

博士論文

放線菌のメロテルペノイド生合成に見出された
新規窒素代謝に関する研究

野口 智弘

令和3年度 博士論文

放線菌のメロテルペノイド生合成に見出された
新規窒素代謝に関する研究

東京大学大学院
農学生命科学研究科 応用生命工学専攻
分子育種学研究室

平成31年度進学

野口 智弘

指導教員

葛山 智久

略語一覽

化合物名

8-AF	8-Amino-flaviolin
Acetyl CoA	Acetyl coenzyme A
ATP	Adenosine triphosphate
Apr	Apramycin
Ar	Argon
Cyt	Cytochrome
DTT	Dithiothreitol
FAD	Flavin adenine dinucleotide
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
kan	Kanamycin
3-MAF	3-Methyl-8-amino-flaviolin
MeOH	Methanol
metRS	Methionine-tRNA synthetase
3-MF	3-Methylflaviolin
MMF	2-Methoxy-3-methylflaviolin
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
ODS	Octadecylsilane
PHN	1,2,4,5,7-Pentahydroxynaphthalene
PLP	Pyridoxal phosphate
PND	2,4,5,7,8-pentahydroxynaphthalene-1-diazonium
SAM	S-Adenosylmethionine
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TFA	Trifluoroacetic acid
THN	1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalene
TIC	Total ion chromatogram
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
XIC	Extracted ion chromatogram

菌属名略称

<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
<i>S.</i>	<i>Streptomyces</i>

その他

ESI	electrospray ionization
HPLC	high performance liquid chromatography
LC/MS	liquid chromatography- mass spectrometer
MS	mass spectrometer
NMR	nuclear magnetic resonance
OD	optical density
ORF	open reading frame
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
Rt.	retention time
Std.	reference standard

目次

第0章	序論	7
第1章	二機能性 PLP 依存性酵素の解析	28
第1節	NphE の <i>in vitro</i> 反応解析	29
第1項	NphE 反応における反応液の呈色	29
第2項	PMP-mompain adduct の検出	30
第3項	DFT 計算による PMP-mompain adduct の吸光予測	32
第4項	L-Glu 依存的な PMP の形成	33
第5項	NphE 反応における酸素の消費	35
第6項	NphE の逆反応解析	37
第2節	NphE の結晶化	39
第1項	NphE のゲルろ過クロマトグラフィー精製	39
第2項	NphE の結晶化スクリーニング	40
第3節	AlphaFold v2.0 による NphE の構造予測と MD 計算	41
第1項	AlphaFold v2.0 による NphE の構造予測	41
第2項	MD 計算による NphE と PMP-mompain adduct の複合体構造モデルの構築	43
第3項	NphE 変異体の活性評価	47
第4項	NphE 変異体の活性測定	49
第4節	考察	50
第2章	還元的脱アミノ化機構の解明とその生理的意義	54
第1節	Fur5 の異種放線菌 <i>Streptomyces albus</i> での発現と精製	58
第2節	Fur5 の機能解析	59
第1項	3-MAF および 8-AF を基質にした Fur5 の <i>in vitro</i> 反応	59
第2項	¹⁵ N 標識した亜硝酸を用いた Fur5 の反応	62
第3項	ジアゾ化合物の経時的な分解	64
第4項	Fur5 による ATP の消費	66
第3節	Fur6 の機能解析と還元的脱アミノ化	69
第1項	Flaviolin を基質とした Fur6 による反応	69
第2項	8-AF を基質とした Fur5, Fur6 による連続反応	71
第3項	限外濾過を用いた Fur5,6 の連続反応	73
第4項	Fur5,6 連続反応と還元剤	75
第5項	還元的脱アミノ化における還元酵素の関与の検証	77
第6項	還元的脱アミノ化で発生する窒素ガスの GC-MS による検出	80

第4節	Fur6の結晶構造解析.....	82
第1項	Fur6のゲル濾過クロマトグラフィーによる精製と結晶化スクリーニング..	82
第2項	セレノメチオニン置換体を用いたFur6の構造決定.....	84
第3項	Fur6の基質複合体構造の予測.....	86
第4項	Fur6の変異体作成.....	88
第5項	Fur6変異体の活性測定.....	90
第5節	Fur4の機能解析.....	92
第6節	Fur7の機能解析.....	94
第7節	Fur21の機能解析.....	96
第1項	Fur21のin vitro反応解析.....	96
第2項	Fur21のSAMやSAHの依存性の検証.....	99
第3項	Fur21のゲル濾過クロマトグラフィー精製.....	101
第4項	Fur21の結晶化スクリーニング.....	101
第8節	Furaquinocinの還元的生合成の生理的意義.....	102
第9節	考察.....	105
第3章	<i>Streptomyces antibioticus</i> B-546におけるFur5ホモログと共脱窒.....	115
第1節	<i>Streptomyces antibioticus</i> B-834のゲノムの調製と解読.....	116
第2節	一回交叉法によるFur5ホモログの破壊.....	117
第3節	Fur5ホモログ破壊株における共脱窒.....	119
第4節	考察.....	119
第4章	Naphterpinの生合成に関する研究.....	120
第1節	Naphterpin生合成の転位反応の解析.....	122
第1項	転位反応におけるVHPOの関与の検証(修士課程).....	122
第2項	転位反応に関与する酵素の予測.....	126
第3項	nphOの破壊株作製.....	128
第4項	nphO破壊株の生産物分析.....	130
第5項	nphGの破壊株の作成.....	131
第6項	nphG破壊株の培養液の生産物分析.....	133
第2節	Naphterpinの6位のメチル化機構の解析.....	134
第1項	nphJ破壊株の作成.....	134
第2項	nphJの破壊株の培養液の生産物分析.....	136
第3項	nphJ破壊株培養液抽出物とNphJによるin vitro反応.....	138
第3節	Naphterpin生合成の生理的意義.....	140
第1項	電子メディエーターとしてのNaphterpin.....	140
第2項	Naphterpinの細胞内局在.....	142

第4節 考察.....	144
第5章 総括.....	147
実験項.....	155
参考文献.....	166
謝辞.....	175

第0章 序論

放線菌の生産するメロテルペノイド

メロテルペノイドはテルペノイド骨格が他の骨格と融合した化合物の総称である^{1,2,3}。メロテルペノイドには抗腫瘍、抗菌、抗酸化活性など様々な生理活性を有する化合物が数多く含まれる。

放線菌により生産されるメロテルペノイドとして、*Streptomyces* sp. KO-3988 や *Streptomyces reveromyceticus* SN-593 により生産される抗腫瘍活性物質 Furaquinocin^{4,5}をはじめとして、*Streptomyces* sp. CL190 により生産される Naphterpin⁶、*Streptomyces cinnamomensis* DSM 1042 により生産される furanonaphthoquinone⁷、*Streptomyces* sp. CNQ525 と *Streptomyces aculeolatus* により生産される Napyradiomycin⁸、*Streptomyces* sp. CNH-189 により生産される Merochlorin A⁹などがこれまでに報告されている (図 0-1)。これらの化合物は、保存されたポリケタイド骨格にテルペノイド骨格が融合し、さらに環化することで構造多様性が生み出されているという特徴がある。

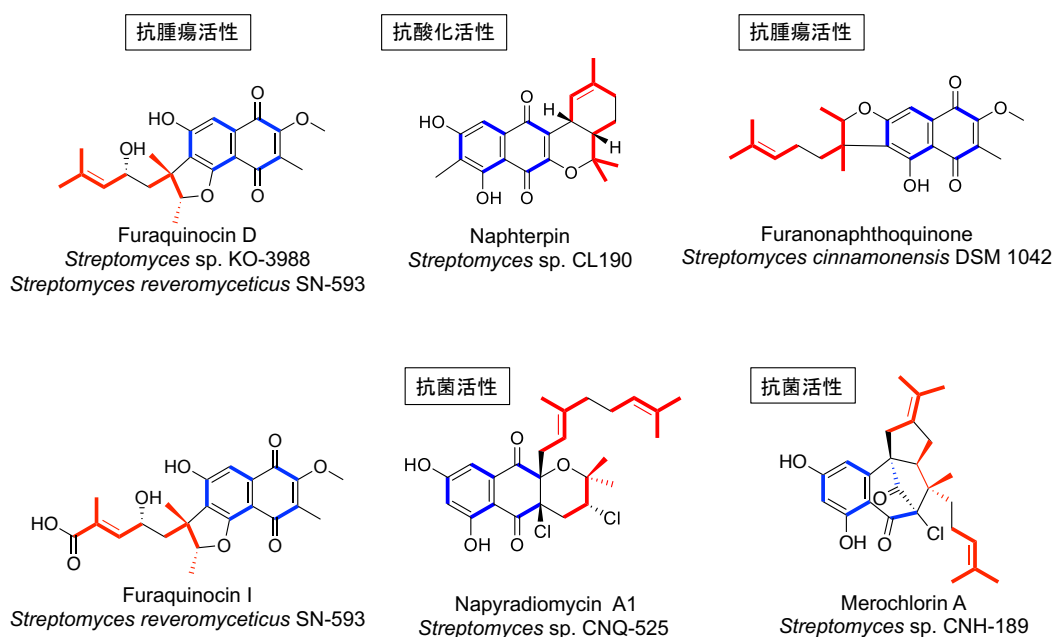


図 0-1 放線菌の生産するメロテルペノイド

保存されたポリケタイド骨格を青で、保存されたテルペノイド骨格を赤で示した。それぞれの生理活性が明らかになっている化合物には、化合物の上にもその生物活性を示している。

Furaquinocin、Naphterpin、Napyradiomycin、Furanonaphthoquinone、Merochlorin の生合成遺伝子クラスターは既に報告されている^{9,10,11,12,13}(図 0-2)。最終産物の構造多様性にも関わらず、これらの遺伝子クラスターには類似した遺伝子が保存されている。このことから、これらのメロテルペノイドには共通の生合成機構が存在していると推定できる

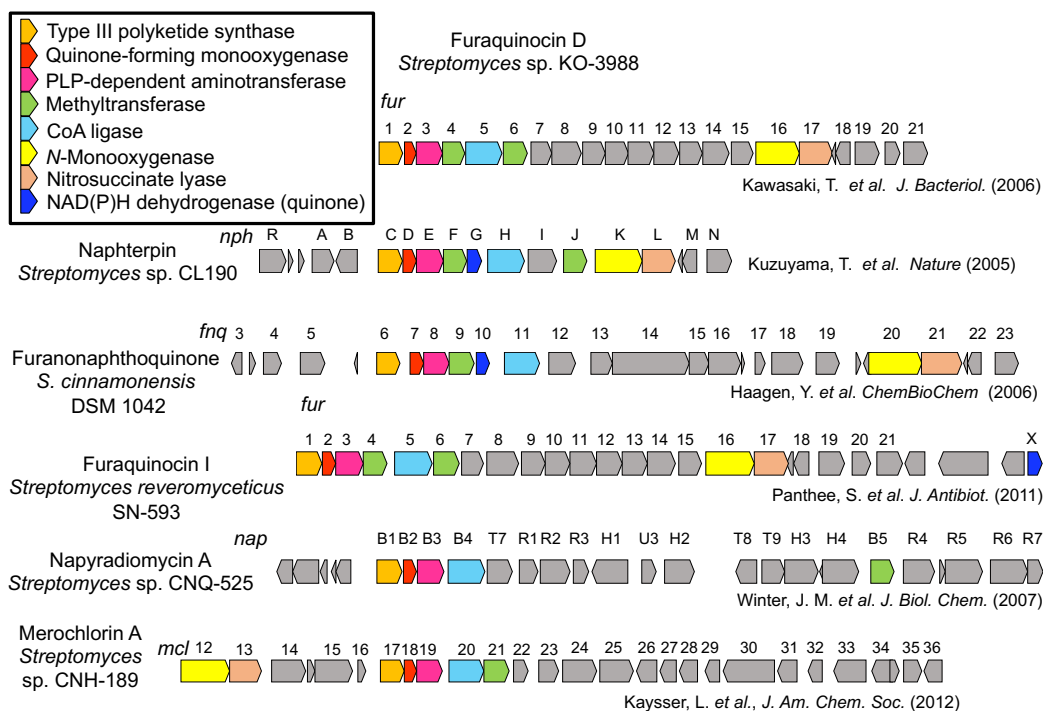


図 0-2 放線菌の生産するメロテルペノイドの生合成遺伝子クラスター

色をつけた遺伝子群がそれぞれのメロテルペノイド遺伝子クラスター間で保存されていることから、メロテルペノイド共通の生合成機構が存在することが示唆される。

中でも初発段階を担う 3 つの酵素の生成物に関しては解析がなされている¹⁴。すなわち 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalene (THN)合成酵素 Fur1 や NphC によって THN まで、モノオキシゲナーゼである Fur2 や NphD によって Mompain まで、ピリドキサルリン酸 (PLP)依存性酵素 Fur3 や NphE によって 8-Aminoflaviolin (8-AF)まで生合成されることが明らかとなっていた¹⁴(図 0-3)。しかし、最終段階の Mompain から 8-AF までの変換には二電子の酸化が必要な特殊なアミノ基転移であるにも関わらず、その反応機構の詳細な解析は行われてこなかった。我々はこの特殊なアミノ基転移反応を「酸化的アミノ基転移 (oxidative transamination)」と名付け、その詳細なメカニズムを明らかにすることを目的とした。

一方で興味深いことに、8-AF は Furaquinocin や Naphterpin の生合成中間体であることが当研究室の磯貝によって確かめられているにもかかわらず (磯貝章太博士論文,2012)、いずれの最終産物にも 8 位のアミノ基が存在しない (図 0-3)。一般的に生体内でみられる脱

アミノ化としては PLP 依存性アミノ基転移酵素によるアミノ基転移反応、グルタミン酸デヒドロゲナーゼによる酸化的脱アミノ化反応¹⁵、補酵素 Q 生合成におけるフラビン酵素による酸化的脱アミノ化反応¹⁶などが知られているが、いずれの場合もアミノ基が脱離した後は酸素原子に置換されているという点で共通している (図 0-4)。最終産物のメロテルペノイドではアミノ基が水素原子に置換されていることから、8-AF のアミノ基の脱離反応はこれらとは様式が異なると予想できる。このようにアミノ基が水素原子に置換される形で起こる還元的脱アミノ化反応を担う酵素はほとんど報告がなく、興味深い研究対象である。そこで、放線菌の生産するメロテルペノイドに普遍的に存在する新奇脱アミノ化機構を解明することも目的とした。

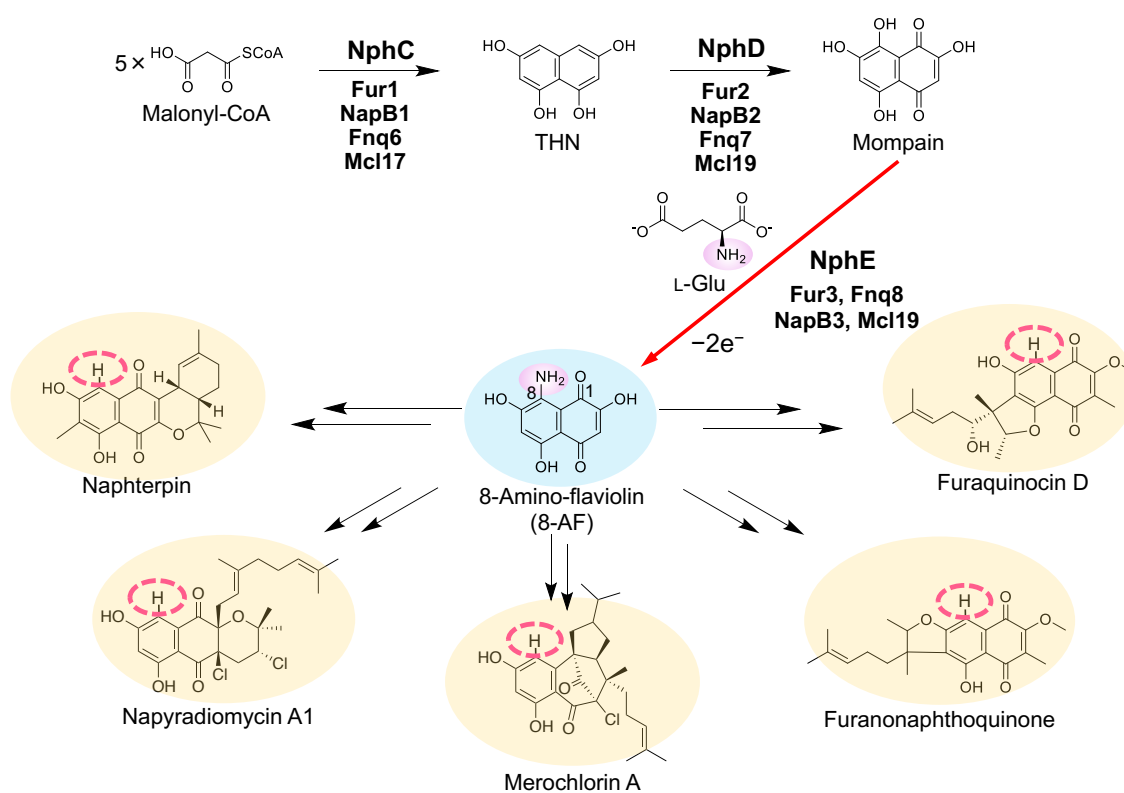
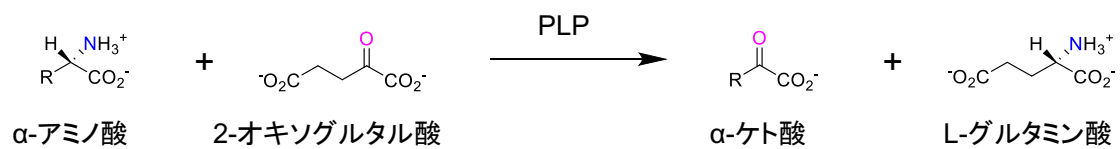


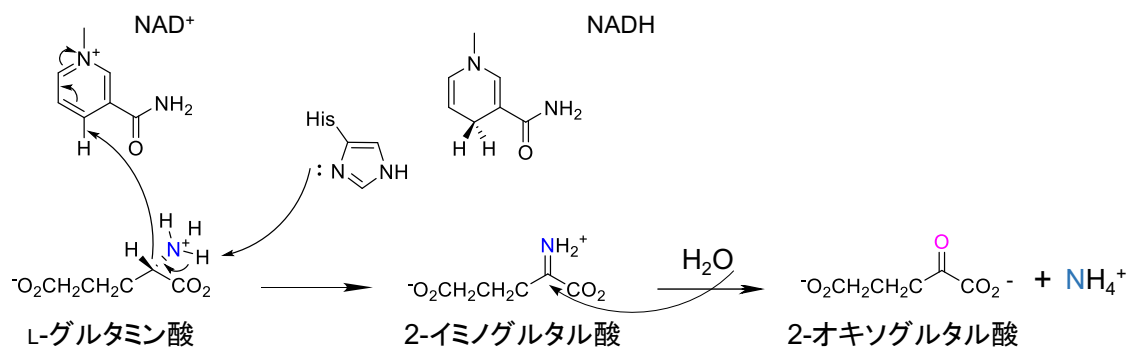
図 0-3 放線菌のメロテルペノイド生合成に共通の「酸化的アミノ基転移」による 8-AF の生合成と「還元的脱アミノ化」

Mompain のヒドロキシ基が 8-AF のアミノ基に置換される二電子酸化が必要な「酸化的アミノ基転移」と、8-AF のアミノ基が最終産物である各種メロテルペノイドの水素原子に置換される「還元的脱アミノ化」の例を示した。

(A)



(B)



(C)

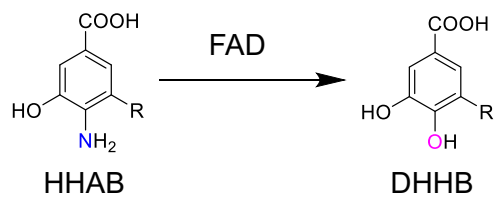


図 0-4 生体内における一般的な脱アミノ化機構

(A) PLP 依存アミノ転移酵素によるアミノ基転移反応の代表例. (B) グルタミン酸デヒドロゲナーゼによる酸化的脱アミノ化反応. (C) フラビン酵素 Coq6 による酸化的脱アミノ化反応

PLP 依存性酵素

活性型ビタミン B₆ であるピリドキサール 5'-リン酸 (PLP) は様々な酵素の補欠分子族の一つで、アミノ基転移、クライゼン縮合、β-脱離、γ-脱離、異性化、脱炭酸、アルドール反応など、多様な反応に用いられる^{17,18}。このような反応多様性にもかかわらず、PLP 依存性酵素の初発段階の反応は共通して内部アルジミン (internal aldimine) から外部アルジミン (external aldimine) への変換である。さらにプロトン (アミノ基転移、β-脱離、異性化などの場合) やカルボキシ基 (脱炭酸反応の場合) や側鎖 (レトロアルドール開裂などの場合) の脱離によってキノノイド中間体 (quinonoid intermediate) へと変換される (図 0-5)。多くの場合、PLP は電子シンクとして働く。

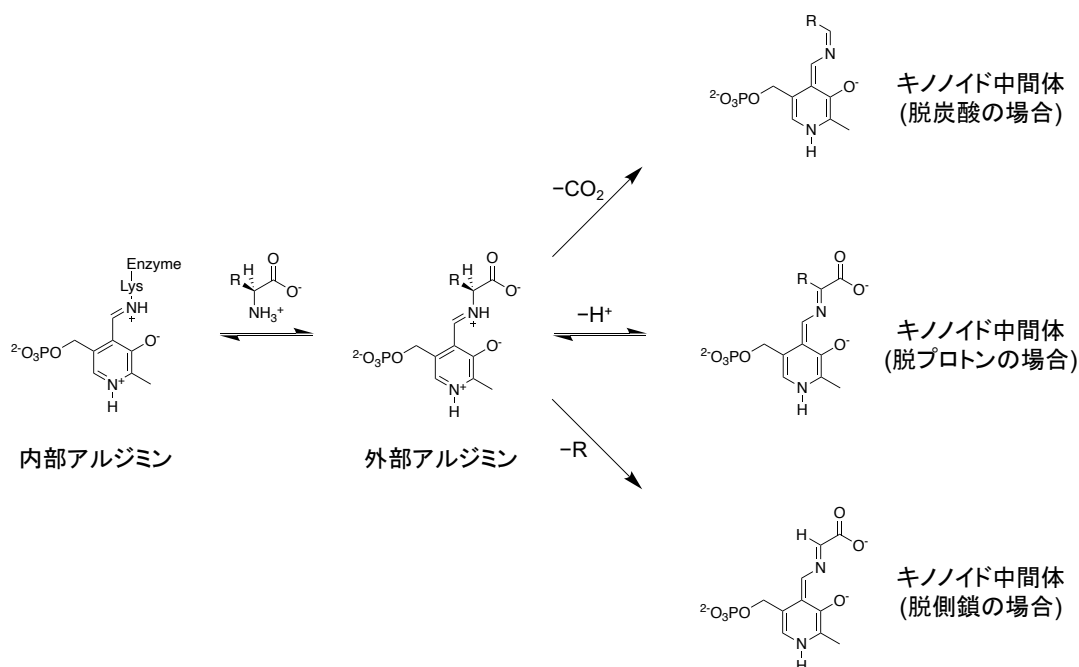
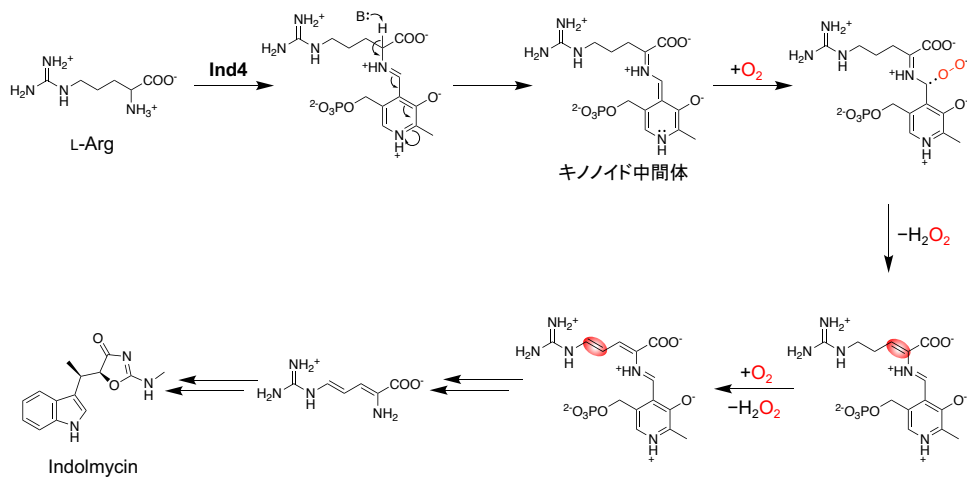


図 0-5 PLP 依存性酵素の初発段階の反応

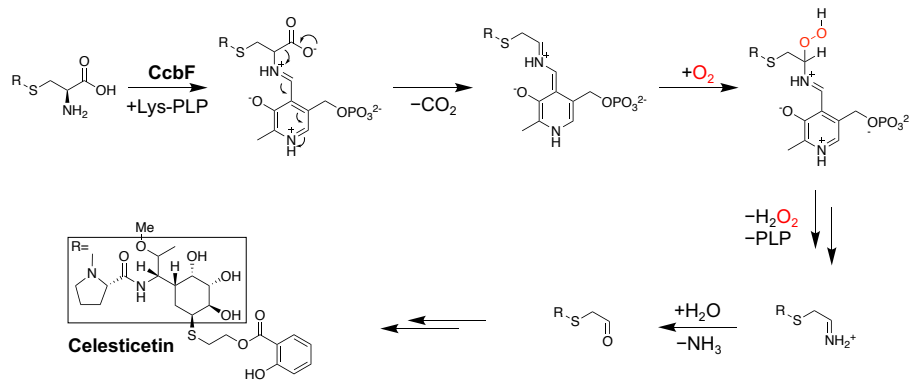
内部アルジミンから外部アルジミンへの変換反応は共通であるが、その後のキノノイド中間体へ至る反応において多様性がある。

PLP 依存性酵素はすべての酵素反応のうち 4%程度を占めるほど巨大な酵素グループである¹⁹が、酸素を用いた酸化反応を行うことのできる酵素が二次代謝の生合成において発見されたのは最近のことである (図 0-6)²⁰。例えば Indolmycin 生合成酵素 Ind4 は酸素を用いて L-Arg を酸化して二重結合を導入し、その過程で酸素を過酸化水素へと変換する。Celesticetin 生合成酵素 CcbF は酸素を用いた Celesticetin 前駆体の酸化的脱炭酸反応と脱アミノ化反応を触媒し、酸素は過酸化水素へと変換される。Capuramycin 生合成酵素 Cap15 は酸素を用いた (5'S,6'R)-5'-C-glycyluridine (GlyU) の酸化を触媒する。

(A)



(B)



(C)

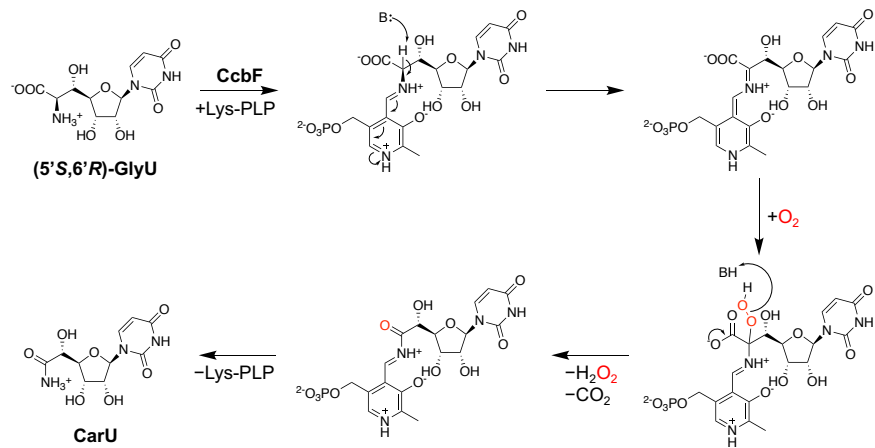


図 0-6 酸素を用いる PLP 依存性酵素の反応機構

(A) Ind4 の触媒する酸化反応の反応機構. (B) CcbF の触媒する脱炭酸と続く脱アミノ化反応の反応機構.

