

| | | |
|-----------|-------------------------------|----------------|
| 氏 名 (本籍) | さ さ き 佐 々 木 | たかし 堯 (宮城県) |
| 学 位 の 種 類 | 農 学 博 士 | |
| 学 位 記 番 号 | 農 博 第 6 3 号 | |
| 学位授与年月日 | 昭和 4 4 年 1 0 月 9 日 | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 5 条第 1 項該当 | |
| 研 究 科 専 攻 | 東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 農芸化学専攻 | |
| 学位論文題目 | バシトラシン生合成機構に関する 研究 | |

| | | |
|--------|----------|-----------|
| | (主 査) | |
| 論文審査委員 | 教授 志村 憲助 | 教授 玉利 勤治郎 |
| | | 教授 高橋 甫 |

論文内容要旨

生物体内での蛋白質の生合成機作の研究は、生化学の領域ではもちろん広く自然科学界においても最も重要な研究課題の1つである。蛋白質生合成研究の基本的な問題は、生物の発生、分化、遺伝などの生物現象の過程で、生物にとって目的にかなった特異性を具えた蛋白質分子を生合成しうる機構を究明することであろう。これらの点に関する研究の最近の進歩は目覚しく、DNA→メッセンジャーRNAから始まり、アミノ酸の活性化を経てポリペプチド鎖の生成に至る一連の蛋白質合成系が解明されつつある。

一方、アミノ酸残基2〜3個からなる低分子ペプチド(グルタチオン、カルノシンなど)の生合成に関する研究は、蛋白質生合成の初期反応の解析のモデルとして種々の知見を提供してきた。

しかしながら、蛋白質生合成研究分野において、アミノ酸残基5〜30個からなるポリペプチド(抗菌性ポリペプチド、ペプチド性ホルモンなど)の生合成に関する研究は、ここ数年前まではほとんど未開拓の分野であつた。しかも、このような中間の大きさをもつポリペプチドの生合成反応が蛋白質と同じような生成機作によるものか、あるいは低分子ペプチドにみられるような生成機作であるのか、非常に興味ある問題と考えられた。そのうえ、このようなポリペプチドの大部分は、(1)アミノ酸残基30個以下であり、分子量は800〜4,000位であつて、(2)すでに化学構造が決定しているものが多く、(3)一般に生理活性を有しているので同定しやすいなどの研究材料としての利点をもっている。

このようなポリペプチドの生合成の研究は多くの興味ある問題点を含んでいる。たとえば、(1)ポリペプチド生合成と蛋白質合成との関係、(2)アミノ酸活性化機構、(3)ペプチド結合形成機構、(4)ペプチド伸長様式、(5)中間体の単離、(6)アミノ酸の配列決定因子、(7)ペプチド生成における代謝調節などの諸問題である。したがって、ポリペプチド生合成の研究は、また蛋白質生合成との比較の意味においても重要である。

以上のような観点から、本研究ではポリペプチドとして*Bacillus licheniformis*の生産する抗菌性ポリペプチドであるバントラシンを選び、その生合成機作に関して研究を行った。

このような抗菌性ポリペプチド生合成の研究は、本研究を始めた当時は、相田によるプロトプラスト膜によるバントラシン様物質の生成、Katzらの生菌を用いてのアクチノマイシンの生合成、倉橋らのプロトプラストを用いてのグラミジジンSの生合成などの数例にすぎず、しかもその詳細な生合成機作に関してはほとんど未解決のままであつた。

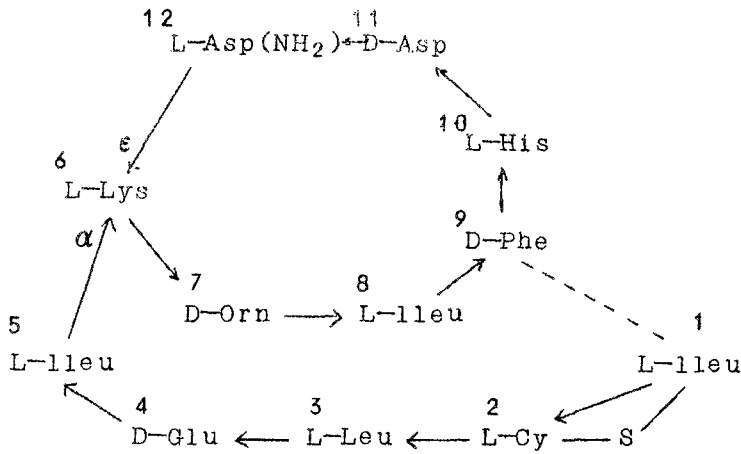
本論文では前記の多くの問題の中から、最も基本的と考えられる次の問題に研究の焦点をしぼつた。

