

えられる。他にもポリユビキチン化された Cdc34 なども、その Unstructured 領域の性質に注目すれば、なぜ分解されないのか理解できる。

一方、ユビキチン非依存的にプロテアソームにより分解されるタンパク質 (ODC やチミジル酸合成酵素など) も、分解を引き起こす条件を備えた Unstructured 領域を持つ。実際この Unstructured 領域が分解シグナルであることがわかっている。おそらくユビキチン非依存的分解基質の Unstructured 領域は非常に強く ATPase リングのチャンネルに結合するため、ポリユビキチン鎖が不要なのであろう。このことからも、プロテアソームによるタンパク質分解において、Unstructured 領域の性質はプロテアソーム結合標識以上に重要であることがうかがい知れる。

5. おわりに

以上でプロテアソームの基質認識における Unstructured 領域の重要性を紹介した。この重要性は Unstructured 領域をターゲットにした分解の制御が可能であることを示唆している。実際 Unstructured 領域へのタンパク質の結合などにより、分解が抑制される例が報告されており、さらに多くのタンパク質の分解制御が Unstructured 領域を介して行われると予測される⁷⁾。また、同様の制御を人工的に行うことも可能であるはずである。これまでユビキチナリガーゼをターゲットとした分解制御法が報告されているが、Unstructured 領域をターゲットにした分解制御により、より特異的に任意のタンパク質の分解を人工的に調整できるようになるかもしれない。

- 1) Inobe, T. & Matouschek, A. (2008) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 18, 43–51.
- 2) Prakash, S., Tian, L., Ratliff, K.S., Lehotzky, R.E., & Matouschek, A. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11, 830–837.
- 3) Prakash, S., Inobe, T., Hatch, A.J., & Matouschek, A. (2009) *Nat. Chem. Biol.*, 5, 29–36.
- 4) Inobe, T., Fishbain, S., Prakash, S., & Matouschek, A. (2011) *Nat. Chem. Biol.*, 7, 161–167.
- 5) Fishbain, S., Prakash, S., Herrig, A., Elsasser, S., & Matouschek, A. (2011) *Nat. Commun.*, 2, 192.
- 6) Lander, G.C., Estrin, E., Matyskiela, M.E., Bashore, C., Nogales, E., & Martin, A. (2012) *Nature*, 482, 186–191.
- 7) Beekman, J.M., Vervoort, S.J., Dekkers, F., van Vessmen, M. E., Venelbosch, S., Brugulat-Panes, A., van Loosdrecht, J., Braat, A.K., & Coffer, P.J. (2012) *Oncogene*, 31, 2668–2679.

高橋 一暢, 伊野部 智由
(富山大学先端ライフサイエンス拠点)

Unstructured region required for proteasome-mediated degradation

Kazunobu Takahashi and Tomonao Inobe (Frontier Research Core for Life Sciences, University of Toyama, 3190 Gofuku, Toyama-shi, Toyama 930-8555, Japan)

原生生物細胞性粘菌のポリケタイド生合成 機構

1. はじめに

細胞性粘菌は土壤中に広く分布する真核微生物の一種で、通常は単細胞アーベルとして大腸菌等の細菌を餌として補食し分裂を繰り返す。しかし、餌がなくなると飢餓応答により集合体形成を開始し、ストレス耐性の胞子を分化させ栄養条件が回復するまで休眠する。このように細胞性粘菌の特徴はその生活史の中に単細胞と多細胞の二つの時期を持つという点にある。多細胞の集合体形成後は高等生物にみられるパターン形成、協調した細胞運動等の発生の諸過程を経て、大別すると柄と胞子のわずか2種類の分化した細胞からなる子実体を形成する。そのため、細胞性粘菌は発生・分化のモデル生物として長い間研究が続けられてきた。しかし、2005年の細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の全ゲノムの読解終了によって、細胞性粘菌の研究に新たな局面がもたらされた¹⁾。それはポリケタイドを中心とした二次代謝産物生合成に関する研究である。細胞性粘菌はこれまでに知られているどの生物よりも多くのポリケタイド合成酵素 (PKS) 遺伝子を持っていることが明らかになった。細胞性粘菌はそのゲノム 34 Mb のなかに 45 個もの pks 遺伝子を持っている。さらにその後に公開された近縁種の *D. purpureum* では 50 個の pks 候補遺伝子が報告されている²⁾。この遺伝子の数の多さはたとえば二次代謝産物の宝庫として知られる放線菌 *Streptomyces avermitilis* のゲノムでは、二次代謝産物生合成の遺伝子クラスターは 30 個、*S. griseus* では 34 個であり、細胞性粘菌がいかに多くの生合成遺伝子を持っているかがわかる^{3,4)}。

