検定溶液を得る。

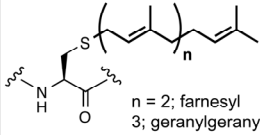
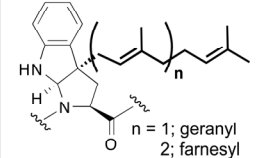
被修飾アミノ酸	修飾アミノ酸の化学構造	初めて発見された物質	普遍性	コンセンサス配列	役割
システイン	 n = 2; farnesyl 3; geranylgeranyl	担子菌のペプチドフェロモン	真核生物に普遍的	CaaX a = 脂肪族アミノ酸 X = M; farnesyl L; geranylgeranyl	機能発現に必須 ガン遺伝子産物の機能発現など
トリプトファン	 n = 1; geranyl 2; farnesyl	枯草菌のペプチドフェロモン	不明 (枯草菌にのみ確認)	不明 ComX は菌株ごとにアミノ酸配列が大きく異なる	機能発現に必須 DNA 形質転換誘導 (ポリグルタミン酸、 毒素の生合成?)

図 1. システイン残基とトリプトファン残基の翻訳後修飾によるイソプレニル化の比較

### 2. 研究の目的

トリプトファン残基をイソプレニル化する修飾酵素のコンセンサス配列を決定することを目的とした研究を行う。さらに、枯草菌以外の原核生物にもトリプトファン残基がイソ

さらに、トリアコンチルカラムとシアノプロピルカラムに対する親和性の違いを利用した LC-MS/MS 分析により、イソプレニルトリプトファン含有ペプチドを探索する。最後に、作製した抗体による検出、および化学合成し

た候補ペプチドとの比較により、イソプレニルトリプトファン含有ペプチドであることを証明する。

#### 4. 研究成果

枯草菌の ComX フェロモン以外でトリプトファン残基のイソプレニル修飾が発見された例はない。しかし、システイン残基のイソプレニル修飾の普遍性が明らかにされていることなどを踏まえるとトリプトファン残基のイソプレニル修飾も普遍的に存在する可能性が高いと予想された。そこで、本研究では ComX フェロモンにおけるトリプトファン残基のイソプレニル修飾の普遍性を検証することを目的とした。まず、イソプレニルトリプトファンを含有したハプテンを合成した。これを基にポリクローナル抗体を作製したものの抗体価が低く、実際に検出に使用することは困難であると考えられた。そこで、R0-E-2 株由来の ComXR0-E-2 フェロモンの修飾トリプトファン残基におけるゲラニル基が生理活性に必須であることを証明するために、有機合成により各種イソプレニル変異 ComX フェロモンを合成し、それぞれの生理活性の比較を行った。その結果、ゲラニル基の 2 重結合を還元するだけでほとんど活性を消失することを見だし、側鎖のゲラニル基の化学構造は活性発現に重要であることが判明した。

次に、分子生物学的手法により comQ の過剰発現大腸菌を作製した。得られた修飾酵素 ComQ の反応条件を検討し、この酵素が金属 Mg<sup>2+</sup>を必要とすることを見だし、in vitro ComQ 酵素反応による ComX のイソプレニル化活性を LC-MS を用いて評価する条件を確立した。最後に、他の生物種からイソプレニルトリプトファン含有ペプチド候補を選別し、分子生物学的手法により comQX 候補の過剰発現大腸菌を作製したが、両候補とも発現しなかった。今後はベクターの種類、配列などを検討し、comQX 候補過剰発現大腸菌を作製し、その後、構築した検出法を適用する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

(1) F. Tsuji, A. Ishihara, A. Nakagawa, M. Okada, S. Kitamura, K. Kanamaru, Y. Masuda, K. Murakami, K. Irie, and Y. Sakagami. Lack of the consensus sequence necessary for tryptophan prenylation in the ComX pheromone precursor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2012, 76, 1492-1496. (査読あり)  
DOI; doi.org/ 10.1271/ bbb.120206

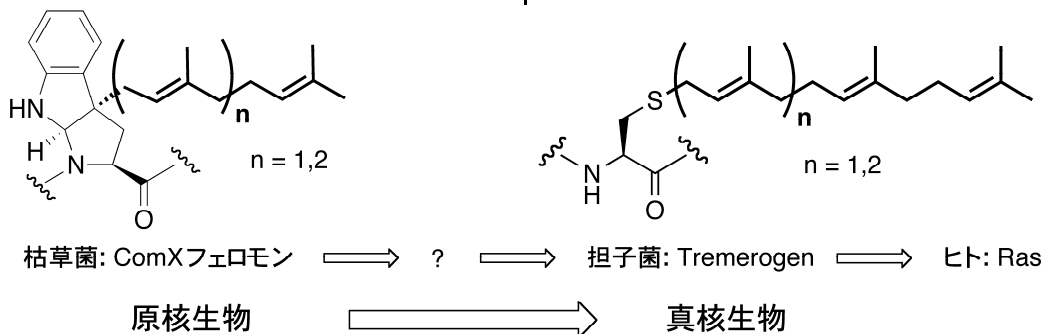


図 2. 翻訳後修飾によるイソプレニル化の進化

(2) H. Kasai, T. Murakami, Y. Ikuta, Y. Koseki, K. Baba, H. Oikawa, H. Nakanishi, M. Okada, M. Shoji, M. Ueda, H. Imahori, and M. Hashida. Creation of pure nanodrugs and their anticancer properties. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 10315- 10318. (査読あり) DOI; doi.org/ 10.1002/ anie.201204596

(3) F. Tsuji, A. Ishihara, K. Kurata, A. Nakagawa, M. Okada, S. Kitamura, K. Kanamaru, Y. Masuda, K. Murakami, K. Irie, and Y. Sakagami. Geranyl modification on the tryptophan residue of ComXRO-E-2 pheromone by a cell-free system. *FEBS Lett.* 2012, 586, 174-179. (査読あり) DOI; doi.org/10.1016/j.febslet.2011.12.012

(4) F. Tsuji, K. Kobayashi, M. Okada, H. Yamaguchi, M. Ojika and Y. Sakagami. The geranyl-modified tryptophan residue is crucial for ComXRO-E-2 pheromone biological activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011, 21, 4041-4044. (査読あり) DOI; doi.org/10.1016/j.febslet.2011.12.012

(5) M. Okada. Post-translational isoprenylation of tryptophan. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2011, 75, 1413-1417. (査読あり) DOI; doi.org/10.1271/bbb.110087

[学会発表] (計 2 件)

(1) M. Okada. Peptide isoprenylation. International Symposium on Natural Products Chemistry and Chemical Biology 2012 (招待講演) 2012 年 11 月 23 日～2012 年 11 月 26 日. Hangzhou, China.

(2) 岡田 正弘. 翻訳後修飾によるトリプトファンのイソプレニル化. 第三回 有機「ものづくり」化学研究会 (招待講演) 2011 年 8 月 27 日. 福岡.

[図書] (計 1 件)

(1) M. Okada, F. Tsuji and Y. Sakagami. Posttranslational isoprenylation of tryptophan residues in *Bacillus subtilis*. *The Enzymes Vol 29*, Academic Press, San Diego, CA. **2011**, 183-194. ISBN: 978-0-12-381339-8.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡田 正弘 (OKADA MASAHIRO)  
中部大学・応用生物学部・講師  
研究者番号: 4 0 3 7 7 7 9 2