- (1) バントラシン生合成の無細胞系の調製とバントラシン合成の基本的反応条件の検討。

〔2〕 バットラシン生成と蛋白質合成との関係

〔3〕 バットラシン合成に際してのペプチド鎖の伸長様式

バットラシンは第1図にも示したようにアミノ酸12個よりなる環状構造をもったペプチドで通常の蛋白質には含まれていないD-アミノ酸を含んでいる。



第1図 バットラシンAの化学構造式

〔1〕 バットラシン生成の無細胞系の調製とバットラシン合成の基本的反応条件の検討

生菌を用いてのバットラシン生成機作研究には限度があり、バットラシン合成の基本的な反応条件やペプチドの伸長様式などの解析には無細胞系を用いる必要がある。したがって、活性の高い再現性のある無細胞系を得ることが本研究の成否を決めるカギとなる。無細胞系を用いて抗菌性ペプチドを作らせる試みは以前から行われてきたが、種々困難な点が多く本研究を始めた当時は、バットラシンをはじめ他の抗菌性ポリペプチドでも成功していなかった。

このような状況のもとで、バットラシン合成能のある無細胞系の調製法を種々検討した結果、活性のある無細胞系の調製に始めて成功した。すなわち、バットラシン生産菌 *B. licheniformis* の菌体のリゾチーム処理により得たプロトプラストを、DNase の存在下で低張下に破壊し、20,000 × g, 15分遠心して得られる上清区分に放射性アミノ酸をバットラシンへとり込む活性が認められた。

この区分を用いて¹⁴C-L-イソロイシンのバントラシンへのとり込みの基本的反応条件について検討した。バントラシン合成にはバントラシン構成アミノ酸およびATPが必要であり(第1表),その至適濃度は各々5 μmolesおよび30 μmolesであった。さらに上清区分の熱処理により失活し,至適pHは7.0附近に認められた。また20,000×g上清区分にはL-およびD-アミノ酸に対するATP~Pi交換活性は認められないが,L-アミノ酸に対するATP~PPi交換活性があり,AMPまたはPPiによるバントラシン合成の阻害が認められた(第2表)。これらの結果は,バントラシン合成がATP \rightleftharpoons AMP+PPiの反応と共役していることを示すものと考えられる。

第1表 ¹⁴C-L-イソロイシンのバントラシンへのとり込み
に対するATPおよびアミノ酸の要求性

| 系 | バントラシン |
|------------------------------|----------------------|
| 完全系 (0分) | 160 ^{c p m} |
| '' (60分) | 1,357 |
| -アミノ酸 | 395 |
| -ATP | 472 |
| -クレアチン-リン酸,クレアチンキナーゼ | 1,001 |
| -ATP,クレアチン-リン酸, クレアチンキナーゼ | 231 |
| 100℃,5分熱処理 | 181 |

完全系:アミノ酸(バントラシン構成アミノ酸)各5 μmoles

ATP 30 μmoles,クレアチン-リン酸5 μmoles,

クレアチンキナーゼ 50 μg, MgCl₂ 20 μmoles,

¹⁴C-L-イソロイシン 0.5 μC, 上清区分5~7mg

全容 2.0 ml, pH 7.0, 37℃, 60分

第2表 ^{14}C -L-イソロイシンのバシトラシンへのとり込み
におけるAMP, ADP, PPIおよびPi添加の影響

| 系 | バシトラシン |
|------------------------|-----------|
| 完全系 | 2,103 cpm |
| +AMP (7.0 μ moles) | 45 |
| +ADP (7.0 μ moles) | 2,076 |
| +PPI (7.0 μ moles) | 1,077 |
| +Pi (7.0 μ moles) | 2,100 |