(C) Cap15 の触媒する酸化的脱炭酸反応の反応機構

これら酸素を用いる PLP 依存性酵素の発見にもかかわらず、アミノ基転移と酸素による酸化の両方を触媒する酵素は見つかっていなかった。一方で、PLP 依存性アミノ基転移酵素の中でも酸素による酸化を触媒する酵素は知られていない。図 0-7 に示したように PLP 依存性アミノ基転移酵素は二段階の反応によってアミノ基転移を触媒する。まず一段階目の半反応において、アミノ基供与体 (Amine donor) が酵素ポケット内の Lys 残基に結合した PLP (Internal aldimine) のイミンとの間でアミノ基交換を起こし、ピリドキサミン 5'-リン酸 (PMP) が生成する。二段階目の半反応において PMP はアミノ基受容体 (Amine acceptor) と脱水縮合し、キノイド中間体を経て新たなアミン産物 (Amine product) を生成する。

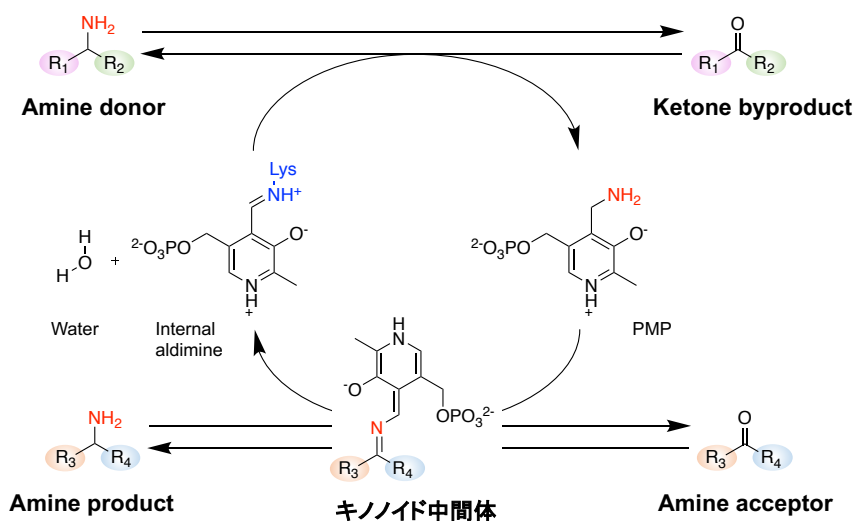


図 0-7 PLP 依存性酵素が触媒する一般的なアミノ基転移反応機構

Amine donor のアミノ基が internal aldimine へと一旦受け渡されることで PMP が生成し、PMP のアミノ基が Amine acceptor に受け渡されることで見かけ上の Amine donor から Amine product への変換が起こる。

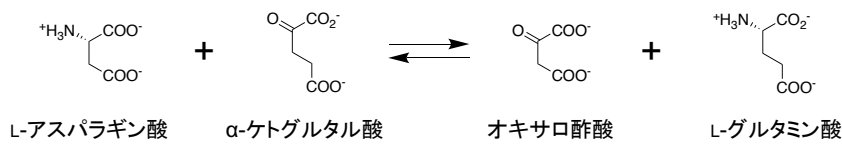
例えばアスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AAT) はアミノ基転移酵素の反応モデルとしてよく研究されてきた対象である²¹。AAT の触媒によってアスパラギン酸と α -ケトグルタル酸は可逆的にオキサロ酢酸とグルタミン酸に相互変換される (図 0-8)。

初発段階においては基質の α -アミノ基と Internal aldimine との間におけるプロトンの平衡が存在している。反応性の高い基質-酵素複合体 (Michaelis complex) においてはプロトンがイミンの窒素原子上にプロトンが存在しており、PLP の C4'-位への基質のアミノ基による求核攻撃が容易に起こり、geminal なジアミン中間体 (gem-Diamine 1) を形成する。その後 Arg386 や PLP の 3-位のヒドロキシ基の補助もあり、プロトンの移動が起こる (gem-Diamine 2)。gem-Diamine 2 は Lys258 の脱離を伴って external aldimine へと変換される。External aldimine までの変換は非常に速く、生理条件下では律速とはならない²²。次のステップが化学的に最も難しく、Lys258 による α 炭素からのプロトンの引き抜きと C4'-位のプロトン化、

つまり 1,3-プロトン移動を同じ遷移状態から達成しなくてはならない。これはカルバニオン性の中間体 (Carbanionic intermediate) を経ることで解決でき、この中間体は 3 つの共鳴構造を有する。中でも 3 つ目の構造は *p*-キノンに類似しているためキノノイド (Quinonoid) 中間体と呼ばれ、電荷を持たない共鳴構造である。このキノノイド中間体の安定性は PLP 依存性酵素の活性にとって非常に重要で、AAT における 1,3-プロトン移動にも安定化された Carbanionic intermediate の存在が必要である。AAT だけでなく他の多くの PLP 依存性アミノ基転移酵素においても側鎖とピリジン環の相互作用がピリジン環のプロトン化を維持し、Carbanionic intermediate が安定化される。Carbanionic intermediate は α 炭素および C4'-位の炭素においてプロトン化され元の external aldimine に戻るか、ケチミン中間体 (Ketimine) へと変換される。ケチミン中間体は Lys258 の触媒によって α 炭素に水が付加され、カルビノーラミン中間体 (Carbinolamine 1) が生成する。最終的に PMP の C4'-位に結合した窒素へのプロトン移動 (Carbinolamine 2) とその開裂によって E-PMP/オキサロ酢酸 (Oxaloacetate) 複合体までの分子変換が達成される (図 0-8)。

Asp222 は PLP のピリジン環に結合した水素と相互作用しており、これによってピリジン環のプロトン化を促進している。このプロトン化によって Carbanionic intermediate が安定化され、1,3-プロトン移動が容易になる^{23,24,25,26}。ピリジン環の窒素原子を炭素原子に置換した 1-DeazaPLP を用いて AAT の反応を行うと通常の場合に比べて 10^9 倍ほど活性が低い。PLP の代わりに 1-DeazaPLP を用いた際の活性は alanine racemase²⁷ (図 0-9) の場合には 1000 倍程度、O-acetylserine sulfhydrylase²⁸ (図 0-10) の場合には 260 倍程度の減少であることを考えると、この 10^9 倍という値は非常に大きい²⁹。このことから Carbanionic intermediate の安定化が AAT の活性に非常に重要であることがわかる。この Asp 残基は PLP 依存性酵素の中でも Carbanionic intermediate の安定性が活性に必要なアミノ基転移酵素をはじめとして、脱炭酸酵素、レトロアルドール反応やクライゼン縮合を触媒する酵素において保存されている一方で、比較的 Carbanionic intermediate の安定性が重要ではない Racemase や O-Acetylserine sulfhydrylase においては保存されていない²¹ (図 0-11)。

(A)



(B)

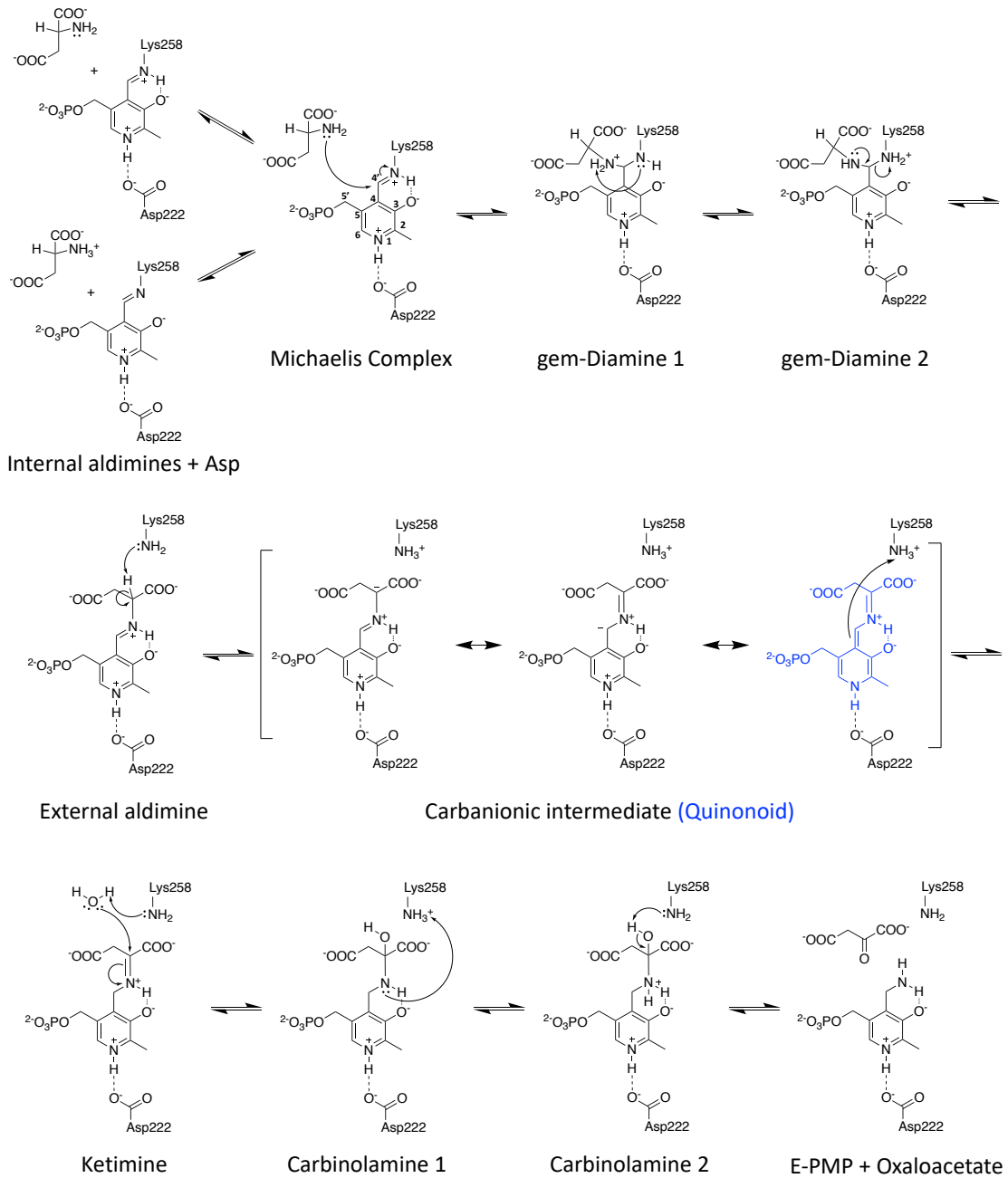


図 0-8 アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AAT)の反応機構

(A) AAT の触媒する反応. (B) AAT の反応機構.

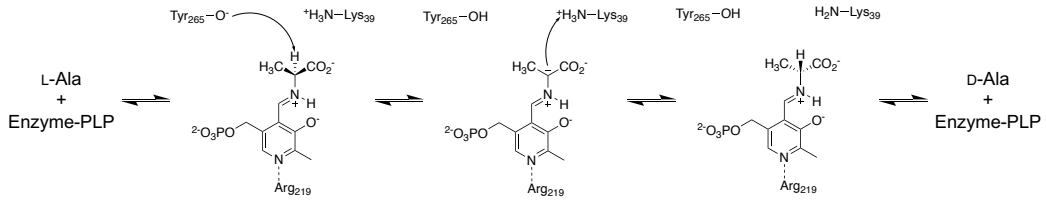


図 0-9 Alanine racemase の反応機構

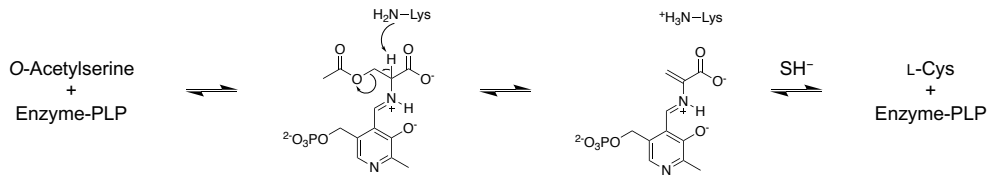


図 0-10 O-Acetylserine sulfhydrylase の反応機構

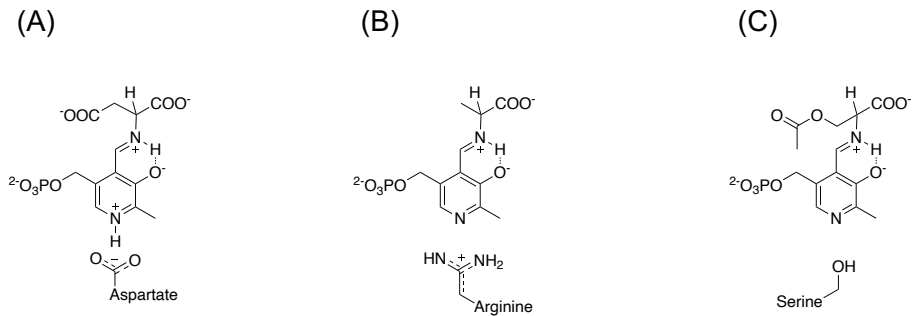


図 0-11 PLP 依存性酵素による PLP のピリジン環の認識

(A) Aspartate aminotransferase (AAT). (B) Alanine racemase. (C) O-Acetylserine sulfhydrylase. AAT においてはピリジン環に結合した水素原子と相互作用することでピリジン環のプロトン化状態を安定化している。

酸素を用いる酵素

酸素分子は強力な酸化剤 ($\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ 酸化還元対の pH 7.0 における標準酸化還元電位は+0.82 V)であり、ジチオナイトをはじめとする還元剤の存在下においては熱力学的に不安定である³⁰。しかし、酸素は高い活性化障壁を有しており、多くの反応は常温常圧下では進行しない。その理由は酸素の分子軌道を考えることで理解できる (図 0-1 2)。酸素分子は基底状態においては三重項酸素として存在しており、不対電子を2つ有するビラジカルである。一方、多くの生体分子を含む有機小分子は基底状態では一重項で存在しており、三重項の酸素分子との反応はスピン禁制反応となるため、反応性が低い³¹。よって、酵素反応などにおいて酸素を酸化剤として用いる際には、予め有機小分子をラジカルに変換しておくことで活性化させておくか、適切な遷移金属との軌道相互作用もしくは電子供与体から酸素分子への一電子移動によって還元型の酸素化学種へと変換しておく必要がある^{30,31}。

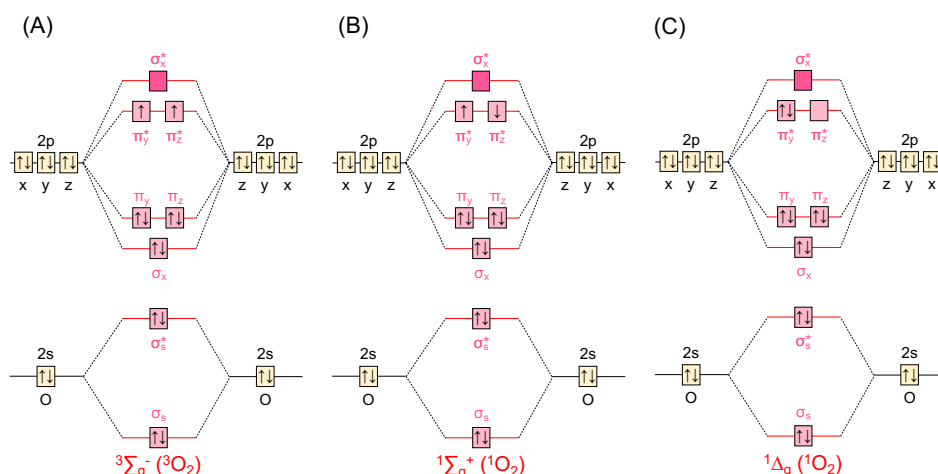


図 0-1 2 酸素分子の分子軌道

(A) 三重項酸素 (基底状態), (B), (C) 一重項酸素 (励起状態)。酸素分子は基底状態である三重項の状態ではビラジカルとして存在しているため、基底状態が一般的に一重項である有機小分子との反応においては活性化が必要。

遷移金属を用いて酸素を活性化する酵素の例としてはシトクロム P450 が挙げられる。シトクロム P450 は活性中心にへム鉄を持つ酵素で多くの種において存在しており、酸化反応や骨格形成反応など様々な反応を触媒する。保存されたシステイン残基と水分子がへムの鉄原子にリガンドとして配位している。基質が酵素に結合することによって水が脱離して、酸素が活性中心のへム鉄の d 軌道と相互作用し、結合できるようになることで反応が進行する^{32,33} (図 0-1 3)。

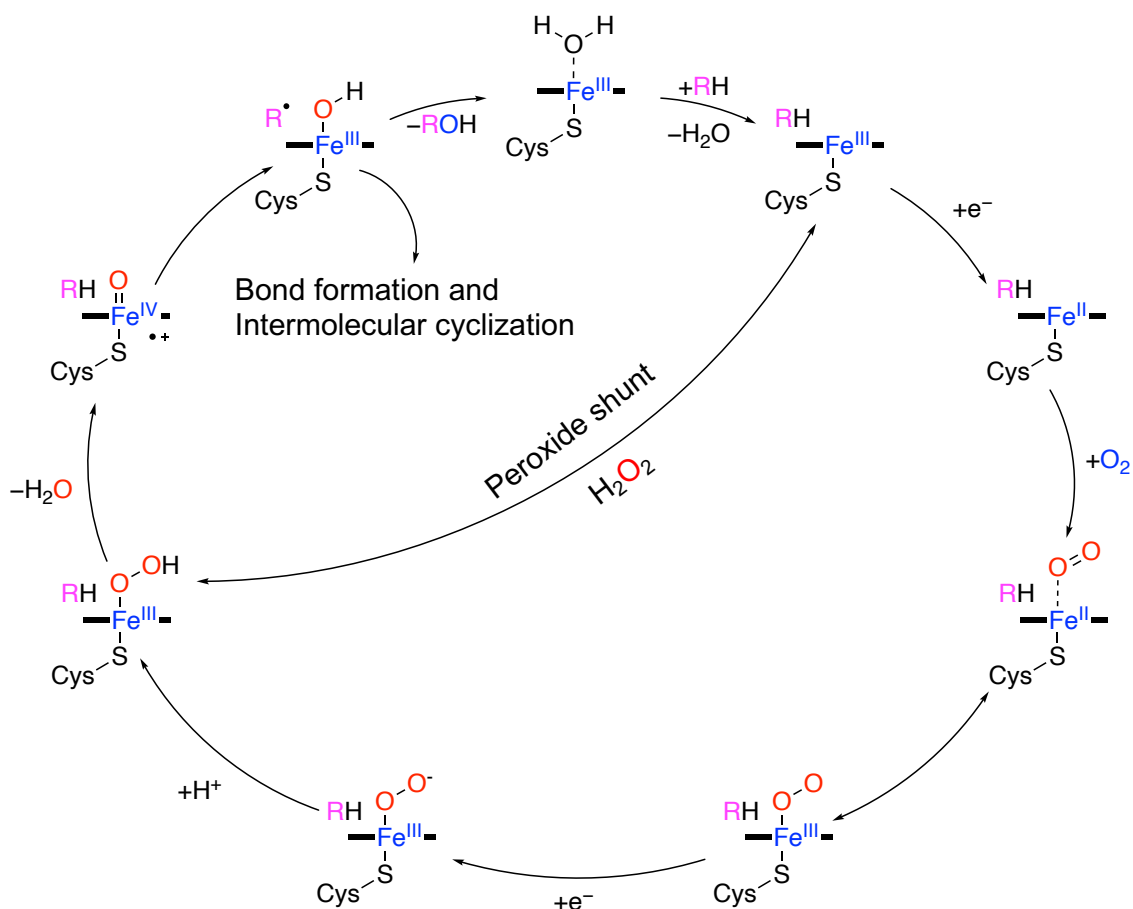


図 0-13 シトクロム P450 の触媒サイクル

へム中心の鉄の d 軌道と酸素との相互作用により、酸素を利用した酸化反応が可能になっている。

一方で有機小分子を用いた一電子移動によって酸素を活性化する酵素の例として、フラビン酵素が挙げられる。フラビン酵素はビタミン B₂ を基本とする FAD (flavin adenine dinucleotide) や FMN (flavin mononucleotide) を補酵素に持つ酵素群である。FAD や FMN をまとめて Flavin 類と称することにする。フラビン酵素においては還元型の Flavin 類と酸素が反応する。還元型の Flavin 類 (Reduced flavin) は 4 つの共鳴構造を有し、1-位の窒素原子上に生じたアニオンが共鳴安定化される。そのため、4a-位の炭素のアニオン性が高まっており、ここでしばしば酸素分子への一電子移動と再結合によるペルオキシフラビン中間体 (C(4a)-(hydro)peroxyflavin) を経て、酸化反応や水酸化反応などが進行する^{34,35} (図 0-14)。

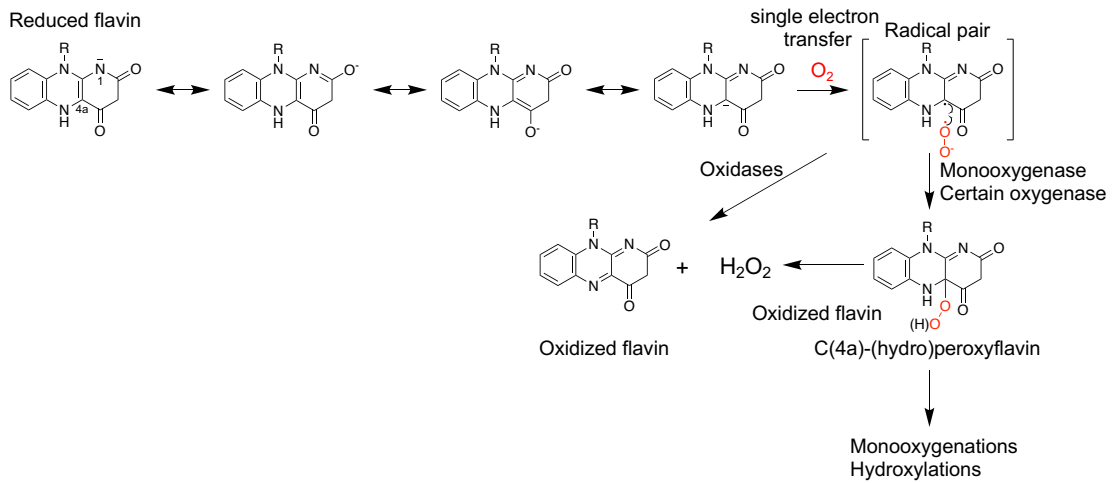


図 0-14 フラボタンパク質における酸素の活性化機構

共鳴安定によって 4a-位の炭素のアニオン性が高まっており、ここで酸素分子への一電子移動と再結合によるペルオキシフラビン中間体を形成することで Monooxygenation や Hydroxylation など酸化反応が進行する。

酸素への一電子移動におけるカルバニオンの重要性は補因子非依存性の酸化酵素においても示されている^{30,36,37}。例えば *Arthrobacter nitroguajacolicus* R6 由来の 1-*H*-3-hydroxy-4-oxoquinaldine-2,4-dioxygenase (HOD) においては基質である 2-methyl-3-hydroxy-4(1*H*)-quinolone (MHQ) の脱プロトン化によって生じたアニオンが共鳴安定化され、アニオン性を帯びた炭素の部分で酸素に一電子を受け渡し、以降の反応が進行していく (図 0-15)。

上で述べた酸素を用いる PLP 酵素の場合もこのようにカルバニオン性の中間体 (Quinonoid intermediate) が酸素との反応において重要なのではないかと提唱されている²⁰。