細胞性粘菌の持つ PKS は基本的にすべて反復型の I 型 PKS であった。反復型の I 型 PKS は巨大タンパク質でいくつかのドメインの組み合わせによって成り立っている。

このうちアシルトランスフェラーゼ (AT), ケトシンターゼ (KS), アシルキャリアプロテイン (ACP) の三つが必須ドメインで、その他に還元ドメイン、メチル化ドメイン等を持ち、最後に産物を切り離すチオエステラーゼ (TE) ドメインを持つ。細胞性粘菌はこの反復型の I型 PKS のほかに二つの新規ハイブリッド型 PKS を持っていた。この酵素は反復型の I型 PKS の C 末端の TE ドメインが III 型 PKS に置きかわり、I型と III型という二つの異なる酵素が融合し互いに協調して機能するという酵素で、いわば天然のコンビナトリアル生合成の例と考えられる。筆者らはこれを Steely と名づけた⁵⁾ (図 1)。これらの *pk*s 遺伝子は細胞性粘菌ゲノムの全コーディング領域の約 2% を占めている。これらの遺伝子は一体何を作って、どのような機能を持っているのだろうか。また、ポリケタイドはさまざまな修飾を受けてその生理活性を獲得するが、細胞性粘菌ではどのような修飾が行われているのだろうか、これまでの研究を概説したい。

2. 細胞性粘菌にみるポリケタイド合成 —進化的側面から

ハイブリッド型酵素 Steely は細胞性粘菌で最初に発見された PKS で、これまでのところ細胞性粘菌のみでみられる酵素である。細胞性粘菌はいつこの酵素遺伝子を獲得したのだろうか。

細胞性粘菌は 100 種類以上の種が存在するが、これまでには形態学的な分類法により三つの大きなグループに分けられてきた。2006 年には α チューブリン、リボソーム小サブユニット RNA (ssrRNA) の配列解析から分子系統樹が作製された⁶⁾。それによると細胞性粘菌は四つの大きなグループに分けられ、最も進化したグループ 4 に向けて体制をより大きく、より複雑化してきたことが示された。2011 年に報告された始原的なグループ 1, 2 に属する細胞性粘菌 *D. fasciculatum*, *Polysphondylium pallidum* のゲノム解析およびグループ 4 のほかのメンバーである *D. purpureum* のゲノム解析結果によると、種ごとの環境応答を反映するように粘菌の PKS はそれぞれの種によって独自のグループを形成していた^{2,7)}。その中にあって SteelyA, SteelyB は種を超えて保存されていて、さらにこの二つはどの種においても別のグループを形成している。つまり Steely 酵素は細胞性粘菌の始原的な種においてすでに獲得され、おそらく SteelyA と B は別々の I型 PKS に別々の III型 PKS がそれぞれ独立して融合したと考えられる。

3. DIF-1 の生合成と機能

英國ケンブリッジの MRC 分子生物学研究所の Rob Kay 博士は単層培養によるバイオアッセイによってアーベバ細胞を空胞化した柄細胞へと分化誘導する物質の単離、構造解析に成功した。この分化誘導分子は Differentiation Inducing Factor-1 (DIF-1) と呼ばれる塩素 2 分子を含むアルキルフェノンで 1987 年にその構造が報告され⁸⁾、1998 年に生合成経路が推定され⁹⁾、2000 年以降 cDNA およびゲノム情報に基づく解析により具体的な生合成経路が明らかにされてきた (図 1)。DIF-1 のポリケタイド骨格は SteelyB 酵素によって合成される⁵⁾。続いてフラビン依存型ハロゲナーゼによって塩素が付加され¹⁰⁾、最後に des-methyl-DIF-1 メチルトランスフェラーゼによってメチル基の修飾を受け DIF-1 ができる¹¹⁾。DIF-1 の生合成経路の中で *stlB* 遺伝子とハロゲナーゼの *chlA* 遺伝子はゲノム上でプロモーターを共有する形で隣接していて、二つの遺伝子は時間的にも空間的にも同じ発現パターンを示す。