[2] バシトラシン生成と蛋白質合成との関係

バシトラシンの生成様式として次の3つの可能性が考えられる。

- 蛋白質合成にみられるようなtRNA, メッセンジャーRNAおよびリボゾームの関与で生成する。
- 低分子ペプチドにみられるような特異的な酵素により生成する。
- 蛋白質などの高分子ペプチドの特異的な分解により生成する。

これらの問題を明らかにする目的で、生菌および無細胞系(20,000 \times g上清区分)を用いて検討した。

生育菌において、放射性アミノ酸のバシトラシンへのとり込みが、リボゾームにおけるアミノ酸縮合の過程を阻害すると知られているクロラムフェニコールによつて阻害されず、さらにtRNA・アミノ酸のリボゾームへの転移を阻害するピユーロマイシンによつても阻害は認められなかった(第3表)。このことは、バシトラシン生成過程には蛋白質合成で知られているようなtRNAの関与するペプチド形成反応は関与していないと考えられる。また、DNAに対応したメッセンジャーRNA合成を阻害するアクチノマイシンによつても、バシトラシン合成阻害は認められないことは(第4表)、バシトラシン合成反応にメッセンジャーRNAの合成が関与していないことを示している。さらに、D-フェニルアラニンによつてバシトラシン合成のみが特異的に阻害される現象も、蛋白質合成とは異なる様式であることを示唆するものであろう。

無細胞系においても、蛋白質合成阻害剤およびRNaseによつても阻害されず(第5表, 第6表)、さらにtRNA・アミノ酸のバシトラシンへの転移も認められないことは、tRNA,

第3表 バシトラシンおよび菌体蛋白質区分への放射性アミノ酸の
とり込みに対する種々の阻害剤の影響

| 放射性アミノ酸 | 阻 害 剤 | バシトラシン | 蛋 白 質 |
|---------------------------|------------|----------------------|--------------------------|
| ¹⁴ C-L-イソロイシン | ————— | 8,048 ^{cpm} | 33,840 ^{cpm/mg} |
| | クロラムフェニコール | 16,296 | 700 |
| | ビュロマイシン | 10,926 | 16,800 |
| | アクチノマイシン | 18,832 | 3,700 |
| | ペニシリン | 9,901 | 31,110 |
| ³⁵ S-L-シスチン | ————— | 1,800 | 4,280 |
| | クロラムフェニコール | 3,738 | 540 |
| | ビュロマイシン | 2,919 | 2,015 |
| ¹⁴ C-L-アスパラギン酸 | ————— | 2,368 | 16,880 |
| | クロラムフェニコール | 3,280 | 2,440 |
| ¹⁴ C-DL-オルニチン | ————— | 1,981 | 4,286 |
| | クロラムフェニコール | 2,870 | 75 |
| ¹⁴ C-DL-グルタミン酸 | ————— | 2,176 | 28,240 |
| | クロラムフェニコール | 3,808 | 8,480 |
| ¹⁴ C-DL-リジン | ————— | 5,380 | 23,150 |
| | クロラムフェニコール | 8,570 | 980 |

培養液 (O.D. 0.60) 5 ml, 放射性アミノ酸 0.5 μ c, 阻害剤濃度 100 μ g/ml

第4表 バシトラシン, 蛋白質およびRNAへの¹⁴C-L-イソロイシンまたは¹⁴C-オロチン酸のとり込みに対するアクチノマイシンの影響

| アクチノマイシン | ¹⁴ C-L-イソロイシン | | ¹⁴ C-オロチン酸 |
|------------|--------------------------|--------|-----------------------|
| | バシトラシン | 蛋白質 | R N A |
| μ g/ml | cpm | cpm/mg | cpm |
| 0 | 16,458 | 82,000 | 185,600 |
| 50 | 18,000 | 3,488 | 675 |
| 100 | 19,116 | 2,500 | 247 |