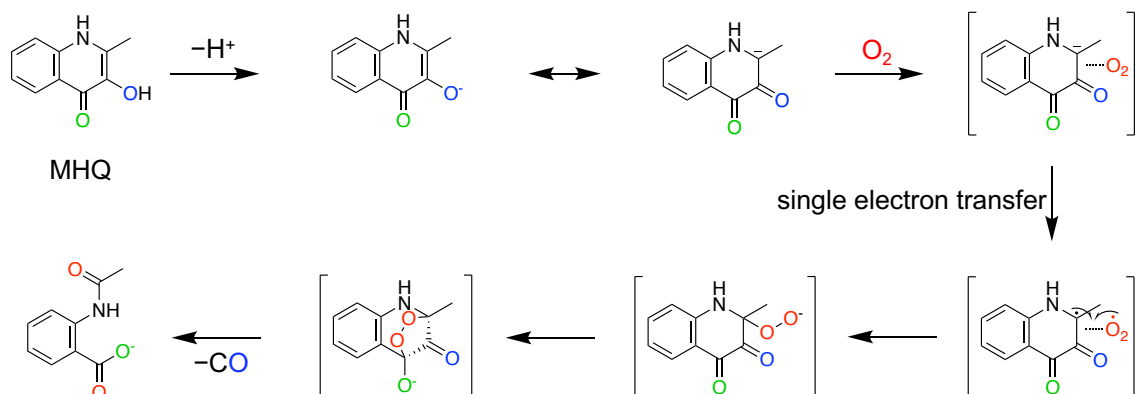


図 0-15 補因子非依存性ジオキシゲナーゼ HOD の反応機構

共鳴安定化されたカルボアニオンから酸素への一電子移動が起点となり、酸素と反応する。

窒素-窒素 (N-N)結合を有する天然物

天然物の中には窒素-窒素 (N-N)結合を有するものが 200 種類以上存在し、抗菌、抗ガン、抗真菌活性など重要な生物活性を持つ^{38,39}。N-N 結合を含む天然物は構造多様性に富んでおり、アゾキシ (Azoxymycin)、ジアゾ (Creameomycin⁴⁰, Kinamycin⁴¹, Alazozeptin⁴²)、ヒドラジド (Kutzneride⁴³)、ヒドラジノ (Dixiamycin⁴⁴)、ヒドラゾン (s56-p1)、*N*-nitroso (L-Alanosine^{45,46}, Streptozotocin⁴⁷)、*N*-hydroxytriazene (Triacsin^{48,49,50})を部分構造として持つものや、芳香族複素環式化合物 (Azamerone⁵¹, 8-Azaguanine⁵²)などが含まれている (図 0-16)。しかしその生合成、特に N-N 結合形成のメカニズムについてはまだ解明されていないものが多い。生体内において窒素原子は酸化数-3 のアミンの状態での多くの場合存在しており、N-N 結合を形成させるのは困難である。そのため、天然における N-N 結合戦略としては大きく分けて 3 つの戦略が取られている。1 つ目はラジカル再結合機構によるもの、2 つ目は転位反応によるもの、3 つ目は異なる酸化数の窒素原子同士による均化反応によるものである³⁸。

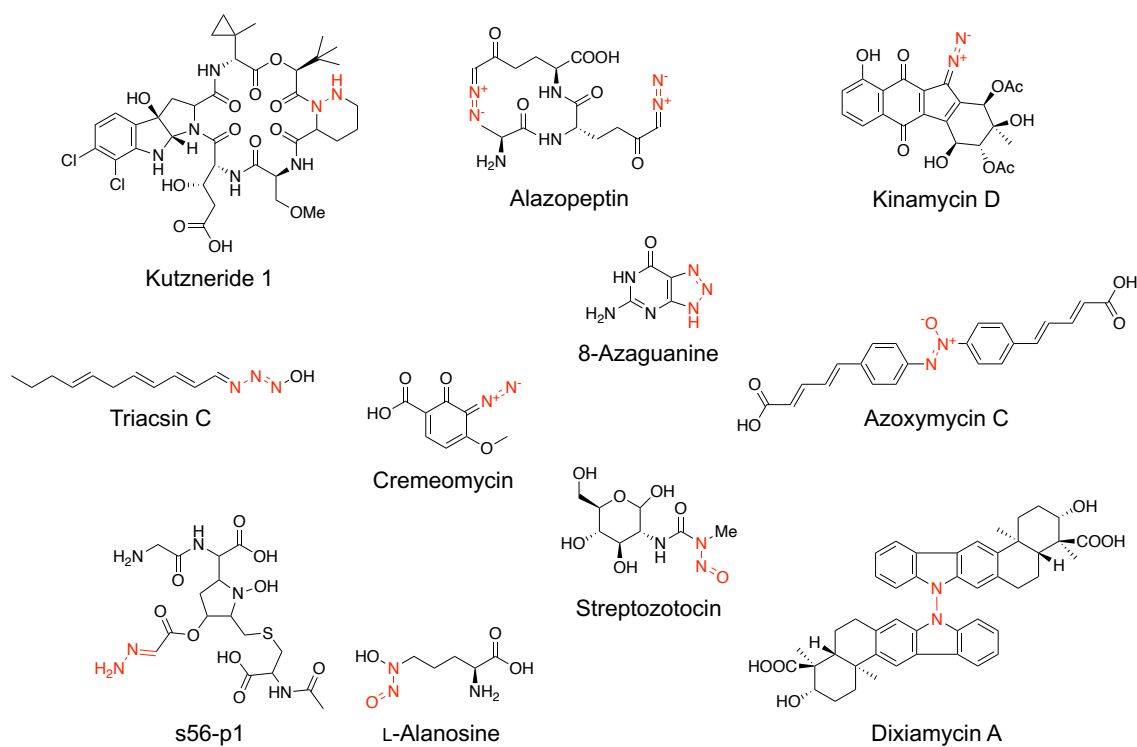


図 0-16 N-N 結合を有する天然物

N-N 結合を有する天然物の構造式と名前を示した。N-N 結合をしている部分構造を赤色でハイライトした。

ラジカル再結合機構による N-N 結合形成の例として Azoxymycin の生合成が挙げられる。Azoxymycin 生合成においては non-heme diiron N-oxygenase である AzoC によって基質のアミン(-NH₂)がニトロソ(-NO)へと酸化される。この反応で生じた芳香族ニトロソ化合物は NADH/NAD⁺、NADPH/NADP⁺、FADH₂/FAD、FMNH₂/FMN ペアなどによって非酵素的かつ可逆的にヒドロキシルアミン(-NH-OH)へと変換される。この過程で生じるニトロソ基上およびヒドロキシルアミン上のラジカルペア同士の結合によって Azoxymycin が生成すると考えられている。ラジカル捕捉剤の添加によって N-N 結合の抑制が観測されることからこのラジカル再結合機構が支持されている (図 0-17)⁵³。

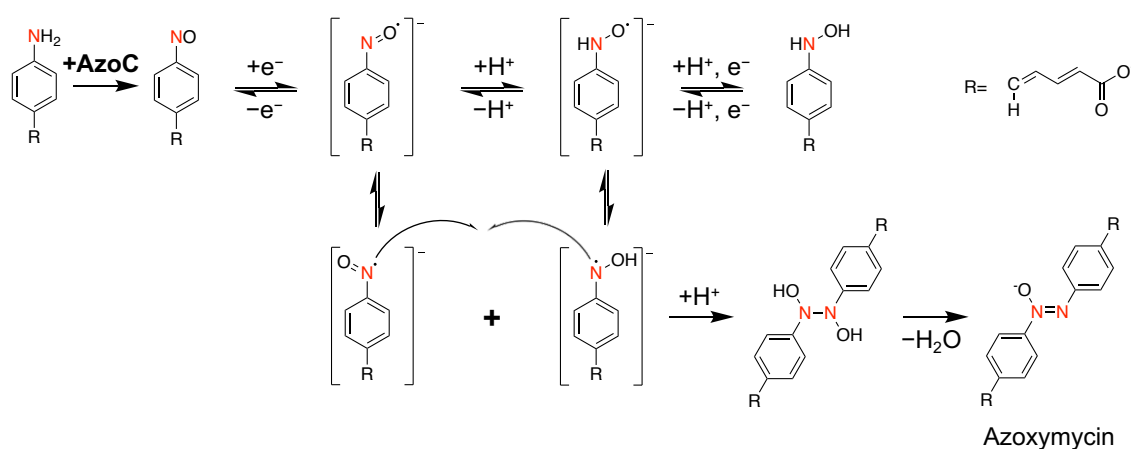


図 0-17 Azoxymycin 生合成における N-N 結合形成機構

ニトロソ基上およびヒドロキシルアミン上のラジカルペア同士の結合によって Azoxymycin が生成すると考えられている。

転移反応による N-N 結合形成の例としては、s56-p1 や Streptozotocin 生合成において cupin ドメインが触媒する反応が挙げられる。s56-p1 生合成においてはまずモノオキシゲナーゼ Spb38 によって L-Lysine が N⁶-hydroxyl-L-lysine へと変換する。続いて N⁶-hydroxyl-L-lysine と Glycine が N 末端に cupin ドメイン、C 末端に metRS 様ドメインを有する二ドメイン性の Spb40 の作用によって縮合、転位して N-N 結合が形成される。Spb40 の反応においては N⁶-¹⁸OH を用いたフィーデング実験の結果から、エステル中間体を経ることが明らかにされている。そのため、まず Spb40 の metRS ドメインによって活性化された Glycine に N⁶-hydroxyl-L-lysine のヒドロキシルアミノ基の酸素原子が求核攻撃してエステル中間体を生成し、cupin ドメインがエステル中間体の N-O 結合の開裂と転位反応を触媒して N-N 結合形成を達成していると考えられている (図 0-18)^{54,55,56}。Streptozotocin の生合成においては ¹⁵N 標識した化合物のフィーデング実験から、N-ニトロソ基の二つの窒素と炭素が N^ω-Methyl-L-arginine (L-NMA) のグアニジノ基由来であることが明らかにされている。さらに *in vitro* での生化学

実験によって Arginine が *N*-メチル基転移酵素 SznE によってメチル化されて L-NMA へと変換され、続いてマルチドメインの金属酵素である SznF の nonheme di-iron oxidase (HDO) ドメインによって水酸化されることで *N*^δ-Hydroxy-*N*^ω-methyl-L-arginine (L-HMA)へと変換されることが明らかにされている。この先の反応に関しては二通りの機構が提唱されている。一つ目は SznF が NO 生成酵素であり、L-HMA の酸化的脱アミノ化によって NO アナログと *N*^δ-Hydroxy-*N*^ω-methyl-L-citrulline (L-HMC)が生成し、その際に一時的な中間体として *N*^δ-Hydroxy-*N*^ω-hydroxy-*N*^ω-methyl-L-arginine (L-DHMA)を経るという機構である⁵⁷。もう一つは SznF の HDO ドメインが逐次的に二つの窒素を水酸化し、L-NMA を L-DHMA へと変換し、cupin ドメインの触媒する L-DHMA の転位反応によって N-N 結合が達成されるという機構である (図 0-19)⁵⁸。

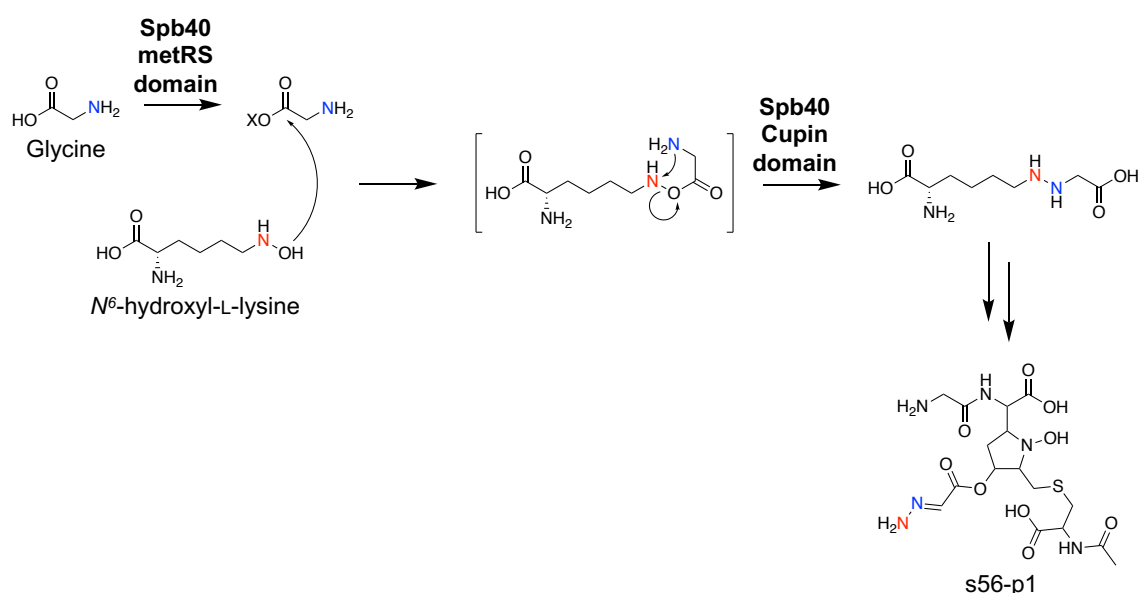


図 0-18 s56-p1 生合成における N-N 結合形成機構

Spb40 の metRS ドメインによって活性化された Glycine に *N*⁶-hydroxyl-L-lysine のヒドロキシルアミノ基の酸素原子が求核攻撃してエステル中間体を生成し、cupin ドメインがエステル中間体の N-O 結合の開裂と転位反応を触媒して N-N 結合を形成する。

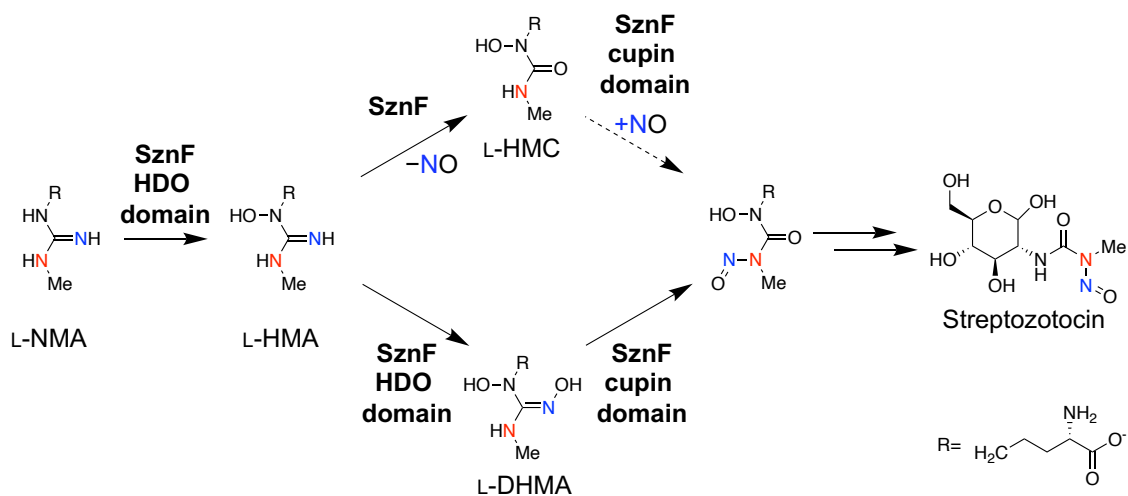


図 0-19 Streptozotocin 生合成における N-N 結合形成機構

SznF によるヒドロキシ基の導入を起点とした N-N 結合形成機構。L-HMA から二通りの経路が提唱されている。

3 つ目の均化反応に関してはヘム依存性タンパク質を用いる Kutzneride 生合成や ANS 経路で生産される亜硝酸⁵⁹を用いる経路が例として挙げられる。

Kutzneride などの構成要素として用いられている Piperazate 生合成における N-N 結合生合成機構は精製酵素を用いた実験によって示されている。Piperazate 生合成においては、L-オルニチン-N-ヒドロキシラーゼである KtzI とヘム依存性タンパク質である KtzT が連続した反応によって N-N 結合形成が触媒されることが示されている。この際 KtzT のヘム鉄が N-O 結合を分極させ、もう一方のアミノ基からの求核攻撃を容易にしていると考えられている (図 0-20)⁶⁰。

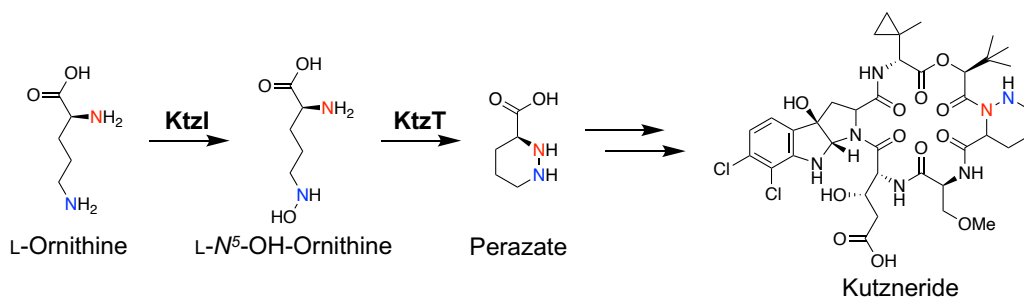


図 0-20 Kutzneride 生合成における N-N 結合形成機構

KtzT のヘム鉄が N-O 結合を分極させ、もう一方のアミノ基からの求核攻撃を容易にしていると考えられている。

一酸化窒素 (NO)由来の窒素化学種とアミンとの均化反応による N-N 結合形成の例として 8-Azaguanine の生合成が例として挙げられる。NO は好氣的条件下では非酵素的反応により 8-Azaguanine のトリアゾール部位に効果的に取り込まれるが、嫌氣的条件下では取り込みが抑制された。また、NO₂⁻は非酵素的な反応では窒素供与体として使用できなかったことから、トリアゾール構築には NO 自身ではなく、窒素酸化物が直接関与していることを示唆されている⁶¹。・NO₂と N₂O₃は、生理的条件下で水溶液中に存在する NO の自動酸化生成物である。図 0-2 1では、化学的に活性な NO_xとして N₂O₃を用い、NO 由来の推定 N-N 結合形成機構を示している。

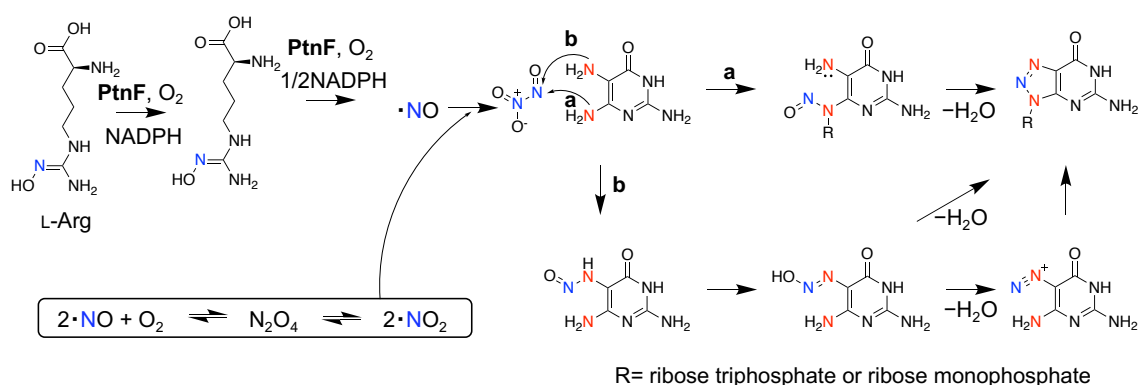


図 0-2 1 8-Azaguanine 生合成における推定 N-N 結合形成機構

一方で均化反応による N-N 結合形成のために重要な小分子として亜硝酸が挙げられ、CreE, D の連続した反応によって L-アスパラギン酸から亜硝酸を生成する ANS 経路 (図 0-2 2)⁵⁹が Kinamycin、Azamerone、Cremeomycin、Alazopectin、Triacsin など多くのクラスターにおいて保存されている⁶²。

Kinamycin などの生合成においては、Glutamylhydrazine がジアゾ基部分の二つの窒素原子のキャリアとなっていることが明らかにされているが、N-N 結合形成の詳細については不明である (図 0-2 3)⁶³。

Azamerone 生合成においては、[¹⁵N]-亜硝酸と L-[Me-¹³C]-メチオニンを用いた同位体標識実験から SF2415A3 のジアゾ基が転位することで Azamerone が生成することが明らかになっているが、N-N 結合形成機構については不明である (図 0-2 4)⁶⁴。

Alazopectin 生合成においては、遺伝子破壊および相補実験から、膜タンパク質と推定される AzpL によってジアゾ基形成が行われると推定されている。しかし *in vitro* での解析は行われておらず、詳しい N-N 結合形成機構は不明である (図 0-2 5)⁶⁵。

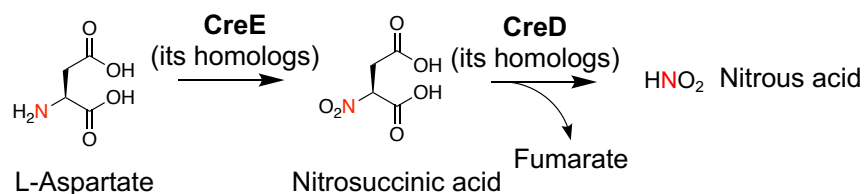


図 0-2 2 ANS (Aspartate/Nitrosuccinate)経路

ANS 経路では、L-アスパラギン酸 (L-Aspartate)からニトロコハク酸 (Nitrosuccinic acid)を経て亜硝酸 (Nitrous acid)を生成する。

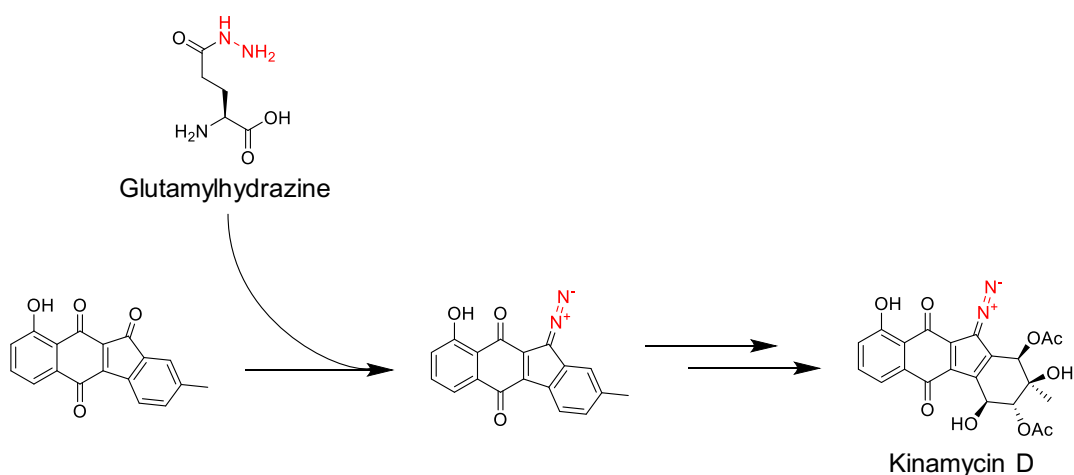


図 0-2 3 Kinamycin の推定生合成機構

Glutamyldiazine がジアゾ基部分の二つの窒素原子のキャリアとなっていることが明らかにされている。

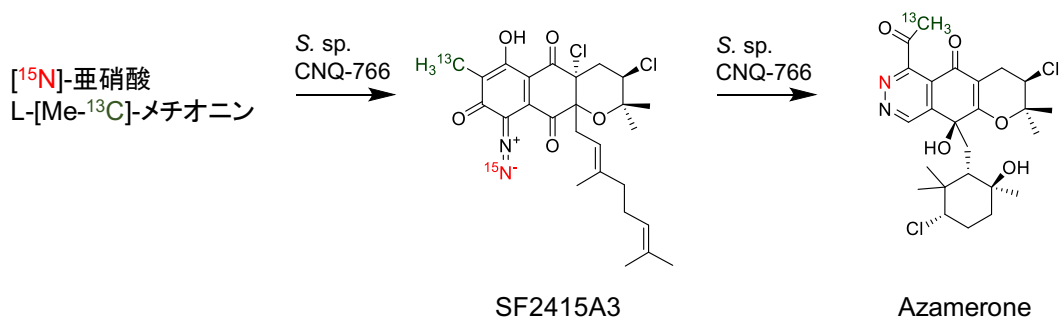


図 0-2 4 同位体標識実験によって推定された Azamerone 生合成経路

$[\text{15N}]\text{-亜硝酸}$ と $\text{L-}[\text{Me-13C}]\text{-メチオニン}$ を用いた同位体標識実験から SF2415A3 のジアゾ基が転位することで Azamerone が生成することが明らかになっている。

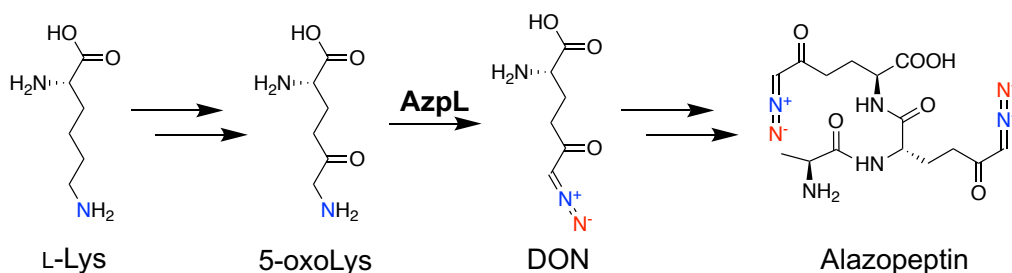


図 0-25 Alazopeptin の推定生合成機構

膜タンパク質の AzpL によってジアゾ基形成が行われると推定されている。

Cremeomycin では片方の窒素原子は 3-Amino-2-hydroxy-4-methoxybenzoic acid (3-AHMB) のアミノ基、もう片方の窒素原子は亜硝酸由来であることが示されており、Acyl-CoA synthase と相同性を有する CreM が ATP 依存的なジアゾ基形成を担っていると推定されているが、非酵素的にもこの反応が起こるため、詳しい解析は行われていない (図 0-26)⁶⁶。

Tiacsin 生合成においては *N*-hydroxytriazene 骨格形成のために二箇所の N-N 結合形成が必要でそれぞれ別の機構によって生成する。Tiacsin 中間体 HAA に含まれるヒドラジノ基の N-N 結合は s56-p1 と同様の機構で形成される。Spb38-40 のホモログである Tri26-28 によって L-Lysine の酸化と Glycine ユニットの結合および転位によって N-N 結合が達成される。*N*-hydroxytriazene 骨格形成反応には CreM と 40%程度相同性を示す Tri17 が関与しており、ATP から AMP への変換を伴って亜硝酸依存的に N-N 結合形成を達成する (図 0-27)⁵⁵。