DIF-1 は発見当初、柄細胞分化の 95% 以上の活性を担うと考えられ、将来柄に分化することが運命づけられている予定柄細胞のマーカー遺伝子の発現は DIF-1 によって誘導され、逆に将来胞子に分化することが運命づけられている予定胞子のマーカー遺伝子はその発現が抑えられるときれてきた。一方で、DIF-1 によっても誘導されない予定柄細胞マーカーも存在していたので予定柄細胞の分化誘導分子は DIF-1 以外にも存在することが推定されていた。つまり、予定柄細胞は単一の細胞群ではなくいくつかのサブセルタイプに分けられる。その結果、主要な柄の部分だけでなく柄を支える basal disc や胞子塊を支える upper cup, lower cup などに分化する。DIF-1 が予定柄細胞のうちのどのサブセルタイプの分化誘導を行なうのかは *stlB* 遺伝子破壊株の欠損から明らかになった。この株は prestalk B と呼ばれる予定柄細胞のなかのひとつのサブセルタイプを欠き、子実体をみると basal disc と lower cup を欠損していた¹²⁾。しかし、予想に反して柄の主要な部分は DIF-1 がなくても形成されていたことから、主要な予定柄細胞の分化誘導をつかさどるポリケタイドは別に存在すると考えられ、その発見が次なる課題として残された。なお、DIF-1 は柄細胞分化誘導を行なったあと柄細胞で代謝される。この代謝の第一段階が脱塩素反応で、塩素が一つはずれることによって DIF-1 は分化誘導能をほとんど持たない DIF-3 になる。古くからこの酵素の活性は知られていたが、酵素自体は 2011 年にやはりゲノム情報を用いた解析から同定さ

