

## Cyclic di-GMP量産化技術の確立

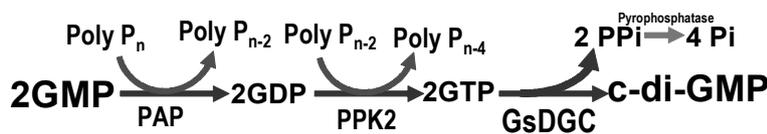
### Practical enzymatic production of cyclic di-GMP

○田辺 香緒里、石毛 和也 (ヤマサ醤油・医薬化成品)

○Kaori Tanabe, Kazuya Ishige (Biochemicals Division, Yamasa Corporation)

【目的】 Cyclic di-GMP (以下cdGMP) は微生物界で広く用いられる重要なシグナル伝達分子である。微生物のバイオフィーム形成や接着、運動性、病原性の発現などに深く関与し、コレラ菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌などの病原菌のバイオフィーム形成を調節することで、薬剤耐性化/感染能力の低下をもたらす生理活性物質として期待されている。また、最近、哺乳動物に対する自然免疫活性化作用が明らかとなり、ウイルス性疾患の予防・治療薬、抗がん剤としての開発可能性が期待されている。一方で、その実用的な酵素合成法は確立されておらず、本研究において、cdGMPの量産化に向けた酵素合成技術の構築を試みた。

【方法及び結果】 cdGMPは、diguanylate cyclase (以下DGC) の触媒作用により、2分子のGTPより2段階の酵素反応により酵素合成され、当該酵素のホモログは様々な細菌ゲノム中に多数保存されている。報告者らは、大腸菌や枯草菌、中等度好熱菌*Geobacillus stearothermophilus*由来の複数の当該酵素ホモログの中から、最もcdGMP合成特性に優れたDGCを選出した (GsDGC)。また、*Acinetobacter johnsonii*由来ポリリン酸: AMPホスホトランスフェラーゼ (PAP) と緑膿菌由来ポリリン酸依存的ヌクレオシド二リン酸キナーゼ (PPK2) を組み合わせることにより、ポリリン酸をドナーとしたGMPからの実用的なGTP供給系を構築した。これをGsDGCと共役させることで、安価なGMPからの高効率なcdGMP酵素合成系を構築した (下図)。このcdGMP酵素合成系により、高



濃度での効率的なcdGMP酵素合成を実現した。しかしながら、GsDGCの酵素生産性は低く、これがcdGMPの量産化に大きな障壁となった。

DGCはその酵素活性が様々なメカニズムで制御されることが知られており、GsDGCも例外でなく、その酵素活性を効率的に引き出してやるのがcdGMP量産化技術確立に向けた鍵となる。一般的に、DGCはC末端側に触媒ドメインを有し、N末端側には活性制御ドメインを有する。この活性制御ドメインの外部シグナルに応じた二量体化がDGC活性発現に必須である。そこで、GsDGC触媒ドメインを様々な二量体化能を有するタンパク質/ドメインと融合化することで、その強制的な二量体化を図った。その結果、パン酵母由来無機ピロフォスファターゼとの融合化により、活性発現を飛躍的に効率化することに成功した。さらに、単アミノ酸変異導入により比活性向上にも成功し、当該人工機能改変DGCを上記のポリリン酸をドナーとしたGTP供給系と共役させることで、cdGMPの量産化が可能となった。