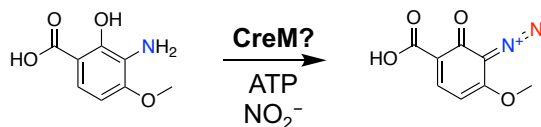


図 0-26 Cremeomycin 生合成における N-N 結合形成機構

ジアゾ基の形成機構は不明なままであり、非酵素的にもジアゾ化が進行するため、CreM のジアゾ基形成への関与は完全には証明されていない。

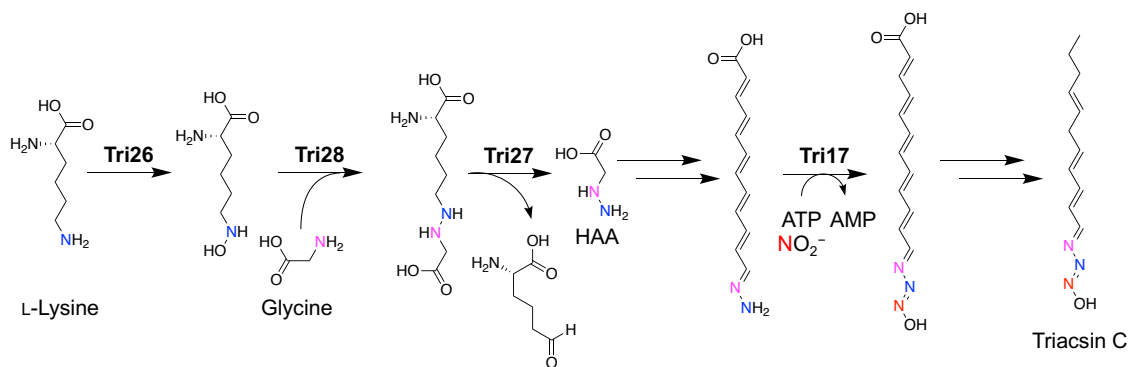


図 0-27 Triacsin 生合成における二種類の N-N 結合形成機構

二箇所の N-N 結合はそれぞれ異なる機構によって導入されることが明らかにされている。

本研究の目的

先ほど述べたように、放線菌のメロテルペノイド生合成においてはアミノ基を有する中間体 8-AF が存在し、その導入反応および除去反応は既存の反応様式と大きく異なり特徴的であるものの、その機構は明らかでなかった。このような背景から本研究ではメロテルペノイド生合成経路の解析を通じて、新規な反応機構を有する窒素代謝関連酵素の機能解析とその生理的意義に迫ることを目的とした。第一章では、Naphterpin 生合成遺伝子クラスター中のピリドキサルリン酸 (PLP) 依存性アミノ基転移と酸化を触媒する二機能性酵素 NphE の機能解明をすることで PLP 依存性酵素の反応多様性の拡張をすることができた。第二章ではジアゾ基形成酵素 Fur5 を起点とした還元的脱アミノ化反応を含む新規窒素代謝が関与するメロテルペノイドの還元的生合成の解明と生理的意義についての解析を行うことで、N-N 結合形成に関する新たな知見を与えるとともに、最終産物のメロテルペノイドの電子メディエーターとしての役割を示し、放線菌における共脱窒機構を明らかにした。第三章では Fur5 ホモログの共脱窒への寄与の検証することでジアゾ化を起点とする、共脱窒機構の普遍性に迫った。第四章では Naphterpin の生合成に見出される転位反応に関する解析を中心に研究を行い、メロテルペノイドの構造多様化機構の一端を明らかにした。

第1章 二機能性 PLP 依存性酵素の解析

序論でも述べた様に放線菌の生産するメロテルペノイドに共通の生合成中間体として 8-AF が知られており、当研究室の機具による相補実験によって 8-AF が Furaquinocin や Naphterpin の生合成中間体であること、そして *in vivo* および *in vitro* での結果から PLP 依存性アミノ基転移酵素 NphE やそのホモログの Fur3 の作用によって L-Glu 依存的に Mompain から 8-AF が生合成されることが示されていた (機具章太博士論文, 2012)。しかし、この Mompain から 8-AF までの変換はアミノ基転移の他に二電子の酸化が必要な「酸化的アミノ基転移」であり、その詳細な反応機構の解析は行われてこなかった。本章では *E. coli* BL21(DE3)から調製した組換え酵素を用いた反応解析の結果から明らかになった NphE の反応機構について述べる。

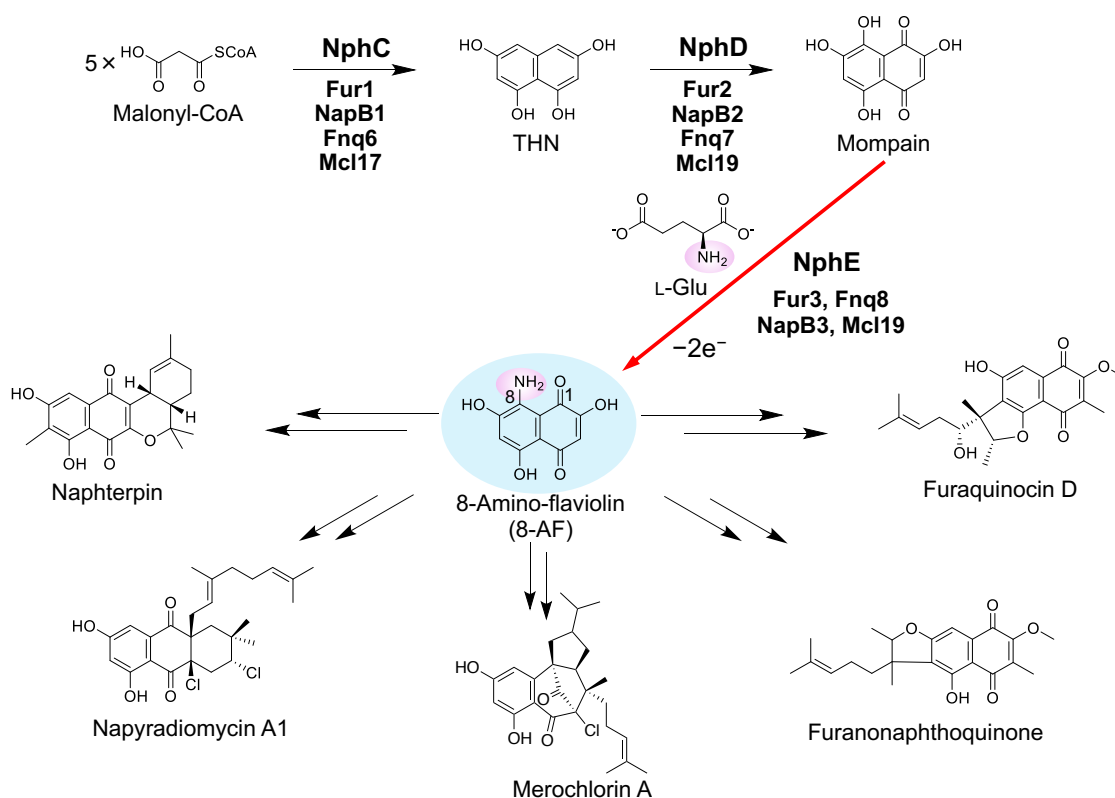


図 1-1 NphE やそのホモログが触媒する「酸化的アミノ基転移」

赤矢印で示した経路が「酸化的アミノ基転移」であり、NphE やそのホモログによって触媒される。

第1節 NphE の *in vitro* 反応解析

第1項 NphE 反応における反応液の呈色

当研究室の機具によって pACYCDuet ベクター (Novagen) に *nphE* 遺伝子が挿入された発現ベクターを *E. coli* BL21(DE3) に形質転換した株が得られていたので (磯貝章太博士論文, 2012)、この株を培養し、His タグと Ni-NTA カラムを用いたアフィニティクロマトグラフィーによって精製することで以下の *in vitro* 反応に用いた。

基質として Momapin、アミノ基供与体として L-Glu を用いて表 1-1 の条件で反応を行った際に、酵素添加と同時に反応液が淡いピンク色から水色に変化することを発見した (図 1-2)。そこでこの反応を分光光度計で追跡することにした。

表 1-1 NphE の反応条件

Reaction Mixture	
100 mM	HEPES-NaOH pH7.5
20 μ M	Mompain
10 mM	L-Glu
20 μ M	NphE
Total 1 mL	25°C 30min

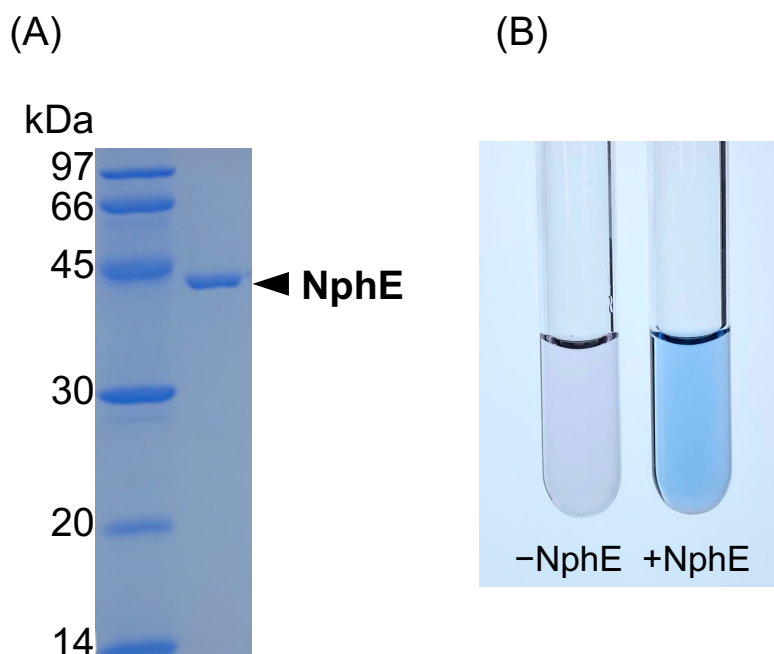


図 1-2 NphE の精製と反応

(A) 精製後の NphE の SDS-PAGE. (B) NphE 添加直後の反応液の様子.

第2項 PMP-mompain adduct の検出

前節で観測された反応液における水色の呈色をより詳細に解析するため、分光光度計を用いて反応の UV-Vis スペクトルの経時変化を測定した。反応は表 1-2 の条件で行った。その結果、通常の好気条件においては NphE 添加と共に直ちに極大吸収 610 nm の吸光の増大し、経時的に減少していく様子が観測された。これは目視で確認した水色の補色の波長と一致する。一方で反応液に Ar ガスを 1 時間封入して溶液を低酸素条件にした後に NphE を添加すると、610 nm の増大は好気条件と同様に観測されたものの、その後の減少は抑制された。610 nm という長波長の吸光を有することから長い共役系を有する化合物由来であることが予想される。一般に PLP 依存性アミノ基転移酵素のキノノイド中間体は 500 nm 程度^{67,68,69} の吸光を示すが、仮に Mompain がアミノ基受容体として用いられた場合に生成すると予想される PMP-mompain adduct (キノノイド中間体)はより長い共役系を有するため、610 nm の吸光を有することも考えられる。この仮説はキノノイド中間体が酸素非依存的に生成することからも支持され、キノノイド中間体からの 8-AF の切り出しの過程で酸素が利用されると考えた。

表 1-2 NphE の反応条件 (UV-Vis)

Reaction Mixture	
100 mM	HEPES-NaOH pH7.5
50 μ M	mompain
10 mM	L-Glu
40 μ M	NphE
Total 500 μ L	25°C 60min

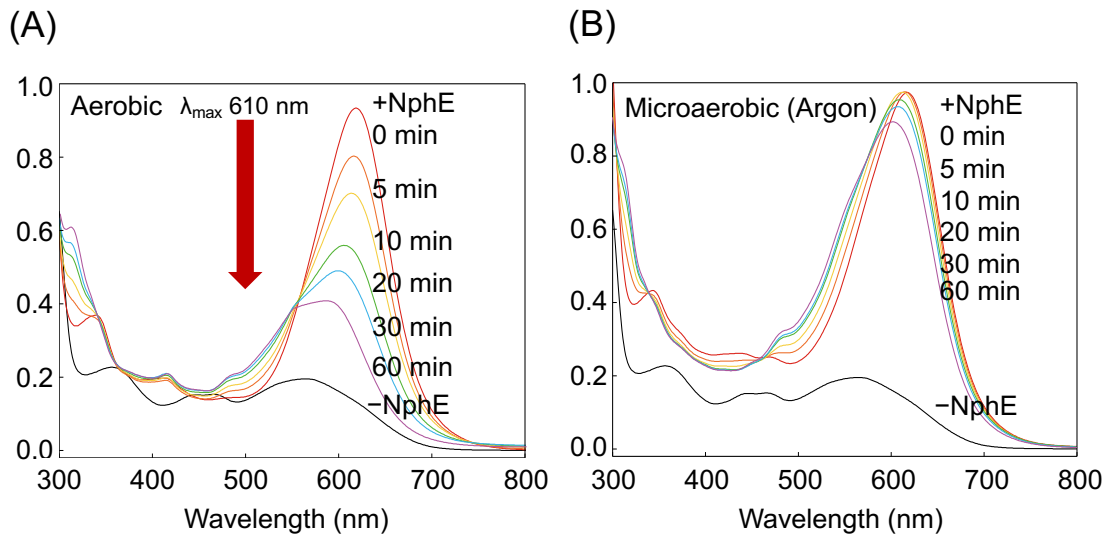


図 1-3 NphE 反応における UV-Vis スペクトルの経時変化

(A) 好気条件における NphE の反応. (B) 微好気条件 (Ar 置換) における NphE の反応.

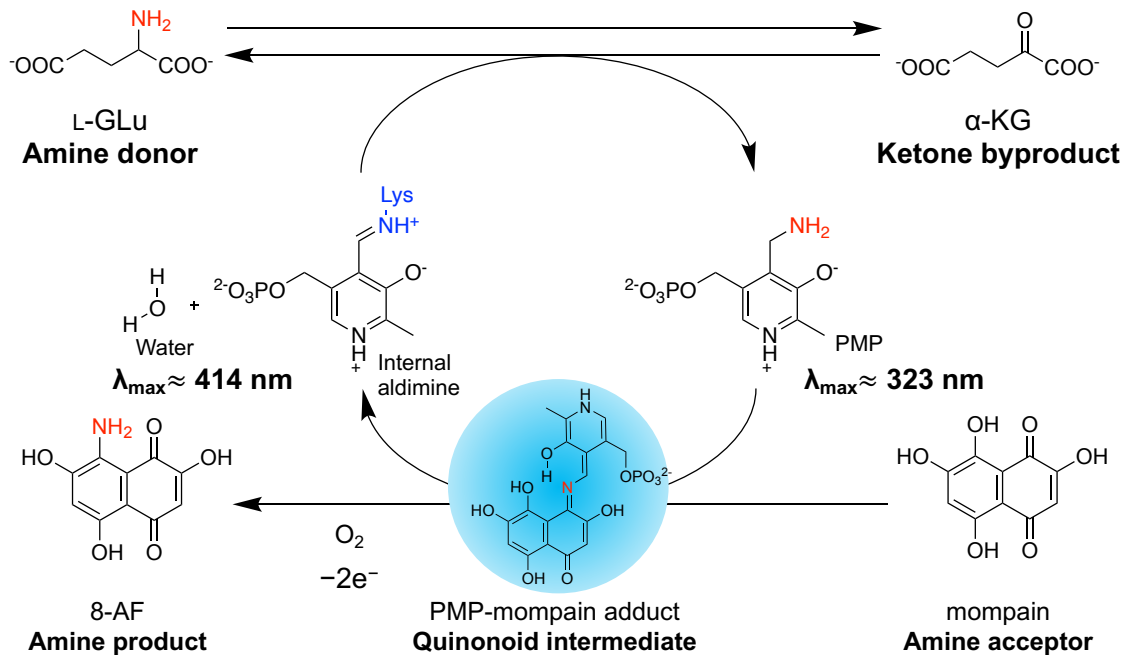


図 1-4 予想される NphE の反応機構

酸素非依存的な PMP-mompain adduct の形成および、酸素依存的な PMP-mompain adduct から 8-AF の切り出しが示唆された。

第3項 DFT 計算による PMP-mompain adduct の吸光予測

前項で予想された極大吸収 610 nm が PMP-mompain adduct に由来することを確認するため、DFT 計算 (TDDFT 法^{70,71})による吸光度予測を行うことにした。吸光にほとんど関与しないと予想されるリン酸基は、先行研究に倣ってメチル基へと置換した⁷²。PMP-mompain adduct の最安定構造を B3LYP/6-31G(d)レベルで求め、虚振動を持たないことを確認した。次に得られた構造を用いて励起状態エネルギーのから吸収波長を求める TDDFT 法による吸光度予測を Firefly⁷³を用いて B3LYP/6-31G(d,p)レベルで行った。なお計算は水を溶媒とした条件で行い、TDDFT 法において励起状態の数を表す NSTATE は 10 とした。その結果極大吸収 615 nm を有すると予測され、実験値とほとんど一致したことから、610 nm の吸光が PMP-mompain adduct 由来であるということが支持された。

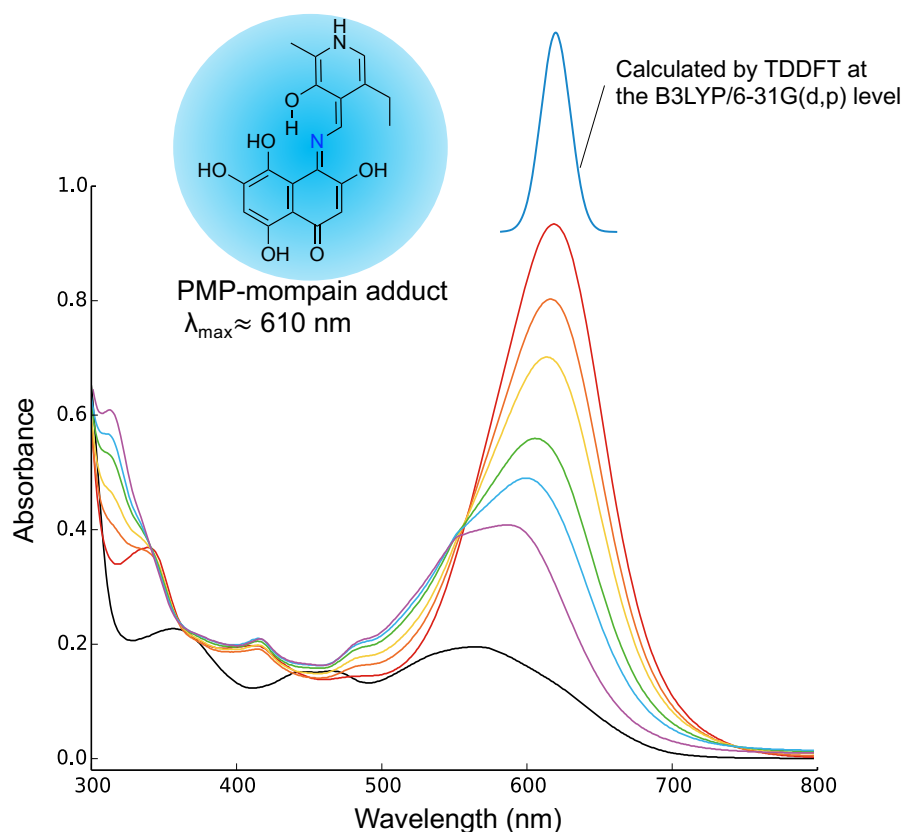


図 1-5 PMP-mompain adduct の TDDFT 法による予測値と実験値の比較

前項で、好気条件で NphE の反応をおこなった UV-Vis スペクトルの図と DFT 計算による計算値 (一番上に示している青色のクロマトグラム)との比較を示した。

第4項 L-Glu 依存的な PMP の形成

序論で述べた様に、一般的に PLP 依存性アミノ基転移酵素はアミノ基供与体 (Amine donor) と Internal aldimine とのアミノ基交換反応によって PMP を形成し、別のアミノ基受容体へとアミノ基を受け渡す。これまで NphE の反応においては L-Glu がアミノ基供与体となることが明らかにされていたので、キノノイド中間体である PMP-mompain adduct の形成の前に L-Glu 依存的な PMP の形成が予想され (図 1-4)、分光光度計で UV-Vis スペクトルの変化を観測することで反応を追跡することにした。UV-Vis スペクトルにおいて Internal aldimine は通常極大吸収 414 nm を、PMP は極大吸収 323 nm を示す。Mompain を反応系に加えず PMP 形成までの半反応を検出するため、反応は表 1-3 の条件で行った。その結果、精製時点した直後の NphE だけの UV-Vis スペクトルにおいても、ほとんどが PMP の状態で存在しており (図 1-6 の黄色の線)、さらに L-Glu を添加することで、残る internal aldimine も PMP へと変換されることが明らかとなった (図 1-6 の赤色の線)。この結果は、*E. coli* からの精製時点でほとんどの internal aldimine が PMP へと変換されていることを示しており、これは *E. coli* の細胞内の L-Glu と反応して PMP を形成したためだと考えられる。

表 1-3 PMP 検出反応条件

Reaction Mixture	
100 mM	HEPES-NaOH pH7.5
0 μM	Mompain
10 mM	L-Glu
20 μM	NphE
Total 500 μL	25°C 30min

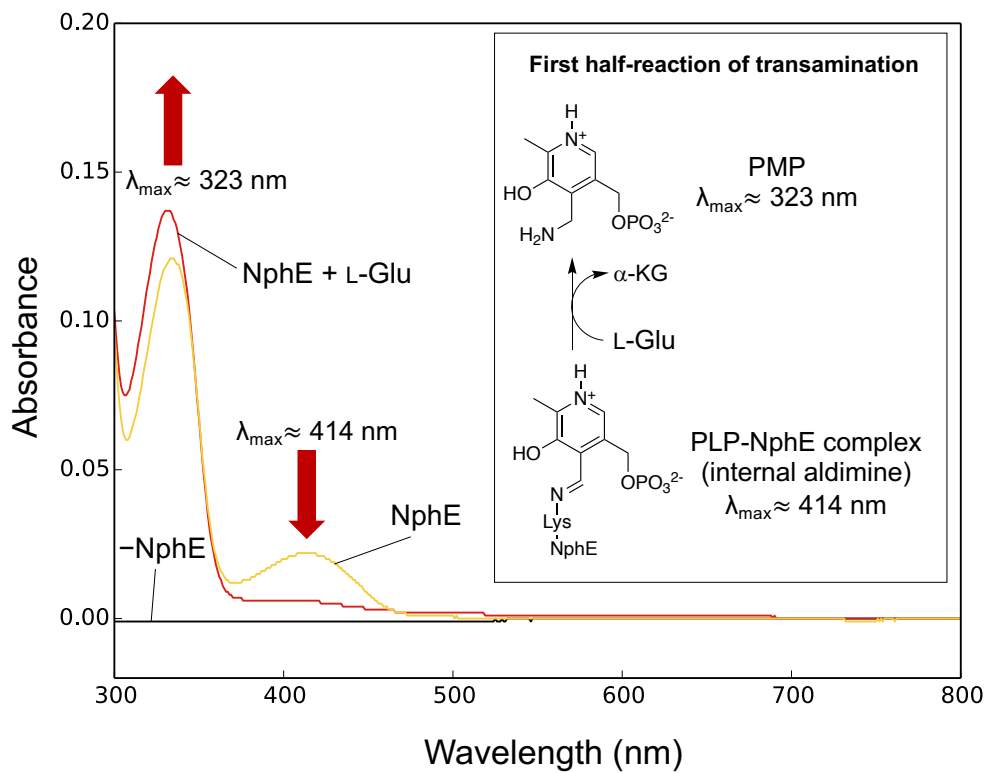


図 1-6 L-Glu 依存的な PMP の形成

黄色の線が精製した NphE のみの UV-Vis スペクトル。そこに L-Glu を加えてインキュベートした系の UV-Vis スペクトルを赤色の線で表した。

第5項 NphE 反応における酸素の消費

第2項において PMP-mompain adduct の分解に酸素が必要であることが示されたことから、NphE 反応における酸素の消費と酸素がどの様に利用されているかを調べることにした。酸素消費の測定には酸素電極 (Oxytherm+, Hansatech)を用いて、反応は表 1-4 の条件で行った。その結果 NphE の添加と共に酸素の消費が確認でき、さらに catalase 添加によってその消費が減少する様子が確認できた (図 1-7)。Catalase は過酸化水素を不均化して水と酸素に変換する。そのため NphE の反応において酸素は過酸化水素へと変換されており、catalase 添加によって見かけ上その消費が減少していたと考えられる。実際に酸素消費速度を比較したところ、通常条件で $2.2 \pm 0.2 \mu\text{mol}/\text{min}$ 、catalase 添加条件で $1.1 \pm 0.1 \mu\text{mol}/\text{min}$ となり、ほぼ半減していることが明らかとなった。一方で 8-AF の生成速度はそれぞれ $2.6 \pm 0.3 \mu\text{mol}/\text{min}$ および $2.5 \pm 0.2 \mu\text{mol}/\text{min}$ となり catalase 添加によってほとんど影響がなく、1分子の酸素の消費によって1分子の 8-AF が生成していることが明らかとなった (表 1-5)。

表 1-4 酸素電極チャンバー内の NphE 反応条件

Reaction Mixture	
100 mM	HEPES-NaOH pH7.5
100 μM	mompain
10 mM	L-Glu
50 μM	PLP
(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Catalase)
20 μM	NphE
Total 1 mL	25°C 10min

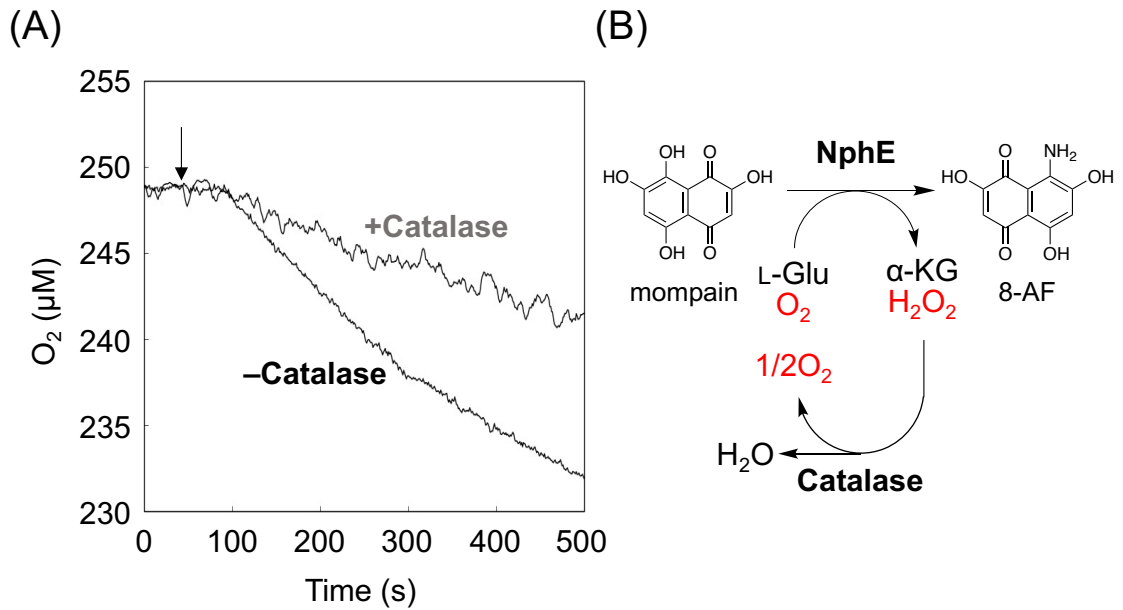


図 1-7 酸素電極による NphE 反応における酸素消費の検出

(A) Catalase 添加および非添加条件における NphE 反応での酸素消費 (矢印で NphE 添加). (B) Catalase 添加による酸素消費減少の模式図.