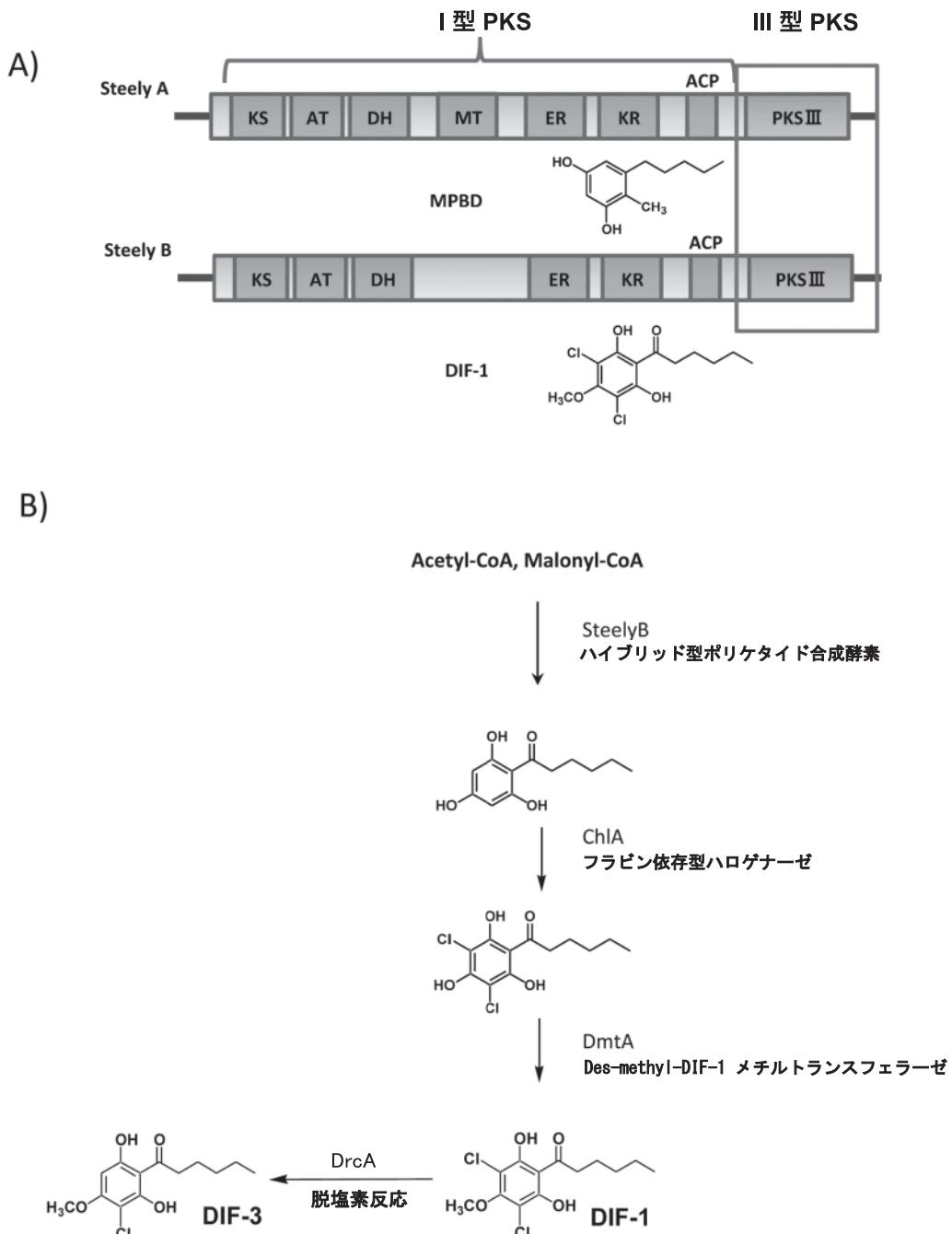


図1 新規ハイブリッド型ポリケタイド合成酵素 Steely の構造と化合物の生合成経路

A) 細胞性粘菌に見られる二つのハイブリッド型ポリケタイド合成酵素 (SteelyA, SteelyB) とそれぞれの産物の構造。ケトシンターゼ (KS), アシルトランスフェラーゼ (AT), デヒドラターゼ (DH), メチルトランスフェラーゼ (MT), エノイルレダクターゼ (ER), ケトレダクターゼ (KR), アシルキヤリアプロテイン (ACP)。

B) ゲノム情報に基づいて次々と明らかになった DIF-1 の生合成経路と代謝の第一段階である脱塩素反応の過程。

れた。脱塩素酵素 DrcA は土壤微生物から発見された酵素であることなどから、有機塩素化合物の土壤汚染除去に有用である可能性が示唆されている¹³⁾。

4. MPBD の生合成と機能

SteelyA 酵素の産物とその遺伝子の発現時期に関しては二つの異なる報告があった^{5, 14)}。当初細菌で発見させた SteelyA の III 型 PKS は中鎖のアシル CoA をスターター基質としてアシルピロンを合成すると報告された。しかし、その後 III 型 PKS の上流に ACP ドメインをつけたダイドメインを細菌で発現させた場合にはアシルピロンはほとんど合成されず、分化誘導分子として同定された 4-methyl-5-pentylbenzene-1, 3-diol (MPBD) を合成することが報告された。しかし、これらは細菌で発現させた酵素を用いての *in vitro* 実験であるため、筆者らは野生型株と *stlA* 欠損株を用いて、*in vivo* での SteelyA の産物の同定を試みた。その結果、SteelyA 酵素の主要な産物は MPBD であることがわかった¹⁵⁾。MPBD はメチル基の修飾を受けているが、SteelyA 酵素はメチルトランスフェラーゼドメインを持っているため、MPBD の合成に関してはほかの修飾酵素を必要とせず SteelyA 酵素のみによって作られるのではないかと考えている。MPBD がどのような機能を持っているのかを調べるため遺伝子破壊株の欠損を調べた。*stlA* 遺伝子破壊株は集合体形成が遅れるが、一見すると正常な子実体を形成する。しかし、胞子塊に色がなくグラッシャーと呼ばれる表現型であったため、胞子を顕微鏡で観察したところセルロースの殻を持たないアメーバ状の細胞で、胞子成熟に欠損があるということがわかった。この欠損は寒天培地中に 200 nM の MPBD を加えることによって回復したことから、SteelyA は *in vivo* で MPBD を作り胞子形成をつかさどると結論づけた¹⁵⁾。