培養液 (O.D. 0.61) 5 ml, ¹⁴C-L-イソロイシン 1.0 μ c, または¹⁴C-オロチン酸 1.0 μ c, 60分培養

第5表 無細胞系における¹⁴C-L-イソロイシンのバシトラシンへの
とり込みに対する蛋白質合成阻害剤の影響

| | | バシトラシン |
|-------------|------------|---------|
| 完 全 系 | 0分 | 125 cpm |
| | 60 | 2,593 |
| +ピニューロマイシン | 50 μ g | 2,729 |
| | 200 | 2,426 |
| | 500 | 2,390 |
| +クロラムフェニコール | 50 μ g | 2,667 |
| | 200 | 2,485 |
| | 500 | 2,579 |

第6表 無細胞系における¹⁴C-L-イソロイシンのバシトラシンへの
とり込みに対するRNaseおよびDNaseの影響

| | | バシトラシン |
|--------|------------|---------|
| 完 全 系 | 0分 | 179 cpm |
| | 60 | 2,264 |
| +RNase | 20 μ g | 2,265 |
| | 100 | 2,219 |
| +DNase | 20 μ g | 2,291 |
| | 100 | 2,189 |

メッセンジャーRNAなどのような核酸がバシトラシン合成反応に関与しないことを示している。

また、 $20,000 \times g$ 上清区分のバシトラシン合成活性が $105,000 \times g$ 上清区分に回収されたことは(第7表)、いわゆるリボゾームのような顆粒区分もバシトラシン合成に関与しないことを示している。

これらのことから前記の(a)の可能性は否定しうる。

さらに、無細胞系において加えた放射性バシトラシン構成アミノ酸のバシトラシンへのとり込

みが認められることから、蛋白質の分解により生成するという(c)の考えも否定される。

このような結果は、バシトラシンの合成様式が一連の特異的な酵素(系)によつて生成することを示しており、アミノ酸の配列の特異性は酵素(系)によつて規定されるものと推定される。

第7表 50,000 × g および 105,000 × g 上清区分による ¹⁴C-L-イソロイシンのバシトラシンへのとり込み

| 区 分 | 蛋 白 量 | バシトラシン |
|-------------------------|-------------------|----------------------|
| 20,000 × g 上清 | 9.3 ^{mg} | 4,319 ^{cpm} |
| 50,000 × g 上清 | 8.1 | 4,112 |
| 105,000 × g 上清 | 7.9 | 4,537 |
| 105,000 × g 沈殿 | 2.1 | 138 |
| 105,000 × g 上清 + 沈 殿 | 10.0 | 4,359 |

[3] バシトラシン生合成に際してのペプチドの伸長様式

バシトラシンは、環状および鎖状ペプチド部分を有し、バシトラシン生合成研究のためにはそれらの伸長様式を明らかにする必要がある。本研究では、バシトラシン分子中にイソロイシン残基が3分子含まれていることに着目して、その Labelling Pattern から伸長様式を検討した。

¹⁴C-L-イソロイシンをとり込んだバシトラシンの Labelling Pattern を調べるために、バシトラシン分子中の3つのイソロイシン残基の分離方法を確立した。すなわち、N-末端イソロイシンはバシトラシンを直接DNF化後加水分解してDNF-N-イソロイシンを得た(N-末端イソロイシン)。N-末端イソロイシンから数えて5番目および8番目のイソロイシンは(第1図参照)、バシトラシンを部分加水分解(11N HCl, 80℃, 40時間)して得られた[イソロイシル-リジルーアスパラギン酸]および[イソロイシル-フェニルアラニン]をDNF化した後、常法によりDNF-5-イソロイシン(N-末端から5番目)およびDNF-8-イソロイシン(N-末端から8番目)を得た。

¹⁴C-L-イソロイシンをとり込んだバシトラシン中の3つのイソロイシン残基を上記の方法

により調製し、各イソロイシンのとり込み量を求めると、N-イソロイシン<5-イソロイシン<8-イソロイシンの順に高くなる傾向が認められた。これらのことから、バシトランシンはN-末端からC-末端へ伸びていくものと推定した(第8表)。