表 1-5 NphE 反応における酸素消費速度 (n=4)

	Oxygen Consumption Rate (μmol/min)	8-AF Production Rate (μmol/min)
-catalase	2.213 ± 0.221	2.596 ± 0.286
+catalase	1.109 ± 0.198	2.519 ± 0.191

) × 1/2) equivalent

第6項 NphE の逆反応解析

前項までで NphE の触媒する Mompain から 8-AF への変換反応の詳細を明らかにした。通常 PLP 依存性アミノ基転移酵素の反応は可逆的であるため、NphE も逆反応 (図 1-8) を触媒できるか検証することにした。表 1-6 のような条件で逆反応を行い、HPLC 解析に供した。その結果、のように逆反応は進行しなかった。そのため、NphE の触媒する反応は不可逆反応であることが明らかになった。

以上、ここまでの結果により、NphE の反応機構は図 1-10 の様であることが明らかとなった。

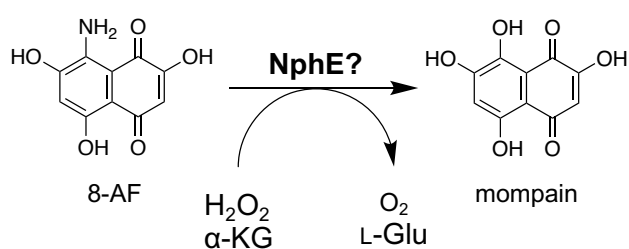


図 1-8 NphE の逆反応

表 1-6 NphE の逆反応

Reaction Mixture	
100 mM	HEPES-NaOH pH7.5
50 μM	8-AF
10 mM	α-KG
1 mM	H ₂ O ₂
20 μM	NphE

Total 100 μL 30°C 1 h

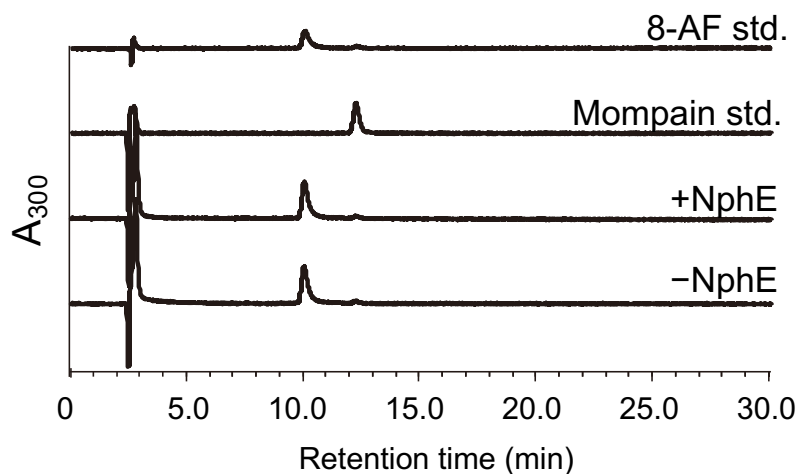


図 1-9 NphE の逆反応 (300 nm の吸収波長)

NphE 添加非添加両条件において逆反応が進行することはなかった。

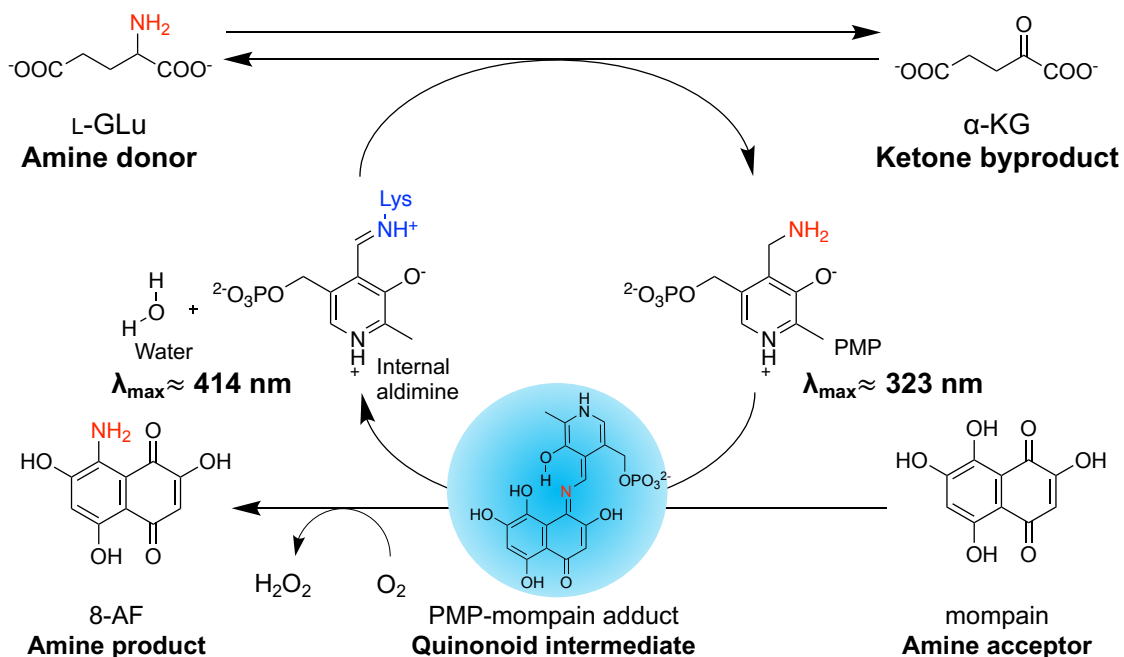


図 1-10 ここまでで明らかになった NphE の反応機構

L-Glu 依存的な PMP の形成の確認をおこなった。また、PMP-mompain adduct からの酸素依存的な 8-AF の切り出し、およびそれに伴う過酸化水素の生成を確認した。さらに Mompain から 8-AF への変換は不可逆反応であることを明らかにした。

第2節 NphE の結晶化

さらに詳しい NphE の反応機構を明らかにするため、X 線結晶構造解析に用いる NphE の結晶化を目指した。当研究室の岩本が以前、Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーで精製後の NphE (pHis8⁷⁴ にクローニングしたベクターを *E. coli* BL21(DE3) に形質転換した株から精製) をゲルろ過クロマトグラフィーに供していたものの、その時のクロマトグラムの様子はピークが分裂しており (岩本紗佳卒業論文, 2021)、精製条件を改善する必要があると考えられた。

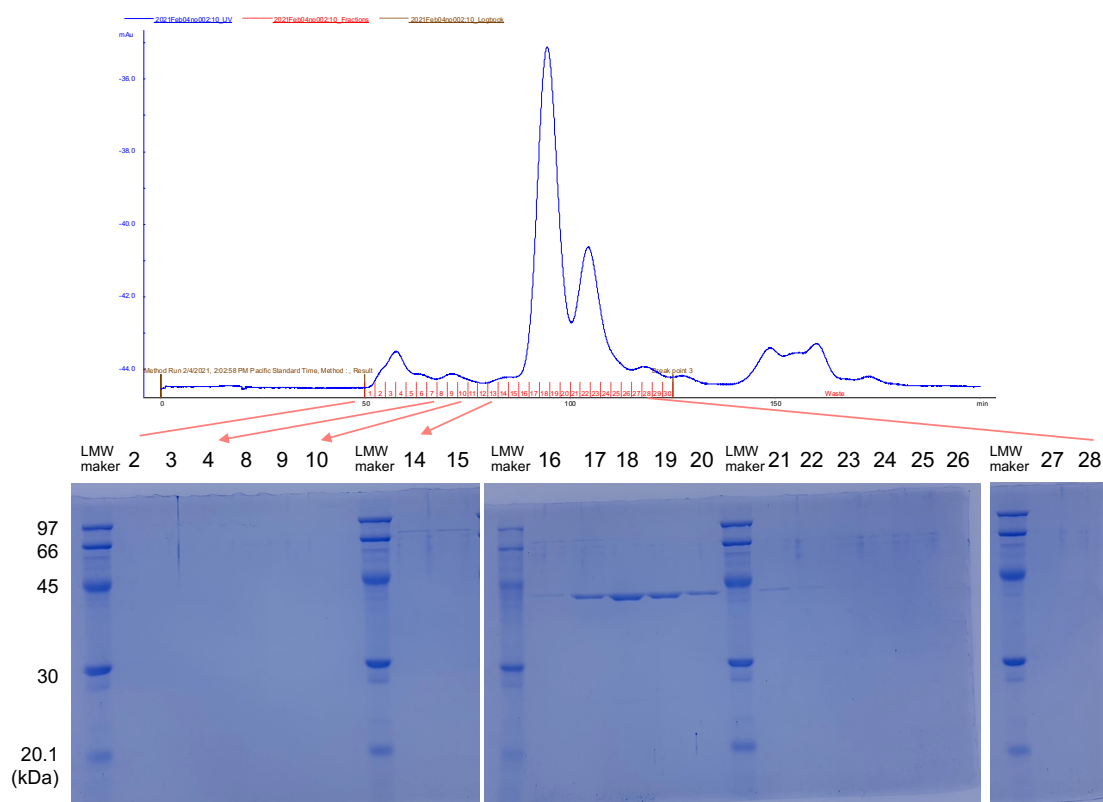


図 1-11 NphE のゲルろ過と各画分の SDS-PAGE (岩本のデータ)

第1項 NphE のゲルろ過クロマトグラフィー精製

NphE のゲルろ過クロマトグラフィーにおいてピークが分裂していた原因として、前節第4項で示した internal aldimine と PMP との平衡が考えられた。つまり、NphE は Ni-NTA アフィニティ精製した時点で internal aldimine 型のもものと PMP 型の二種類が存在しており、これがピークの分裂につながったと推測された。そこで Ni-NTA アフィニティ精製後の透析と Thrombin 処理 (1 mg の NphE に対して 30 U) の際に 2 mM の L-Glu と 50 μ M の PLP を添加して、全て NphE を PMP 型に変換して精製することを試みた。その結果、ほぼ単一のピークとして NphE のゲルろ過クロマトグラムを得ることに成功し、これを結晶化スクリーニングに用いることにした (図 1-12)。

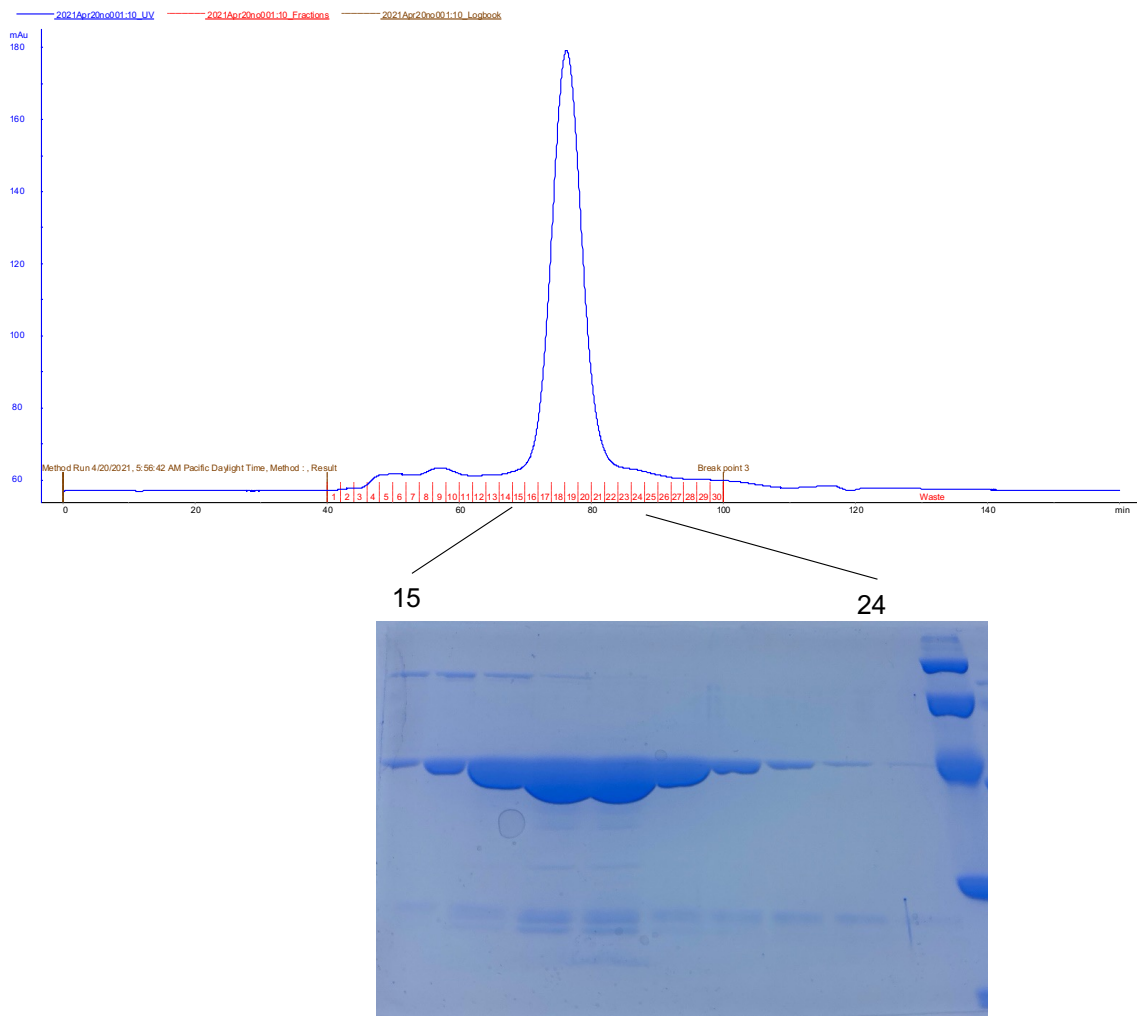


図 1-1 2 NphE のゲルろ過クロマトグラフィー (L-Glu+PLP) と各画分の SDS-PAGE
フラクション 15-24 を以後の結晶化スクリーニングに用いた。

第 2 項 NphE の結晶化スクリーニング

前項で得られた NphE を結晶化スクリーニングに供した。スクリーニングキットはいずれも Hampton 社のもので、Crystal Screen, Crystal Screen2, Index を用いた。①10 mg/mL NphE+2 mM L-Glu+50 μ M PLP ②10 mg/mL NphE+2 mM L-Glu+50 μ M PLP+2 mM Mompain ③10 mg/mL NphE+2 mM L-Glu+50 μ M PLP+2 mM Flaviolin などの条件で結晶化スクリーニングを行ったが、いずれの場合も結晶を得ることはできなかった。

第3節 AlphaFold v2.0 による NphE の構造予測と MD 計算

前節において NphE の結晶が得られなかったため、構造予測と MD 計算を用いて PMP-mompain adduct と NphE の複合体構造モデルの作成を目指すことにした。

第1項 AlphaFold v2.0 による NphE の構造予測

AlphaFold v2.0 は DeepMind 社が開発した高精度なタンパク質構造予測プログラムであり、2020 年 11 月に開催された CASP14 においても他チームと圧倒的な予測精度の差を見せつけた⁷⁵。そこでまずこの AlphaFold v2.0 を用いて NphE の構造を予測することにした。PLP 依存性アミノ基転移酵素は一般にホモ二量体として働き、PLP はその界面に結合し両方のペプチド鎖によって認識される⁷⁶。AlphaFold v2.0 によって予測される構造は単量体の構造なので、NphE のホモログのホモ二量体構造 (ArnB: NphE と 33%の相同性) に対して、AlphaFold v2.0 で得られた NphE 単量体構造を分子置換することで、ホモ二量体の NphE の構造を得た。これに対して PMP-mompain adduct を両鎖に配置し、MD 計算のための初期構造とした (図 1-1 3)。なお、ArnB の活性中心には基質-PLP 複合体アナログが結合していたので、PMP-mompain adduct のジヒドロピリジン部位が ArnB の基質-PLP 複合体アナログのピリジン環部分が重なる様に PMP-mompain adduct は配置した。なお、予測構造の信頼性を示す pLDDT スコアの大きさによる色分けをしたものを図 1-1 4 に示した。この図から予測されたそれぞれの単量体構造の信頼性が概ね高いことがわかる。

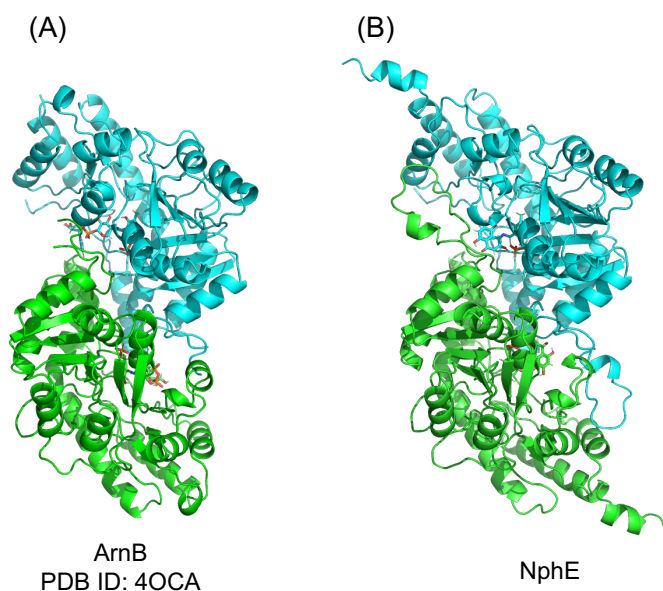


図 1-1 3 NphE の AlphaFoldv2.0 による予測構造と ArnB との比較

(A) ArnB の結晶構造. (B) NphE の AlphaFold v2.0 による予測構造をホモ二量体にしたもの. 全体のフォルドは類似しており、A 鎖を緑、B 鎖をシアンで示した。ArnB の共結晶基質のピリジン環と PMP-mompain adduct のジヒドロピリジン環が重なるように配置したものを MD 計算の初期構造として用いた。



図 1-14 NphE 二量体構造の pLDDT スコアによる色分け

pLDDT スコアが 90 以上の部分を blue、70 以上の部分を cyan、50 以上の部分を yellow、50 未満の部分を orange で示した。活性中心に配置してある PMP-mompain adduct の色は pLDDT スコアとは無関係である。

第2項 MD計算による NphE と PMP-mompain adduct の複合体構造モデルの構築

PMP-mompain adduct の部分的な原子電荷は、以下のようにして決定した。PMP-mompain adduct のモデルからリン酸基を取り除き、Gaussian 16 B.01⁷⁷ を用いて HF/6-31G(d) レベルで構造を最適化した。同じレベルで分子の周りの静電ポテンシャル (ESP) を計算し、ESP に適合する原子電荷を AmberTools21⁷⁸ の Antechamber モジュール⁷⁹ を用いて restrained electrostatic potential (RESP) 法で計算した。リン酸メチルの原子電荷も同様にして求めた。Antechamber モジュールを用いて、PMP-mompain adduct の全構造のトポロジーファイルを作成した。トポロジーファイルの原子電荷は、リン酸基を持たない PMP-mompain adduct について計算されたものに置き換えた。ただし、5'-メチレンと PLP 部位のリン酸基については、リン酸メチルについて計算された原子電荷を使用した。PLP 部位の 5'-メチレン基の原子電荷は、整数の正味電荷を与えるようにわずかに修正した。

ホモ二量体複合体構造を立方体の水の箱に入れ、箱の面とタンパク質の原子との間に 10Å の最小距離を確保した。カリウムイオンを加えて、システムの正味の電荷がゼロになるようにした。タンパク質とイオンには ff14SB 力場⁸⁰ を、リガンドには general AMBER force field 2 (GAFF2)⁸¹ を、水には TIP3P モデル⁸² を使用した。エネルギーの最小化と平衡化を行った後、100 ナノ秒かけてプロダクション MD を実行した。MD シミュレーションの間、温度は velocity-rescaling 法⁸³ により 300K に、圧力は Berendsen weak coupling 法⁸⁴ により 1.0×10^5 Pa に保った。水素原子の結合長は、LINCS アルゴリズム^{85,86} を用いて、2 fs の時間ステップで拘束した。静電相互作用は、粒子メッシュ Ewald 法^{87,88} を用いて計算した。MD シミュレーションはすべて Gromacs 2021⁸⁹ を用いて行い、座標は 10 ps ごとに記録した。その結果、初期構造からのずれを表す RMSD の値は MD 計算の過程で変化が小さく、PMP-mompain adduct が NphE ポケット内で安定に保持されていたことが示された (図 1-15)。

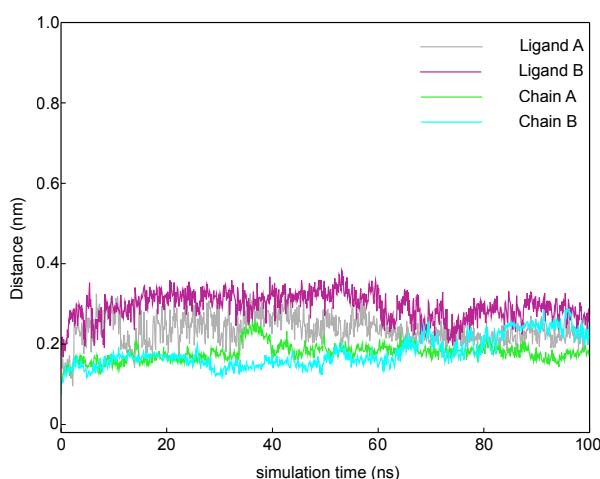


図 1-15 MD 計算過程における初期構造からのずれ

Ligand A: Chain A 中の PMP-mompain adduct. Ligand B: Chain B 中の PMP-mompain adduct. Chain A: NphE の A 鎖. Chain B: NphE の B 鎖.

MD 計算における NphE の B 鎖スナップショットを図 1-16 に示した。PMP-mompain adduct のジヒドロピリジン環は B 鎖の Asp154 (以下 Asp154B、他の残基も同様) と水素結合を形成しており、この Asp 残基は他の PLP 依存性アミノ基転移酵素においても保存されており、序論でも述べた様に活性に重要である。他にも Cys57B、Gly58B の主鎖、Ser178B、Asn235A、Lys237A の側鎖など両鎖の残基との水素結合によって PMP-mompain adduct の官能基が認識されている様子が観測された。さらに Phe83B との π - π スタッキング相互作用によって Mompain 部分のナフトキノン環を認識している様子が確認され、PMP-mompain adduct の 3.5 Å 以内に水素結合に関与する残基が存在している確率は平均 95% であった (表 1-7)。この高い確率は、実際の酵素反応中でもこれらの残基が PMP-mompain adduct との相互作用に関与していることを示唆している。

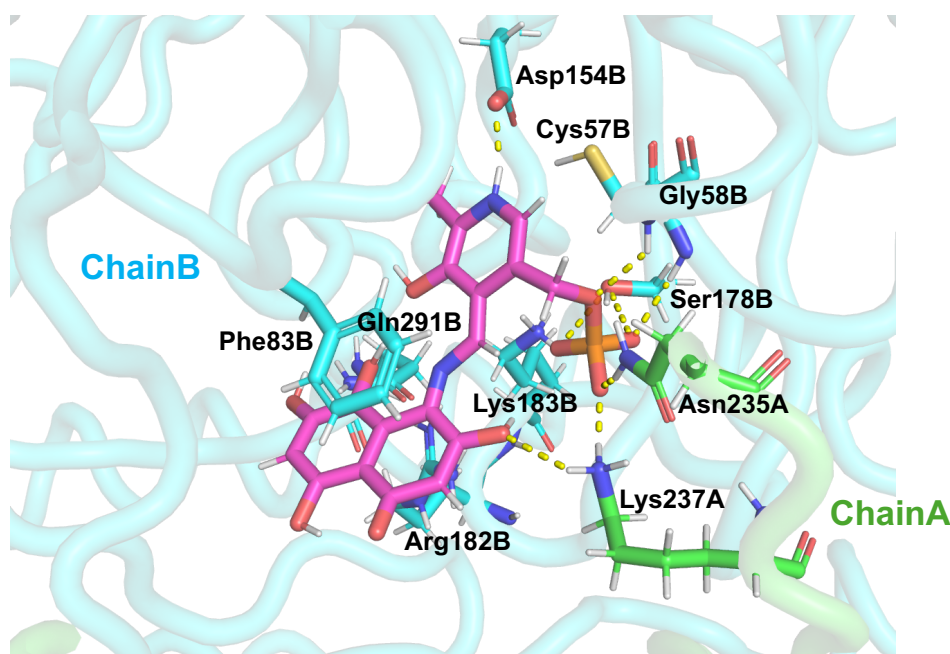


図 1-16 MD 計算のスナップショットとリガンド周辺残基

Asp153、Cys57B、Gly58B、Ser178B、Asn235A、Lys237A など両鎖の残基との水素結合によって PMP-mompain adduct の官能基が認識されている。Phe83B との π - π スタッキング相互作用によって Mompain 部分のナフトキノン環が認識されている。

表 1-7 PMP-mompain adduct の 3.5Å 以内にアミノ酸残基が存在する確率

Amino acid residue	Probability (%)
057B	88.27
058B	84.66
154B	99.65
178B	99.97
235A	99.72
237A	97.31
Average	94.93

また、これらの残基は NphE ホモログにおいても保存されており (Mcl19、Fur3、Fng8、NapB3)、これらホモログにおける基質認識にも重要であることが示唆された (図 1-17)。なお internal aldimine を形成する Lys 残基 (K183) も NphE ホモログや ArnB においても保存されていた。