5. その他の酵素

細胞性粘菌のポリケタイド合成酵素のうち Steely 以外の酵素で機能がわかっているものはほとんどない。前述のとおり Steely 酵素以外は種を超えて保存されているものはほとんどなく、種特異的な酵素ばかりである。微生物のポリケタイド合成酵素は環境応答のために使われているものが多く、通常の培養条件では発現しておらず、その遺伝子発現の条件を見つけることが難しいものもある。しかし、細胞性粘菌 *D. discoideum* では発生の過程ですべての *pks* 遺伝子を発現している。つまり細胞性粘菌は数多くの PKS を総動員して生活史をまわしていると考えられる。形態形

成には細胞間コミュニケーションが不可欠であり、これらの酵素がどのように機能しているのか、今後の解析が待たれる。

6. おわりに

細胞性粘菌をはじめとする原生生物はほかのポリケタイド生産者である植物、菌類、細菌類とは進化的にはなっていること、細胞性粘菌はほかの生物にはみられない Steely 酵素を持つことなどから、独自の進化を遂げてきたと推定される。また、細胞性粘菌は土壤という豊かな環境に生息していることから周辺環境と盛んに化学物質を介したコミュニケーションをとっていることが推定される。細胞性粘菌は遺伝子操作が容易で、ゲノム情報が整備されている、さらに 100 種を超える分子系統が調べられている。これらの利点を最大限に活かし、その生合成機構や化学生態学を理解すれば新たな生物製剤の開発にもつながるかもしれない。

- 1) Eichinger, L., et al. (2005) *Nature*, 435, 43–57.
- 2) Sucgang, R., et al. (2011) *Genome Biol.*, 12, R20.
- 3) Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M., & Omura, S. (2003) *Nat. Biotechnol.*, 21, 526–531.
- 4) Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M., & Horinouchi, S. (2008) *J. Bacteriol.*, 190, 4050–4060.
- 5) Austin, M.B., Saito, T., Bowman, M.E., Haydock, S., Kato, A., Moore, B.S., Kay, R.R., & Noel, J.P. (2006) *Nat. Chem. Biol.*, 2, 494–502.
- 6) Schaap, P., Winckler, T., Nelson, M., Alvarez-Curto, E., Elgie, B., Hagiwara, H., Cavender, J., Milano-Curto, A., Rozen, D.E., Dingermann, T., Mutzel, R., & Baldauf, S.L. (2006) *Science*, 314, 661–663.
- 7) Heidel, A.J., Lawal, H.M., Felder, M., Schilde, C., Helps, N.R., Tunggal, B., Rivero, F., John, U., Schleicher, M., Eichinger, L., Platzer, M., Noegel, A.A., Schaap, P., & Glöckner, G. (2011) *Genome Res.*, 21, 1882–1891.
- 8) Morris, H.R., Taylor, G.W., Masento, M.S., Jermyn, K.A., & Kay, R.R. (1987) *Nature*, 328, 811–814.
- 9) Kay, R.R. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 2669–2675.
- 10) Neumann, C.S., Walsh, C.T., & Kay, R.R. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 5798–5803.
- 11) Thompson, C.R. & Kay, R.R. (2000) *Mol. Cell.*, 6, 1509–1514.
- 12) Saito, T., Kato, A., & Kay, R.R. (2008) *Dev. Biol.*, 317, 444–453.
- 13) Velazquez, F., Peak-Chew, S.Y., Fernández, I.S., Neumann, C. S., & Kay, R.R. (2011) *Chem. Biol.*, 18, 1252–1260.
- 14) Ghosh, R., Chhabra, A., Phatale, P.A., Samrat, S.K., Sharma, J., Gosain, A., Mohanty, D., Saran, S., & Gokhale, R.S. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 11348–11354.

- 15) Narita, T.B., Koide, K., Morita, N., & Saito, T. (2011) *FEMS Microbiol. Lett.*, 319, 82–87.

齊藤 玉緒
(上智大学理工学部物質生命理工学科)

Biosynthetic mechanism of polyketides in the cellular slime mould

Tamao Saito (Department of Materials and Life Sciences,
Sophia University, 7-1 Kioi-cho, Chiyoda-ku, Tokyo 102-
0094, Japan)