第8表 バシトランシン中の3つのイソロイシン残基への¹⁴C-L-イソロイシンのとり込み

| 実験 I | 反応時間(分) | ¹⁴ C-L-イソロイシンのとり込み量(10 ⁻² μμmole) | | |
|------|---------|---|----------|----------|
| | | N-イソロイシン | 5-イソロイシン | 8-イソロイシン |
| | 0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 15 | 3.0 | 20.0 | — |
| | 35 | 12.4 | 43.5 | 53.1 |

[4] 総括

以上、*Bacillus licheniformis* の生産する抗菌性ポリペプチドであるバシトランシンの生合成機作を明らかにする目的で、バシトランシン合成の無細胞系の確立、その基本的反応条件、バシトランシン合成と蛋白質合成との関係、伸長様式について研究した。

その結果、放射性アミノ酸をバシトランシンへとり込む無細胞系をはじめて確立することが出来た。この系を用いて、バシトランシン合成は蛋白質合成とは異なる機作であり、一連の特異的な酵素(系)が関与し、ATP \rightleftharpoons AMP+PPiの反応と共役してアミノ酸が活性化され、ついでペプチド結合が生成しバシトランシンになることを明らかにした。その際、ペプチドの伸長方向はN-末端からC-末端へ伸びていき、アミノ酸の配列の特異性は酵素(系)によって規定されるものと推定した。

審査結果の要旨

抗菌性ポリペプチド、ペプチド性ホルモンなど、生理活性を有するポリペプチドは数多く知られているが、その生合成機作については、本研究科が開始された1961年当時は、ほとんど明らかにされていなかった。

本研究は、このような生理活性ペプチドの生成機構を明らかにする目的で、*Bacillus licheniformis* の生産するバシトランシンを研究対象としてえらび、主として無細胞系を用いて研究を行った。

著者は、*B. licheniformis* の菌体のリゾチーム処理により得たプロトプラストを、DNaseの存在下で低張下に破壊し、20,000xg 遠心した上清区分に、バシトランシン合成能を有する蛋白質画分を得、無細胞系の調製にはじめて成功した。この系でのバシトランシン合成には、バシトランシン構成アミノ酸およびATPが必要であり、至適pHは7.0、100℃、5分熱処理により完全に失活した。本画分はL-アミノ酸に対するATP~PPi交換活性があり、AMPまたはPPiによるバシトランシン合成の阻害が認められた。これらの結果から、バシトランシン合成は、 $ATP \leftrightarrow AMP + PPi$ の反応と共役していることを推定した。

ついで著者は、バシトランシン生合成と蛋白合成との関係について検討した。生育菌において、クロラムフェニコールやピュエロマイシンによって蛋白合成が著しく阻害される条件下において、バシトランシンの合成は全く阻害されない許りでなく、かえって促進される傾向さえ認められた。またアクチノマイシンによっても、バシトランシン合成阻害は認められなかった。無細胞系においても、蛋白合成阻害剤およびRNaseによる阻害は見られなかった。これらの多くの実験結果から、バシトランシン合成にはtRNAやmRNAは関与せず、通常の蛋白合成とは全く異なる機作により合成されることを結論した。

バシトランシンは環状および鎖状ペプチド部分を有するが、それらの伸長様式を明らかにするために、バシトランシン分子中にイソロイシン残基が3分子含まれていることに着目して、 ^{14}C -L-イソロイシンを無細胞系でバシトランシン分子中にとりこませ、放射性バシトランシン中のLa. bell-ing Patternの時間経過を比較した。その結果、バシトランシンのペプチドは、N-末端基アミノ酸よりC-末端へ向って伸びていくものと推定した。

以上、本研究では、*Bacillus licheniformis*よりバシトランシンを合成する無細胞系をはじめて確立し、この系を用いて、バシトランシン合成は蛋白質合成と異なる機作で行われ、一連の特異的な酵素系が関与し、 $ATP \leftrightarrow AMP + PPi$ の反応と共軛してペプチド結合の合成が行われることを明らかにし、生理活性ペプチドの生合成機構研究の端緒を開いた。

本研究は、生物化学の分野の基礎として重要であるのみならず、応用面においても寄与する処大きく、農学博士の学位を授与するに十分な価値があるものと認める。