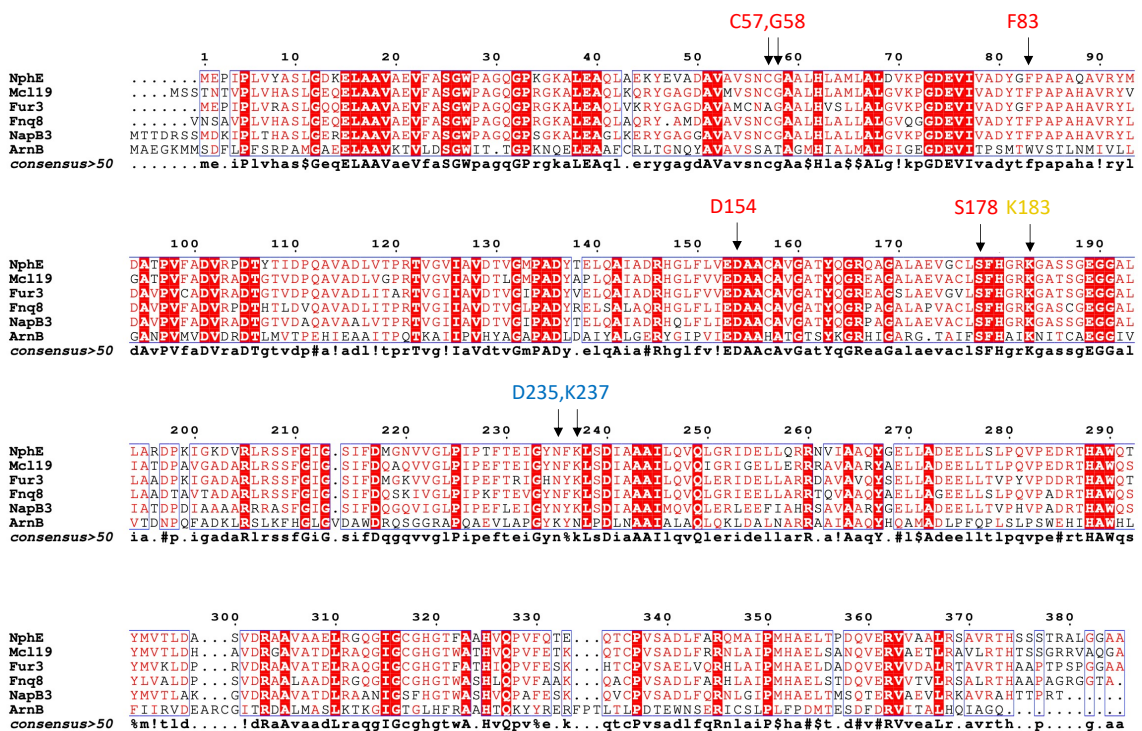


図 1-17 NphE ホモログと ArnB において保存されたアミノ酸残基

Internal aldimine 形成に必要な K183 を黄色で示した。B 鎖の PMP-mompain adduct 認識において必要な B 鎖のアミノ酸残基を赤色で、A 鎖のアミノ酸残基を青色で示した。

また図 1-16 のスナップショットでは NphE の外側から、PMP-mompain adduct の mompain 部分の 3 位の炭素まで通じる空洞が存在しており、この空洞を酸素が通って 3 位の炭素の位置で反応すると考えられた (図 1-18)。

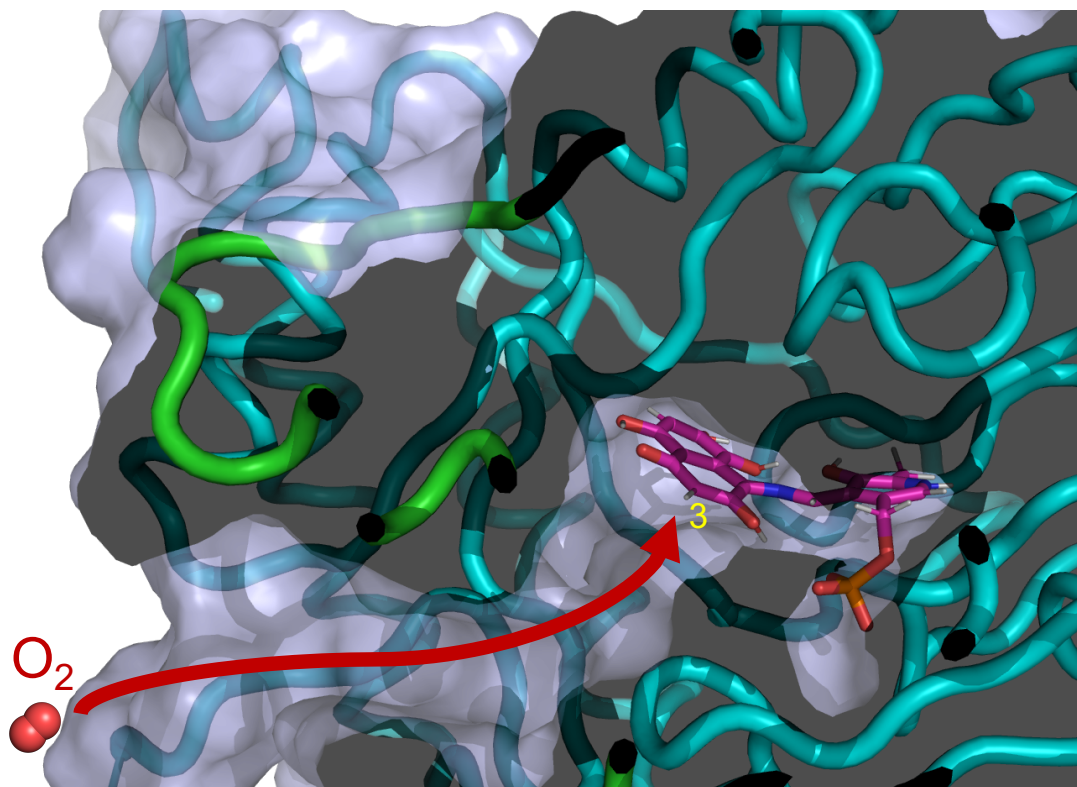


図 1-18 NphE の活性中心まで続く空洞

PMP-mompain adduct の mompain 部分の 3 位の炭素まで続く空洞が示され、酸素の通り道になっている可能性が示唆された。

第3項 NphE 変異体の活性評価

前項で推定された NphE の残基が実際に基質認識に関わっているのかどうか調べるため、周辺の残基も含めて変異タンパク質を作製することにした。pACYCDuet ベクターにクローニングした NphE 発現用ベクターを鋳型として変異導入 PCR をおこなった。変異体作製に用いたプライマーを表 1-8 に示した。PCR 産物は1時間の DpnI 処理後、*E. coli* BL21(DE3) に導入し、変異体 NphE を取得した。Ni-NTA アフィニティクロマトグラフィー精製を行った結果、収量の落ちる変異体も存在していたものの、いずれの場合にも可溶性で組換え酵素を取得することができた (図 1-19)。

表 1-8 NphE 変異体作成に用いたプライマー

NphE_F83A_f	TACGGCGCCCCGGCGCCCCGCCAGGC
NphE_F83A_r	CGCCGGGGCGCCGTAGTCGGCGACGATCACCTCGTC
NphE_D154A_f	GTCGAGGCCCGCCGCCTGCGCGGTCTGGC
NphE_D154A_r	GGCGGCGGCCTCGACGAGGAACAGCCCCGTGGCG
NphE_S178A_f	TGCCTGGCCTTCCACGGACGCAAGGGCGCCAG
NphE_S178A_r	GTGGAAGGCCAGGCAGCCCACCTCGGCGAGCG
NphE_R182A_f	CACGGAGCCAAGGGCGCCAGCAGCGGCGAGG
NphE_R182A_r	GCCCTTGGCTCCGTGGAAGGACAGGCAGCCCACCTC
NphE_K183A_f	GGACGCGCGGGCGCCAGCAGCGGCGA
NphE_K183A_r	GGCGCCCGCGCGTCCGTGGAAGGACAG
NphE_N235A_f	GGCTACGCCTTCAAGCTGTCCGACAT
NphE_N235A_r	CTTGAAGGCGTAGCCGATCTCGGTGAA
NphE_K237A_f	AACTTCGCGCTGTCCGACATCGCCGC
NphE_K237A_r	GGACAGCGCGAAGTTGTAGCCGATCTC
NphE_Q291A_f	GCCTGGGCGACCTACATGGTGACGCT
NphE_Q291A_r	GTAGGTCGCCCAGGCGTGAGTGCGGTC

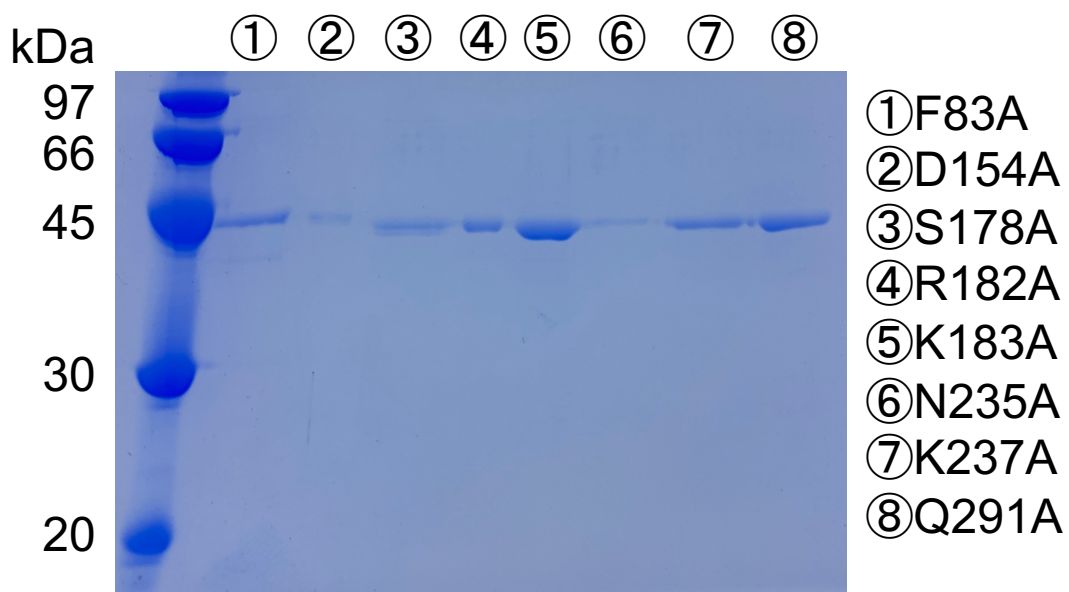


図 1-19 NphE 変異体の SDS-PAGE

第4項 NphE 変異体の活性測定

前項で作製した Fur6 の変異体を用いて Fur6 の活性測定を行った。反応は表 1-9 のような条件で行った。反応液と当量のメタノールでクエンチした遠心上清を HPLC 解析に供した。その結果、全ての変異体において活性が消失もしくは減少した (図 1-20)。R182 と Q291 は MD シミュレーションのスナップショットによっては Mompain 部分と相互作用していた残基である。このことから第2項で作製した PMP-mompain adduct 結合型の NphE のモデルが支持された。

表 1-9 変異体を用いた NphE 反応条件

Reaction Mixture	
100 mM	HEPES-NaOH pH7.5
50 μ M	Mompain
10 mM	L-Glu
2 μ M	NphE (or 変異体)
Total 200 μ L 30°C 1 h	

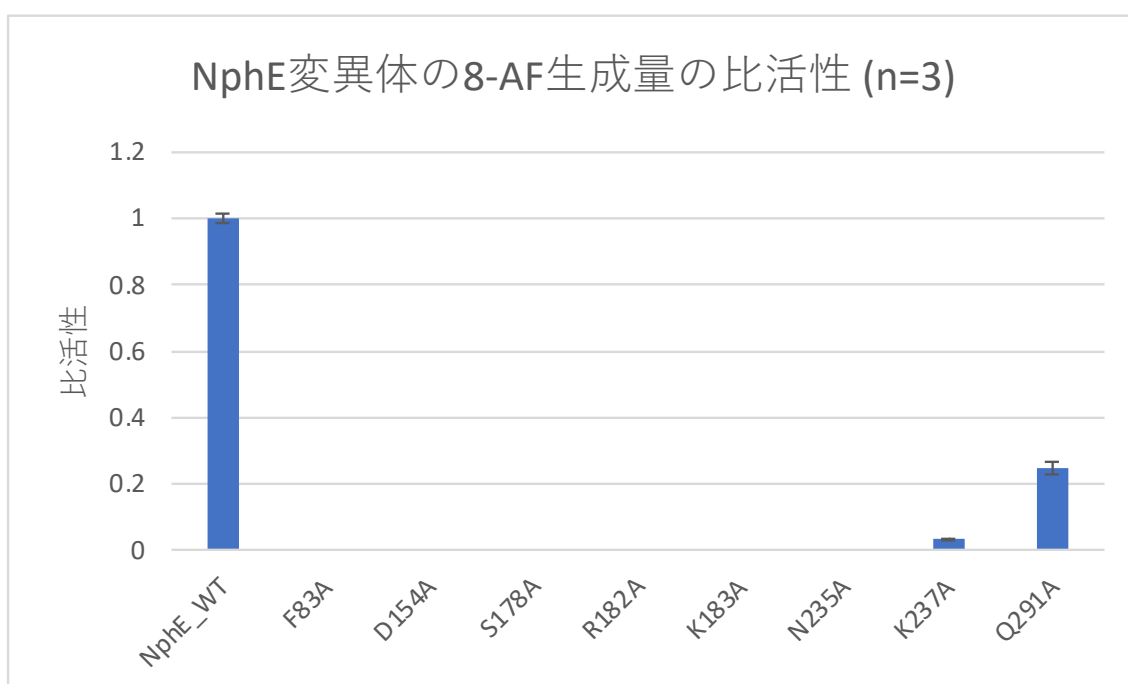


図 1-20 NphE 変異体の比活性

野生型の NphE の 8-AF 生成活性を 1 として各変異体の比活性を求めた。

第4節 考察

本章では L-Glu から Mompain へのアミノ基転移反応と酸素による PMP-mompain adduct の酸化反応の両方を触媒する新規二機能性 PLP 依存性酵素 NphE の反応機構を生化学および計算化学の両面から明らかにした。

NphE の反応においては、まず NphE 活性中心の Lys183 に結合した PLP によって形成された PLP-NphE complex (極大吸収 $\lambda_{\max} \approx 414$ nm) とのアミノ基交換によって PMP (極大吸収 $\lambda_{\max} \approx 323$ nm) が形成される。次に PMP のアミノ基が Mompain の 1 位のカルボニル炭素に求核攻撃をして、脱水を伴ってイミンへと変化し、続く脱プロトン化によって非常に長い共役系を有するキノノイド中間体である PMP-mompain adduct (極大吸収 $\lambda_{\max} \approx 610$ nm) を生成する。さらに PMP-mompain adduct の mompain 部分の 3 位の炭素から酸素への一電子移動と再結合によってペルオキシ中間体(R-OOH)が発生し、過酸化水素の脱離とケトエノール互変異性、Lys183 による 8-AF の切り出しが起り、NphE の internal aldimine が再生することで「酸化的アミノ基転移」が達成され、反応サイクルが回転していく(図 1-2 1)。通常の PLP 依存性酵素によるアミノ基転移ではアミノ基供与体の二電子酸化 (アミノ基→ケト基) に伴って、アミノ基受容体 (ケト基→アミノ基) が二電子還元されており、反応の収支としては redox neutral に保たれている。一方で「酸化的アミノ基転移」においてはアミノ基供与体の二電子酸化 (アミノ基→ケト基) は同様に起こるものの、アミノ基受容体 (NphE では Mompain) の酸素による二電子酸化も受けることで酸化数が変化しない (Mompain→8-AF)。

通常、PLP 依存性アミノ基転移酵素のキノノイド中間体が 500 nm 程度の極大吸収であり、比較的長い共役系を有する Pectamycin 生合成酵素の PctV のキノノイド中間体が 580 nm の極大吸収を有する⁹⁰ ことを考えると 610 nm という吸収波長は非常に長く、これは PMP-mompain adduct の非常に長い共役系により HOMO-LUMO ギャップが小さくなり、励起エネルギーが低下することに起因していると考えられる。また序論の図 0-8 で述べた様に、キノノイド中間体は一般的にアニオン性の共鳴構造の寄与が存在する。NphE の場合にはキノノイド中間体がより多くの共鳴構造の寄与により安定化され、PMP-mompain adduct の mompain 部分の 3 位のアニオン性が高まり、ここで酸素への一電子移動が起こりやすくなっていると考えられる(図 1-2 2)。序論で述べた様に酵素反応における酸素への一電子移動にはカルバニオンの存在が重要であることからこの考えは支持される。平衡反応であるアミノ基転移反応において、高度に安定化されたキノノイド中間体が存在することで、平衡がキノノイド中間体へと偏る。これによってアミノ基を有する生成物が単純に切り出されるのではなく、酸素とキノノイド中間体との反応が起こることによってのみ非可逆的な生成物 (ここでは 8-AF) の切り出しを可能にしているのだと推測される。

Flaviolin を基質にした場合にはアミノ基を有する生成物が検出されないことは当研究室の機具によって明らかにされていたが (機具章太博士論文, 2012)、Flaviolin を基質にした場合にもキノノイド中間体 (PMP-flaviolin adduct) 由来と考えられる反応液の水色の呈色は観測され、Mompain を基質にした場合と比べてはるかに長い時間、反応液の水色の呈色は維

持された (図 1-2 3)。このことからキノノイド中間体と酸素との反応性には Mompain の 8 位のヒドロキシ基の存在 (図 1-2 4) が重要なのではないかと推察され、今後、計算化学も合わせた詳細な解析を行なっていくことで 8 位のヒドロキシ基の重要性がより明らかになっていくと期待される。

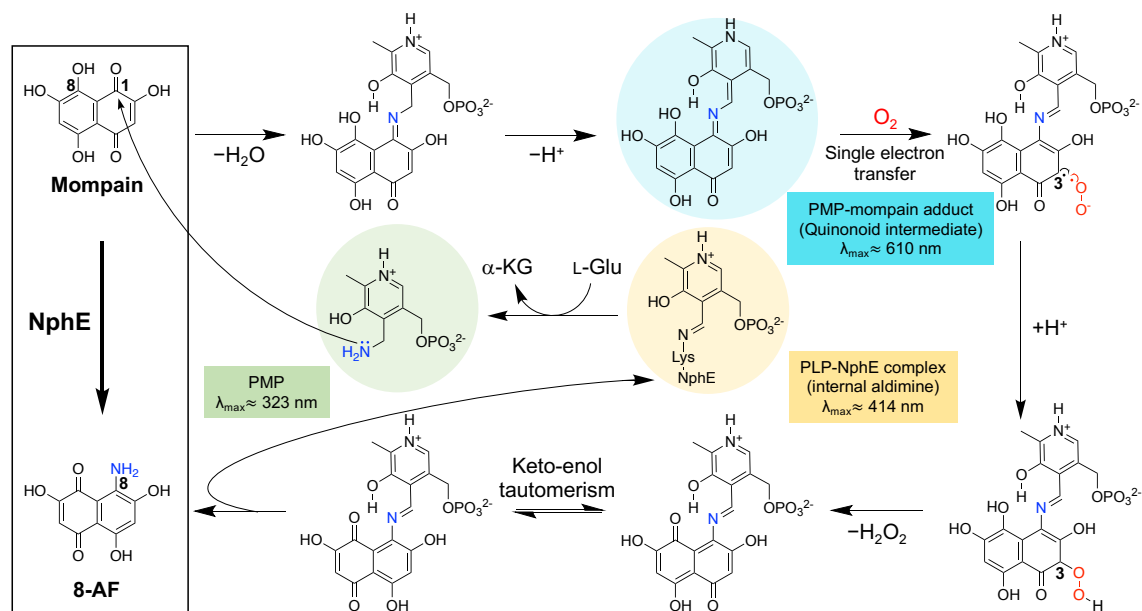


図 1-2 1 今回明らかにした NphE の反応機構

L-Glu 依存的な PMP の生成、PMP と Mompain の脱水縮合による PMP-mompain adduct の生成、そして酸素による PMP-mompain adduct の分解と 8-AF の Lys183 による切り出しによる NphE による「酸化的アミノ基転移」の反応機構を示した。

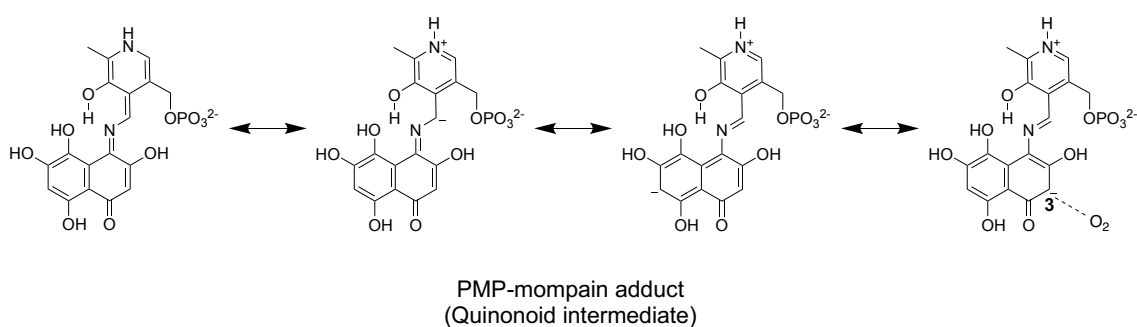


図 1-2 2 NphE のキノノイド中間体におけるカルバニオン共鳴構造

PMP-mompain adduct が共鳴安定化されることで 3 位の炭素がアニオン性を帯び、酸素への一電子移動が起こりやすくなっていると考えられる。

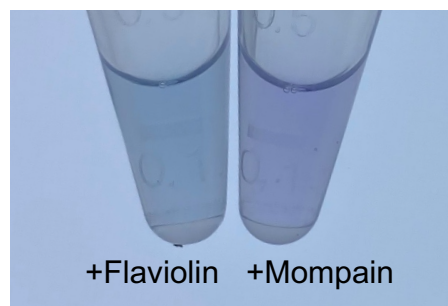


図 1-2 3 Flaviolin および Mompain を基質にした場合の NphE 反応液 (反応 4 時間後)
 Flaviolin を基質にした場合 (左)にも NphE 反応液が水色へと変化し、Mompain の場合 (右)と比べて非常に長い時間水色を呈し続けた。この水色は PMP-flaviolin adduct に由来すると考えられ、Mompain の場合に予測されるその後の一電子移動が進行しないために、水色のまま留まっていたと考えられる。

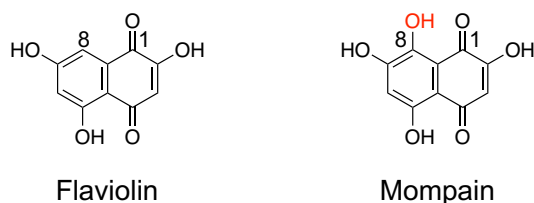


図 1-2 4 Flaviolin と Mompain の構造比較

Flaviolin と Mompain の構造式を比較した。8 位のヒドロキシ基のみが両者の違いである。

PLP 依存性アミノ基転移酵素の系統樹解析の結果、NphE は DegT/DnrJ/EryC1/StrS アミノ基転移酵素ファミリーと近縁であることがわかった (図 1-2 5)。DegT/DnrJ/EryC1/StrS アミノ基転移酵素ファミリーに属する酵素はアミノ糖の生合成酵素など、六員環の化合物をアミノ基受容体として用いる場合が多い。アミノ酸の共役ケト酸をアミノ基受容体として用いる通常のアミノ基転移酵素と異なり、立体的に嵩高いアミノ基受容体として用いるこのファミリーから NphE が派生して進化したと推察される。他の酸素を用いる PLP 依存性酵素はそれぞれ系統的に離れて偏在していることから、酸素を用いる PLP 依存性酵素はそれぞれ別々に収斂進化してきたという説が提唱されている²⁰。DegT/DnrJ/EryC1/StrS アミノ基転移酵素ファミリーにも酸素を用いる酵素は存在しないため、今回の結果もこの仮説と一致するものとなっている。カルバニオン性のキノノイド中間体が発生する PLP 依存性酵素は内在的に酸素との反応性が高く、酵素の構造上、酸素がキノノイド中間体にアクセスできるようになった時に酸素との反応が起こると考えられる。カルバニオン性の中間体を有する酵素において酸素との副反応が観測されること⁹¹からも PLP 依存性酵素の内在的な酸素との反応性が窺える。

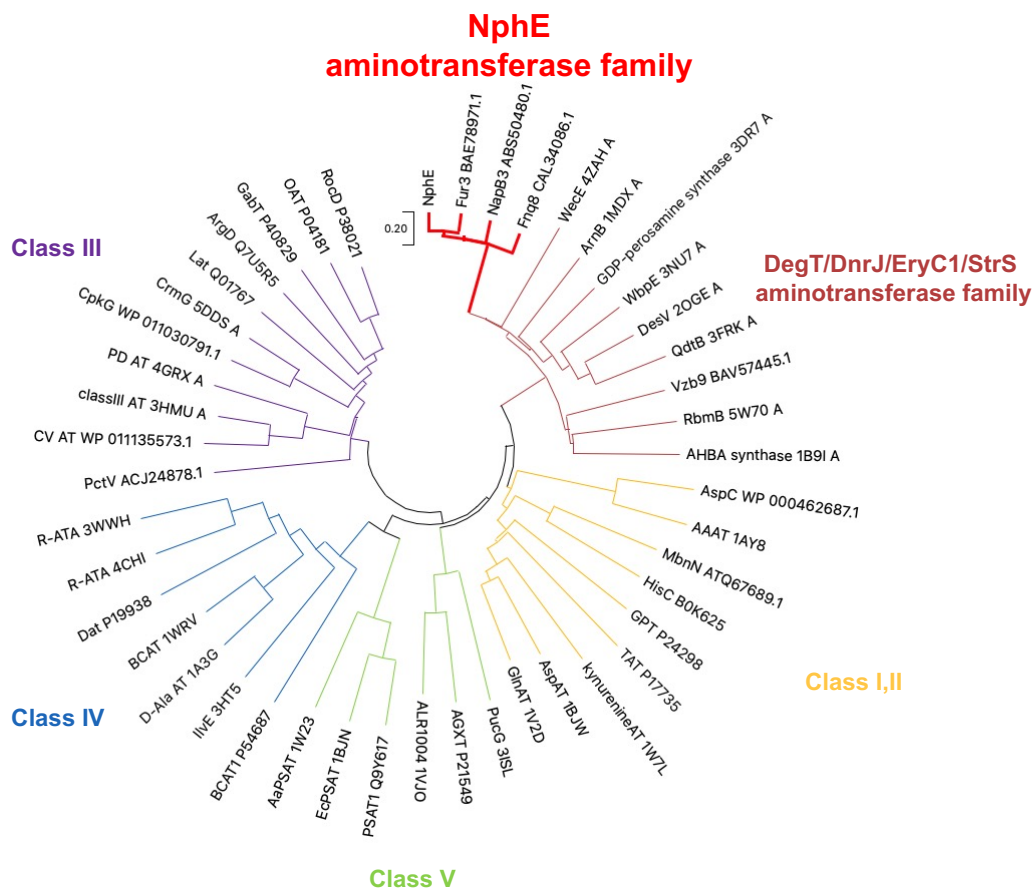


図 1-25 PLP 依存性アミノ基転移酵素の系統樹

NphE を含めた PLP 依存性アミノ基転移酵素の系統樹を最近傍法で作成した。酵素名の後に accession number を示した。

第2章 還元的脱アミノ化機構の解明とその生理的意義

序論で述べたように放線菌のメロテルペノイド生成においては共通の生合成中間体 8-AF から最終産物までの変換の過程で8位のアミノ基が水素原子に置換されており、還元的脱アミノ化が起きていることがわかる (図 2-1)。本章ではこの還元的脱アミノ化のメカニズムとメロテルペノイド生成の生理的意義について述べる。

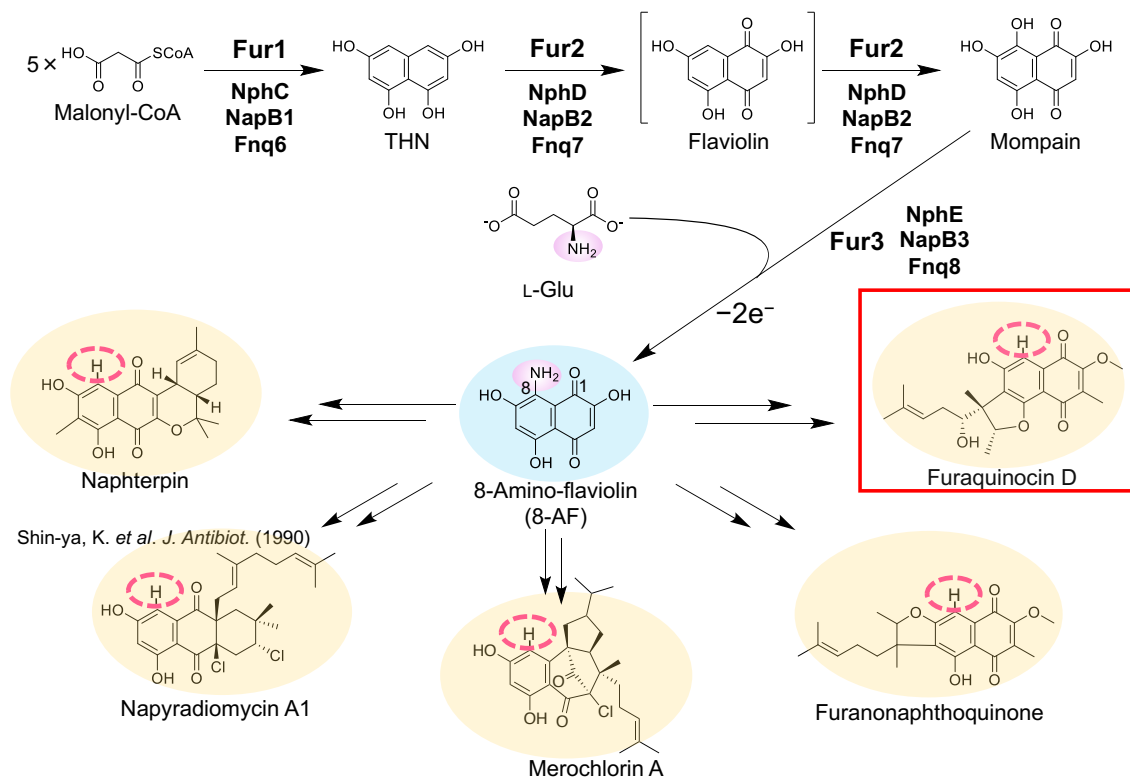


図 2-1 放線菌のメロテルペノイド生合成における還元的脱アミノ化反応

8-AF から最終産物に至る過程でアミノ基が水素原子に置換される還元的脱アミノ化が起こる。

これらメロテルペノイドの中でも異種発現系が確立されていた Furaquinocin を対象として用い、研究を進めることにした。Furaquinocin は放線菌 *Streptomyces* sp. KO-3988 によって生産されるメロテルペノイドであり、抗腫瘍活性を示す^{4,5}。Furaquinocin の生合成遺伝子クラスターは上で述べたように川崎らによって既に報告されており、21 個の ORF からなる (表 2-1、図 2-2)¹⁰。ポリケタイド骨格の生合成に関しては当研究室の磯貝により、5 分子の Malonyl-CoA を開始基質として Fur1 により生成した THN が Fur2 により Mompain へと酸化され、Mompain はさらに NphE ホモログである Fur3 により 8-Amino-flaviolin (8-AF) へと変換されることが明らかにされている¹⁴。一方当研究室の熊野により Fur7 の生理的基質として 2-Methoxy-3-methylflaviolin (MMF) が同定され、Fur7 反応産物として 6-Prenyl-2-

methoxy-3-methylflaviolin (Fur-P1)が決定されている⁹²。また当研究室の工藤によって 6-Prenyl-2-methoxy-3-methylflaviolin (Fur-P1)が Fur21 によって環化して Furaquinocin C を生成することが明らかにされていた (工藤慧博士論文, 2018)。しかしながら、8-AF から MMF への変換の詳細は明らかにされてこなかった。当研究室の山本による遺伝子破壊実験から *fur4*, 5, 6, 16, 17 がこの変換に関与していることが示唆されており (山本秀明修士論文, 2010、図 2-3)、これらの遺伝子がコードする酵素を精製して *in vitro* 再構成によってこの生合成機構を明らかにすることを目指した。

表 2-1 Furaquinocin 生合成遺伝子クラスターに含まれる ORF の推定アミノ酸配列の
 相同性検索結果

Gene	Amino acids	Proposed function	Sequence similarity (protein, origin)	Similarity / Identity (%)	Protein accession number
Fur1	356	Type III polyketide synthase	RppA, <i>Streptomyces antibioticus</i>	95/91	BAB91443
Fur2	188	Quinone forming monooxygenase	MomA, <i>Streptomyces antibioticus</i>	87/81	BAD89290
Fur3	385	PLP dependent aminotransferase	NphE, <i>Streptomyces</i> sp. CL190	88/80	BAM67036
Fur4	331	SAM dependent O-methyltransferase	Fmq9, <i>Streptomyces cinnamomensis</i>	88/77	CAL34087
Fur5	528	fatty-acid-CoA ligase	NapB4, <i>Streptomyces</i> sp. CNQ525	85/74	ABS50451
Fu6	357	SAM dependent C-methyltransferase	Fmq27, <i>Streptomyces cinnamomensis</i>	87/78	CAL34105
Fur7	307	prenyltransferase	Fmq26, <i>Streptomyces cinnamomensis</i>	81/66	CAL34104
Fur8	434	cytochrome P450	cytochrome P450, C-methyltransferase	50/33	ZP_10449418
Fur15	324	Acetoacetyl CoA synthase	NphT7, <i>Streptomyces</i> sp. CL190	81/73	D7URV0
Fur16	652	N-monooxygenase	CreE, <i>Streptomyces cremeus</i>	69/59	CAL34098
Fur17	484	Nitrosuccinate lyase	CreD, <i>Streptomyces cremeus</i>	67/59	CAL34099
Fur18	209	hypothetical protein	NapU1, <i>Streptomyces</i> sp. CNQ525	64/46	ABS50476
Fur19	352	GPP synthase	Fmq23, <i>Streptomyces cinnamomensis</i>	80/71	CAL34101
Fur20	282	undecaprenyl diphosphate synthase	<i>Streptomyces davawensis</i> JCM 4913	97/91	CCK32344
Fur21	398	SAM dependent C-methyltransferase	Fmq27, <i>Streptomyces cinnamomensis</i>	75/60	CAL34105

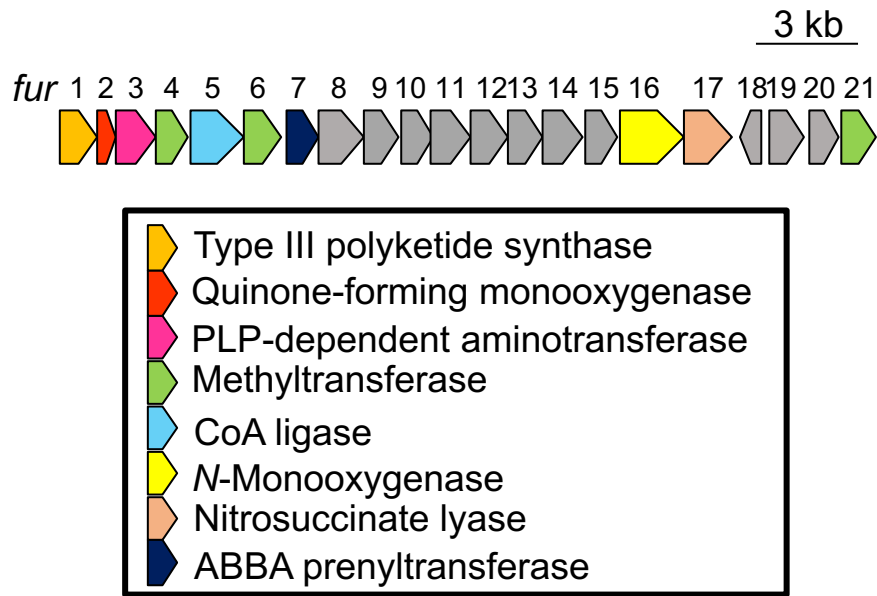


図 2-2 Furaquinocin 生合成遺伝子クラスター

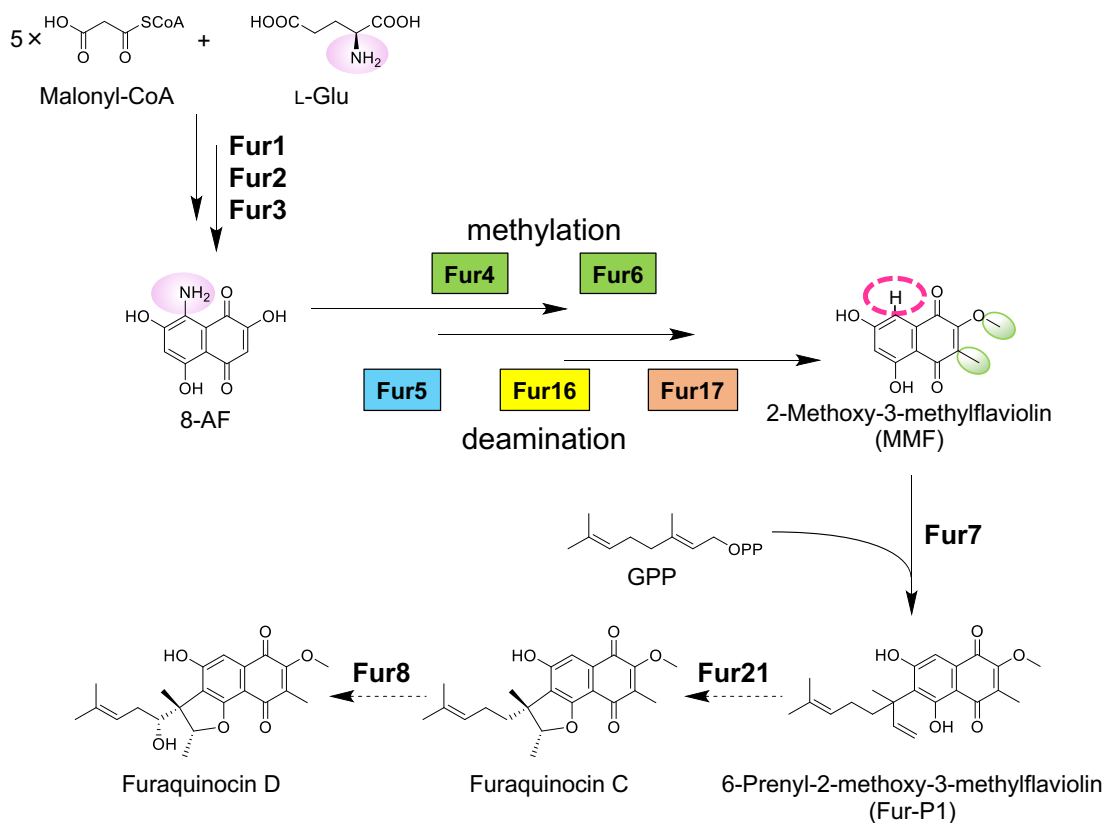


図 2-3 これまで推定されていた Furaquinocin の生合成機構

8-AF から MMF への変換においては *fur4,5,6,16,17* の関与が遺伝子破壊実験から示唆されていた。

修士課程までの研究においては ANS 経路⁵⁹の CreE, D のホモログである Fur16, 17 が亜硝酸を生成することを示した。また Fur6, Fur4 がそれぞれ 3 位のメチル化と 2 位のヒドロキシ基のメチル化に関与すること、Fur5 を可溶性酵素として精製できなかったために代わりに用いた Naphterpin 生合成クラスター中の Fur5 ホモログの NphH がジアゾ化に関与し、ジアゾ基は窒素ガスとして放出されることが示唆されていた。しかし、Fur16,17 による亜硝酸生成は効率よく進行したものの、Fur6,4 のメチル化反応効率は低く、また NphH についても安定性が低く、反応効率は非常に低かった (図 2-4)。そのため、本来 Furaquinocin 生合成酵素である Fur5 を安定的に取得できる条件を検討し再度生合成経路を再検証することにした。

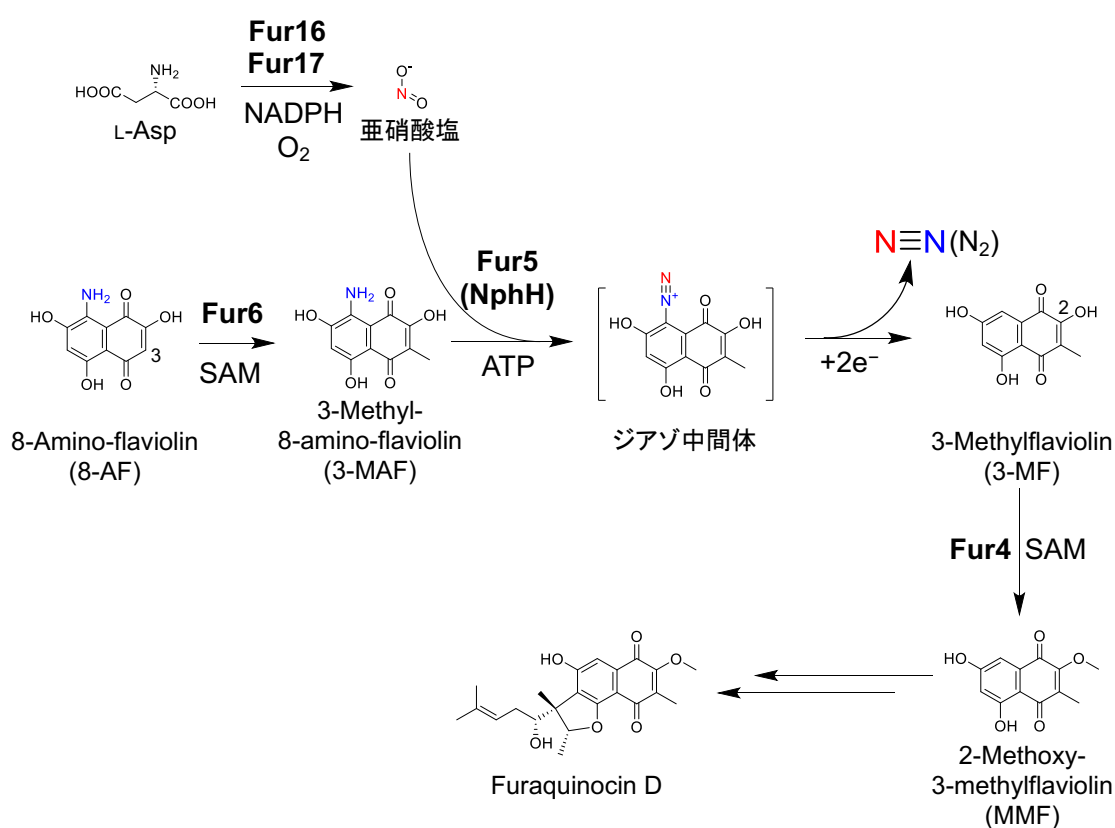


図 2-4 修士課程までの研究で推定された Furaquinocin の生合成経路

Fur16,17 によって L-Asp から亜硝酸が生成すること、また、Fur6, NphH (Fur5 ホモログ), Fur4 によって 8-AF から MMF までの変換は達成していたものの、いずれの反応も効率が悪かった。

第2節 Fur5 の機能解析

第1項 3-MAF および 8-AF を基質にした Fur5 の *in vitro* 反応

Fur5 は 3-MAF を基質にする可能性と 8-AF を基質にする可能性が考えられ、両方を基質に用いて反応を比較解析した。反応条件は修士課程の NphH の反応において 3-MAF のジアゾ化が検出された条件を参考に ATP、MgCl₂、亜硝酸を含む表 2-3 のような条件で反応を行い、反応液と当量のメタノールでクエンチした遠心上清を、UV-可視吸光スペクトルと MS データを同時に取得可能な PDa-QDa 解析に供した。

その結果 3-MAF を基質にした場合にはほとんど消費が見られなかったものの (図 2-7 下から 3,4 段目)、8-AF を基質にした場合には、8-AF 由来の紫色の顕著な減少が目視でも確認でき (図 2-6)、確かにクロマトグラムにおいても 8-AF の顕著な減少が確認できた (図 2-7 の下から 1,2 段目)。これらのことから 8-AF が Fur5 の生理的な基質であることが強く示唆された。一方 8-AF を基質とした際には、Fur5 依存的に Flaviolin (8-AF が還元的脱アミノ化した化合物) の他、化合物①、化合物②の生成が検出でき、それぞれ *m/z* 233 と *m/z* 235 の化合物であった。なお、この化合物①、化合物②は ATP、MgCl₂、亜硝酸、Fur5 依存的に生成する (図 2-8) ことから、化合物①と②はそれぞれ、ジアゾ基を有する 8-Diazoflaviolin とそのキノン部位がヒドロキノンに還元された 2,4,5,7,8-Pentahydroxynaphthalene-1-diazonium (PND) であると推測された。

表 2-3 Fur5 の反応系

Reaction Mixture	
100 mM	HEPES-NaOH pH 7.5
100 μM	8-AF or 3-MAF
(1 mM	ATP)
(5 mM	MgCl ₂)
(1 mM	NaNO ₂)
(2 μM	Fur5)
Total 100 μL	30°C 1 h



図 2-6 8-AF を基質にした Fur5 反応後の様子

反応 1 時間後には反応液の紫色はほとんど消失している様子が観測された。

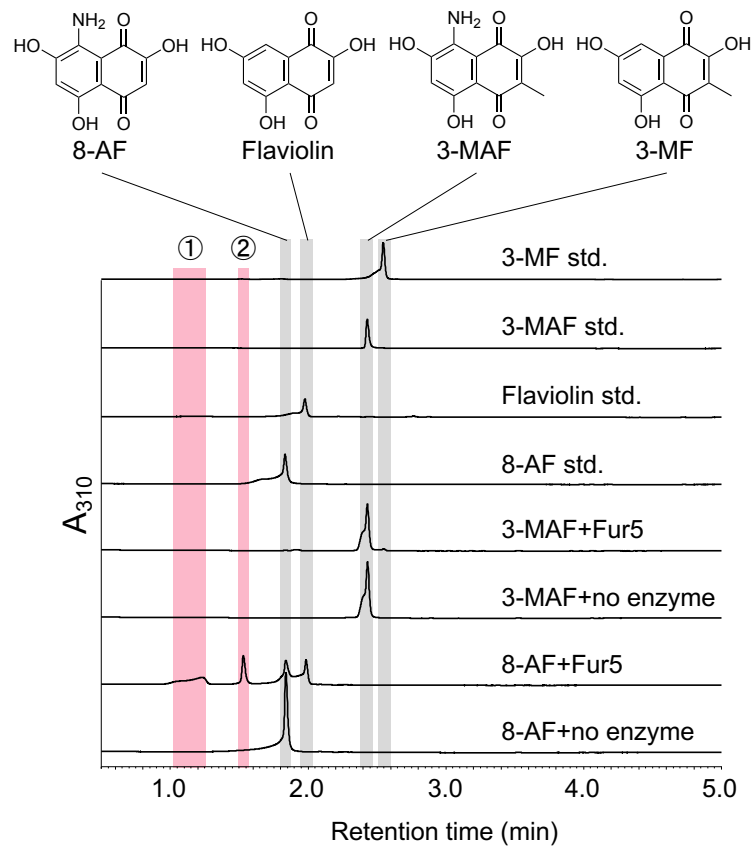


図 2-7 Fur5 反応のクロマトグラム (310 nm の吸収波長)

下から順に 8-AF を基質にして Fur5 を加えていない系 (下から一段目) と加えた系 (下から二段目)、3-MAF を基質にして Fur5 を加えていない系 (下から三段目) と加えた系 (下から四段目) のクロマトグラムを表している。

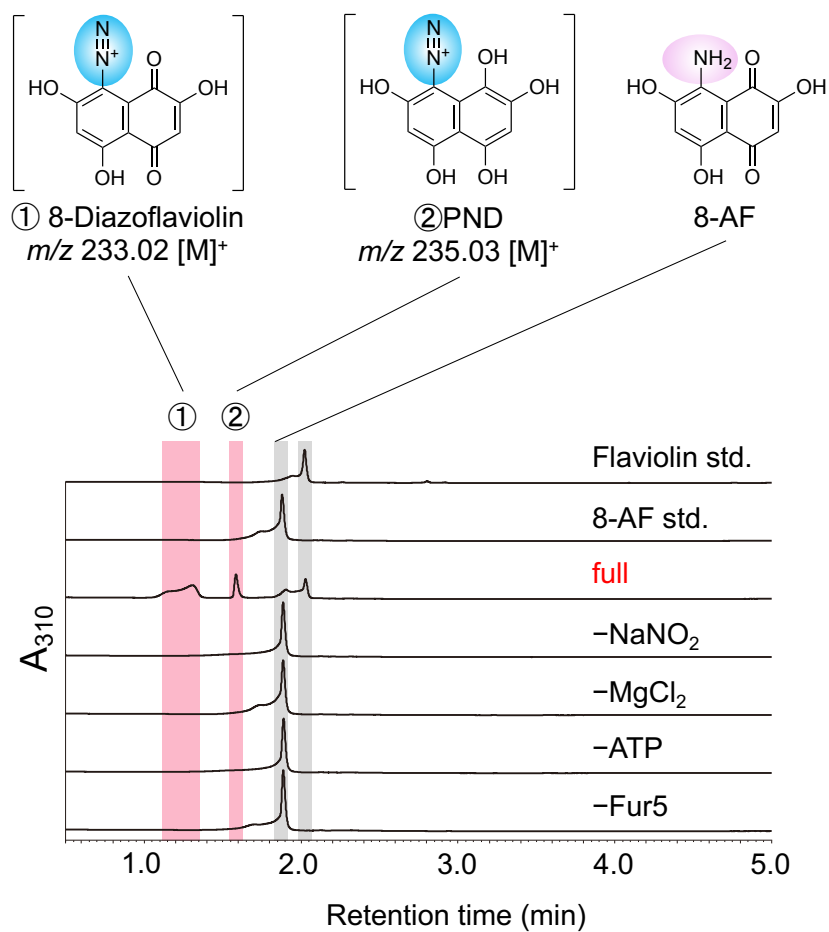


図 2-8 各要素を除いた際の Fur5 の反応 (310 nm の吸収波長)

下から順に Fur5、ATP、MgCl₂、亜硝酸ナトリウムを除いた条件のクロマトグラム。full のクロマトグラムの条件では 8-AF を基質にした場合の表 2-3 の全ての反応要素が含まれている。

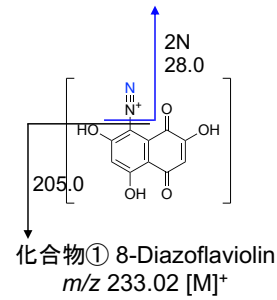
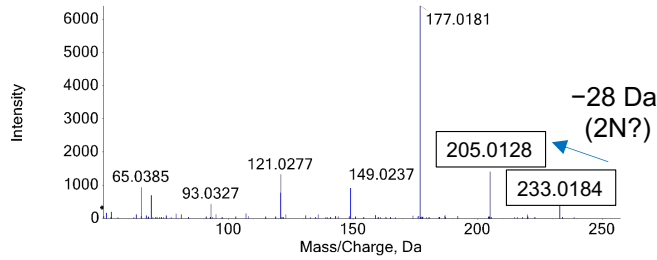
第2項 ^{15}N 標識した亜硝酸を用いた Fur5 の反応

前項で化合物①、化合物②が検出された条件において、亜硝酸を ^{15}N 標識した亜硝酸に置き換えて 8-AF を基質とした表 2-4 の条件で反応を行い、反応液と当量のメタノールで反応クエンチした遠心上清を LC-MS/MS 解析に供した。その結果、 m/z が 1 ずつ増えた化合物①、②が生成し、ジアゾ基由来と考えられる m/z 28 の MS/MS フラグメントイオンも m/z 29 となり m/z が 1 増えていた (図 2-9、図 2-10)。これらのことから化合物①、②がジアゾ基を有していることが明らかとなり、化合物①は 8-AF のアミノ基がジアゾ基に変換された 8-Diazoflaviolin、化合物②は化合物①のキノンがヒドロキノンに変換された PND であることが強く示唆された。

表 2-4 ^{15}N 標識した亜硝酸を用いた Fur5 の反応系

Reaction Mixture	
100 mM	HEPES-NaOH pH 7.5
100 μM	8-AF
1 mM	ATP
5 mM	MgCl ₂
1 mM	Na ¹⁵ N ₂ O
2 μM	Fur5
Total 100 μL	30°C 1 h

Spectrum from 8-AF+Fur5.wiff (sample 1)...5, +TOF MS² (50 - 1000) from 1.910 min
Precursor: 233.0 Da, CE: 30.0



Spectrum from 8-AF+Fur5+Na¹⁵NO₂.wiff (... +TOF MS² (50 - 1000) from 1.910 min
Precursor: 234.0 Da, CE: 30.0

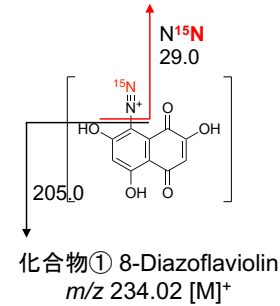
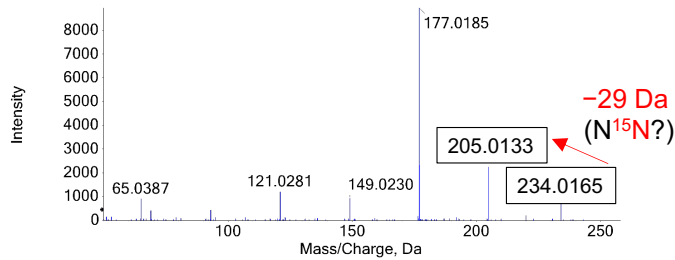
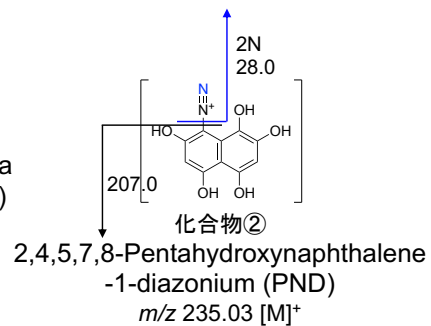
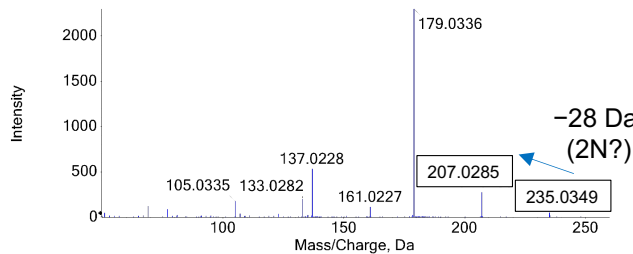


図 2-9 化合物①の MS/MS フラグメント

¹⁵N 標識した亜硝酸を用いることで m/z が 1 大きくなった化合物①が確認でき、ジアゾ基由来と考えられるフラグメントイオンも 1 大きくなっていった (29 Da のフラグメント)。

Spectrum from 8-AF+Fur5.wiff (sample 1)...3, +TOF MS² (50 - 1000) from 1.611 min
Precursor: 235.0 Da, CE: 30.0



Spectrum from 8-AF+Fur5+Na¹⁵NO₂.wiff (... +TOF MS² (50 - 1000) from 1.607 min
Precursor: 236.0 Da, CE: 30.0

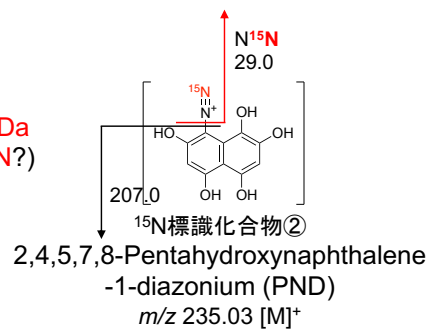
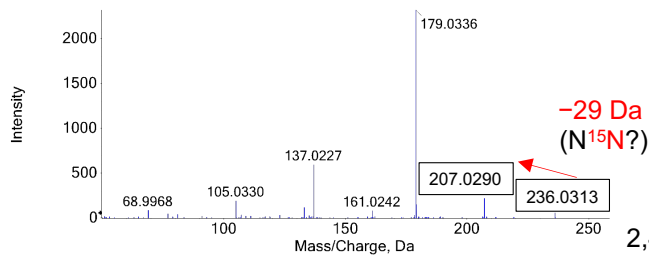


図 2-10 化合物②の MS/MS フラグメント

¹⁵N 標識した亜硝酸を用いることで m/z が 1 大きくなった化合物②が確認でき、ジアゾ基由来と考えられるフラグメントイオンも 1 大きくなっていった (29 Da のフラグメント)。

第3項 ジアゾ化合物の経時的な分解

Fur5 による反応では、8-AF が還元的脱アミノ化した Flaviolin も検出されていた (図 2-7)。Flaviolin はジアゾ化合物の分解によって生じているのではないかと考え、反応のサンプル反応液と当量のメタノールでクエンチした遠心上清を反応直後に分析した場合と、分析バイアル中のサンプルを常温で 1 日静置したのちに分析した場合とで比較した。反応は表 2-5 の条件で行った。その結果、反応後 1 日経過したサンプルでは 8-Diazoflaviolin や PND はほとんど検出されず、その一方で Flaviolin の顕著な蓄積が確認できた (図 2-11)。一般にジアゾ基を有する化合物は不安定であるため、Fur5 の反応によって生じたジアゾ化合物は窒素ガスの脱離によって非酵素的に Flaviolin へと変換されていったと考えられる。

表 2-5 Fur5 による反応系

Reaction Mixture	
100 mM	HEPES-NaOH pH 7.5
100 μ M	8-AF
1 mM	ATP
5 mM	MgCl ₂
1 mM	NaNO ₂
2 μ M	Fur5
Total 100 μ L	30°C 1 h

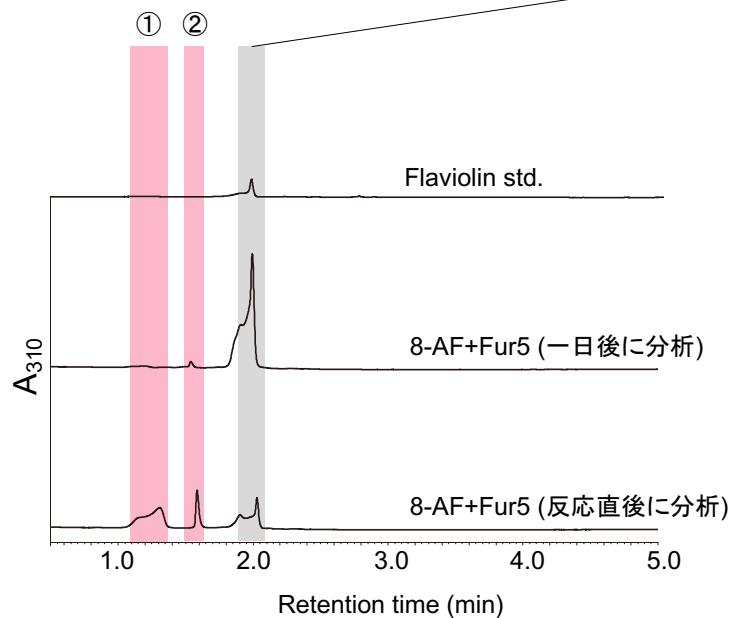
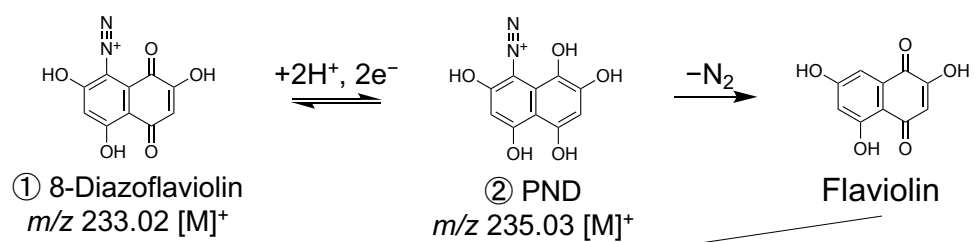


図 2-1 1 Fur5 の反応後のジアゾ化合物の時間経過による分解

8-AF を基質とした Fur5 の反応系を反応直後に分析したクロマトグラム (下から一段目)と一日後に分析したクロマトグラム (下から二段目)の比較。

第4項 Fur5によるATPの消費

Fur5の反応においてATPが必要なことは前節までで明らかとなったが、ATPがどのような形態でFur5によって利用されているかは不明である。そこでイオンペア試薬を用いたATP分析系を用いて、ATPがFur5によってどのように変化するか明らかにすることにした。反応は表2-6の条件で行い、反応液と当量のメタノールでクエンチした遠心上清を、イオンペア試薬としてDBAAを用いたHPLC分析に供した。

その結果、Fur5依存的なATPの経時的な消費が確認でき、ATPはAMPへと変換されていることが明らかとなった(図2-12の下から2-6段目)。

また、表2-6の反応系において各要素を除いて反応を行った結果、ATPの消費は全て揃った時のみ観測された(図2-13)。以上のことからFur5の反応においてATPは亜硝酸のアデニル化による活性化に利用されていると推測された。また、8-AFを除いた条件ではATPからAMPへの分解が観測されないことから(図2-12の下から二段目)、8-AFがFur5に先に結合した状態でないとこの活性化は起こらないと考えられた。8-AFの結合によってFur5のコンフォメーションが変化し、ATPが亜硝酸と反応しうる位置に結合すると推察される。

表 2-6 ATP 検出のための Fur5 の反応系

Reaction Mixture	
100 mM	HEPES-NaOH pH 7.5
200 μ M	8-AF
200 μ M	ATP
5 mM	MgCl ₂
1 mM	NaNO ₂
4 μ M	Fur5
Total 100 μ L	30°C 2 h

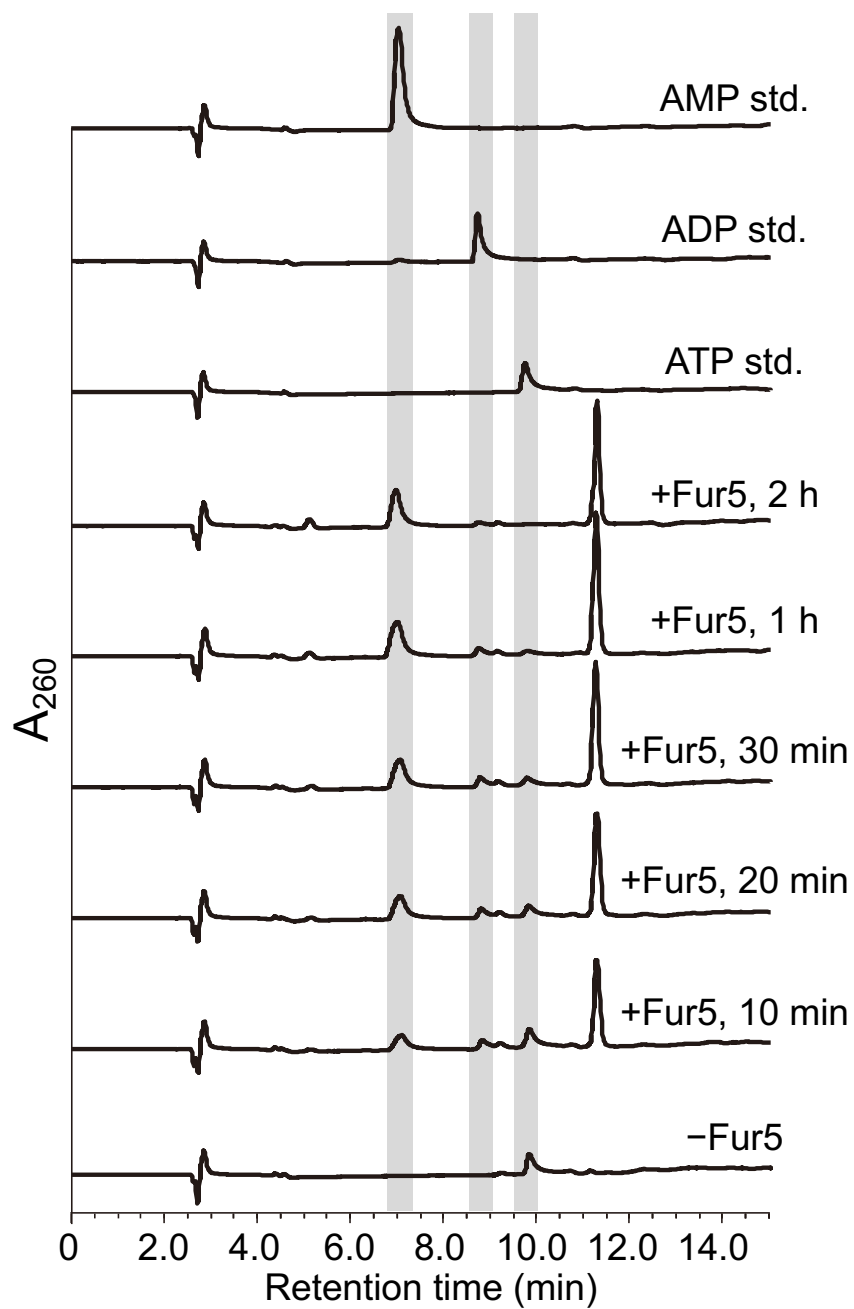


図 2-1 2 Fur5 の反応における ATP の消費と AMP の生成 (260 nm の吸収波長)
 一番下のクロマトグラムは Fur5 を反応系から除いたもので、下からの 2 段目からは Fur5 添加後の反応時間を示している。

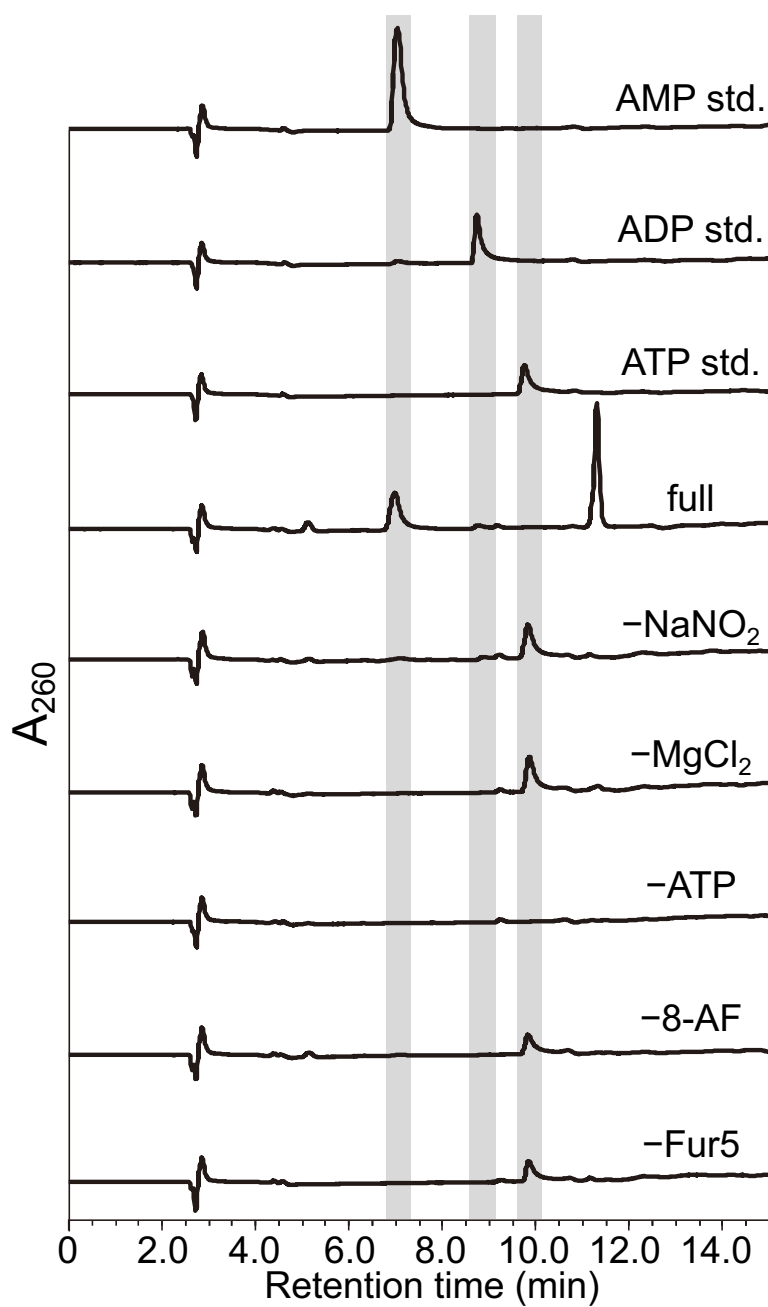


図 2-13 各反応要素を除いた場合の Fur5 による ATP の消費 (260 nm の吸収波長)
 一番下のクロマトグラムから順に Fur5、8-AF、ATP、MgCl₂、亜硝酸ナトリウムを除いた系。Full は表 2-6
 の全ての要素が含まれる条件。

第3節 Fur6 の機能解析と還元的脱アミノ化

第1項 Flaviolin を基質とした Fur6 による反応

前節の Fur5 による反応では、8-AF が脱アミノ化した Flaviolin が検出されており、この化合物がメチル基転移酵素 Fur6 の基質となって 3-Methylflaviolin (3-MF)へと変換されるのではないかと考えられた。そこで Flaviolin を基質として Fur6 による反応の検出を試みた。Fur6 は当研究室の山本によって pHis8 にクローニングしたものを *E. coli*(BL21)に形質転換した株が作製されていたので (山本秀明修士論文, 2010)、これを用いて Fur6 の組換え酵素を調製した。反応系にはメチル基供与体として *S*-アデノシル-L-メチオニン (SAM)を添加した。反応液と当量のメタノールでクエンチした遠心上清を UV-可視吸光スペクトルと MS データを同時に取得可能な PDa-QDa 解析に供した。その結果 Fur6 によって Flaviolin が 3-MF に変換されることはなかった (図 2-14 の下から1段目と4段目)。しかし、予期せず、反応系に Dithionite を添加して同様の反応を行った結果、3-MF の生成が検出できた (図 2-14 の下から3段目と6段目)。このことから Flaviolin のキノン部分が Dithionite によって還元された 1,2,4,5,7-Pentahydroxynaphthalene (PHN)が Fur6 の基質となってメチル化され、空気酸化によって 3-MF が生成したと考えられる。一方 NADPH を添加した場合には 3-MF の生成は確認できず (図 2-14 の下から2段目と5段目)、NADPH は Flaviolin を直接還元することはできなかつたと推察された。

表 2-7 Fur6 の反応系

Reaction Mixture	
100 mM	HEPES-NaOH pH 7.5
100 μM	Flaviolin
1 mM	SAM
(5 mM	Dithionite)
(5 mM	NADPH)
(10 μM	Fur6)
Total 100μL	30°C 1 h

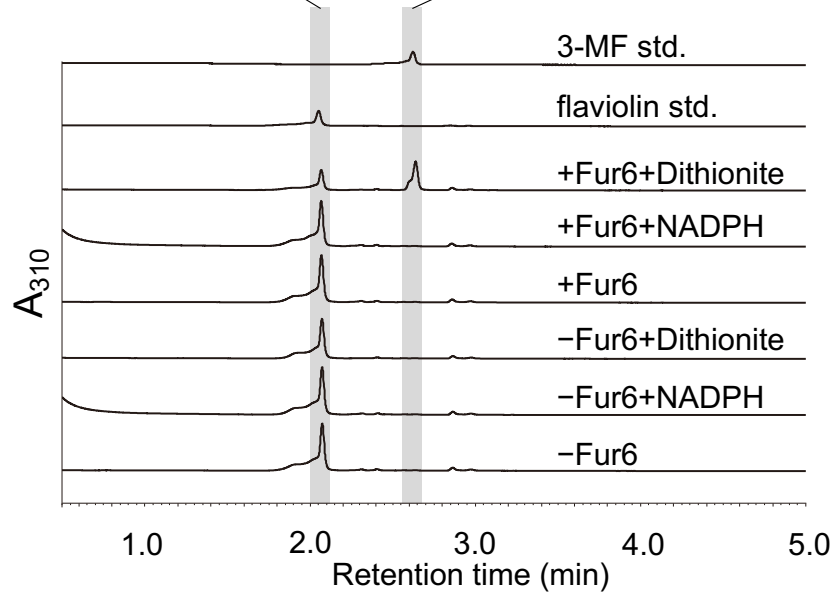
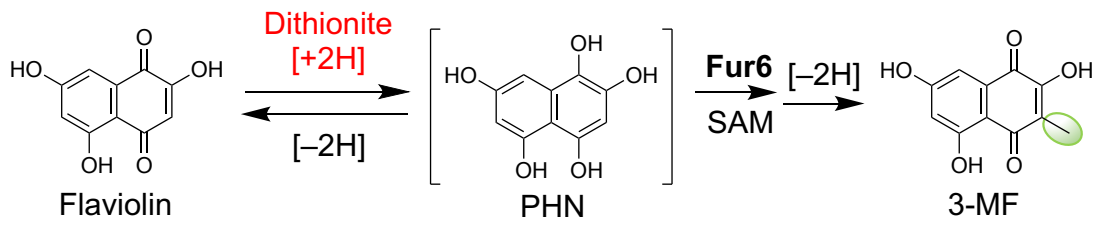


図 2-14 Fur6 の反応のクロマトグラム (310 nm の極大吸収)

下から 1-3 段目は Fur6 を添加していない系、下から 4-6 段目は Fur6 を添加した系のクロマトグラムを表している。Dithionite もしくは NADPH を添加した系にはそれを明記してある。

第2項 8-AFを基質としたFur5, Fur6による連続反応

前項の結果から PHN が Fur6 の基質であることが推測されたが、8-AF から 3-MF に至る過程でどのように PHN が生じているのか明らかではなかった。そこで 8-AF を基質として Fur5,6 による連続反応を行い、3-MF の検出を試みた。Fur5 の補因子として ATP、MgCl₂、亜硝酸ナトリウム、Fur6 の補因子として SAM を用いての条件で反応を行った。反応液と当量のメタノールでクエンチした遠心上清を PDa-QDa 解析に供した。その結果、Fur5,6 のみを添加した場合には 3-MF はほとんど生産されなかった (図 2-15 の下から3段目)。しかし、この系に NADPH を添加したところ、3-MF の生産の顕著な増大が観測でき、NADPH による PND のヒドリド還元の結果生じた PHN が、Fur6 の基質となって 3 位をメチル化し、空気酸化によって 3-MF が生成したと考えられる。8-AF から PHN までの変換は還元的脱アミノ化となっており、Fur5 によるジアゾ化と NADPH によるヒドリド還元によって達成されることが明らかとなった。

表 2-8 Fur5,6 連続反応系

Reaction Mixture	
100 mM	HEPES-NaOH pH 7.5
100 μM	8-AF
1 mM	ATP
5 mM	MgCl ₂
1 mM	NaNO ₂
1 mM	SAM
(2 μM	Fur5)
(1 mM	NADPH)
(2 μM	Fur6)
Total 100 μL	30°C 1 h

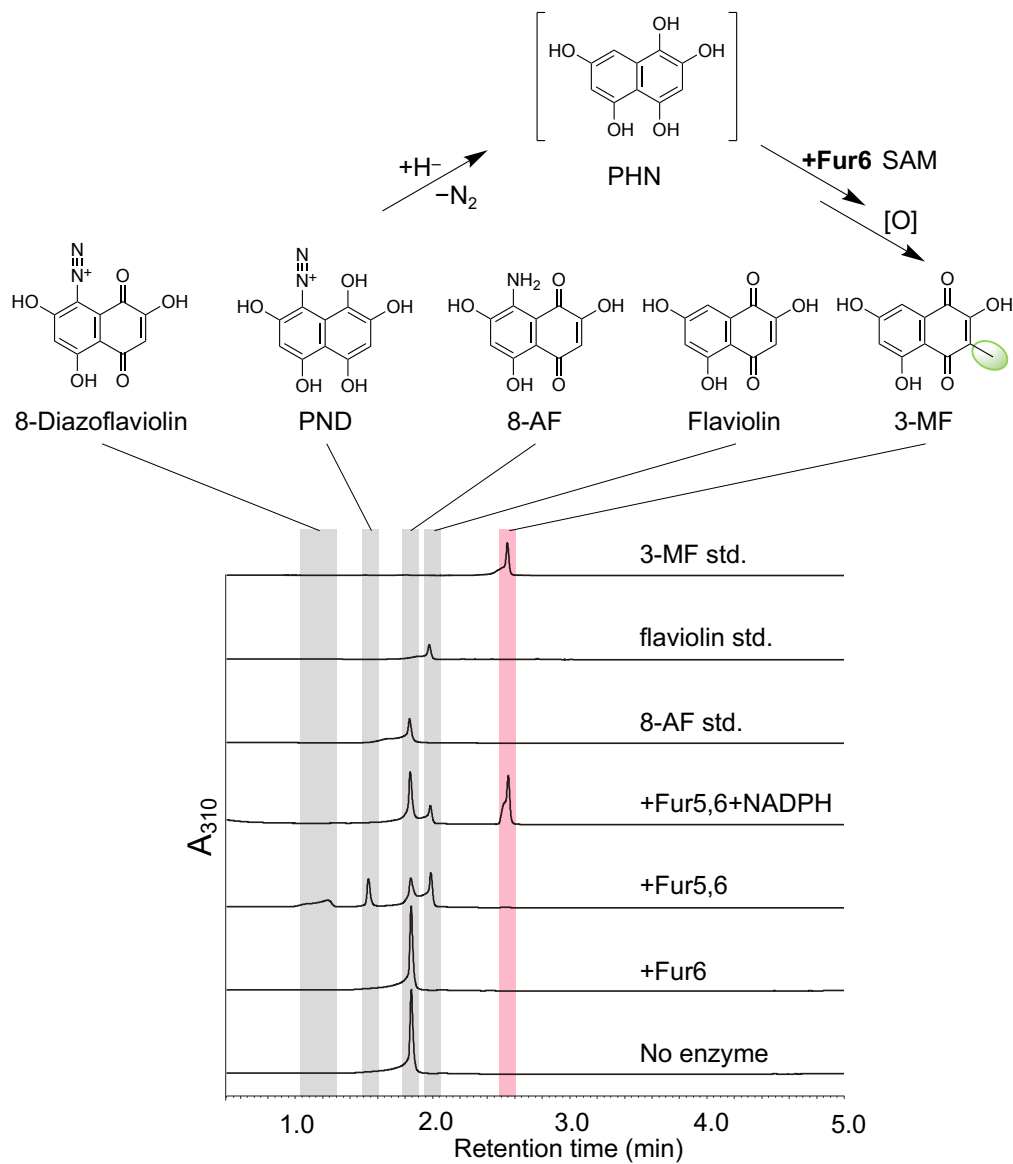


図 2-15 8-AF を基質にした Fur5,6 の連続反応

表 2-8 の反応系にてカッコで括ってある反応要素のうち加えたものを各クロマトグラムの右上に示している (例: +Fur5,6+NADPH では Fur5 と Fur6 と NADPH を加えている)

第3項 限外濾過を用いた Fur5,6 の連続反応

前項で予想された NADPH による PND のヒドリド還元が Fur5 依存的吗どうか調べるため、Fur5 の反応ののち、限外濾過で Fur5 を除去して Fur6 を添加する逐次反応を行うことにした。表 2-9 の Reaction Mixture 1 の条件で反応を行った後に限外濾過 (10 kDa 以上のタンパク質を除去)を行い、Reaction Mixture 2 の条件で反応を行った。反応液と当量のメタノールでクエンチした遠心上清を PDa-QDa 解析に供した。その結果やはり、NADPH が存在する時にのみ Fur6 によるメチル化が起これ (図 2-16 の下から4段目)、このことから Fur5 とは無関係に NADPH によるヒドリド還元は起これ、PHN が生成して Fur6 による3位のメチル化が進行することが明らかとなった。

表 2-9 Fur5,6 の逐次反応

Reaction Mixture 1	
100 mM	HEPES-NaOH pH 7.5
100 μM	8-AF
1 mM	ATP
5 mM	MgCl ₂
1 mM	NaNO ₂
2 μM	Fur5
30°C 1 h	
Reaction Mixture 2	
Reaction Mixture 1 (限外濾過)	
1 mM	SAM
(1 mM	NADPH)
(2 μM	Fur6)
Total 100 μL	30°C 1 h

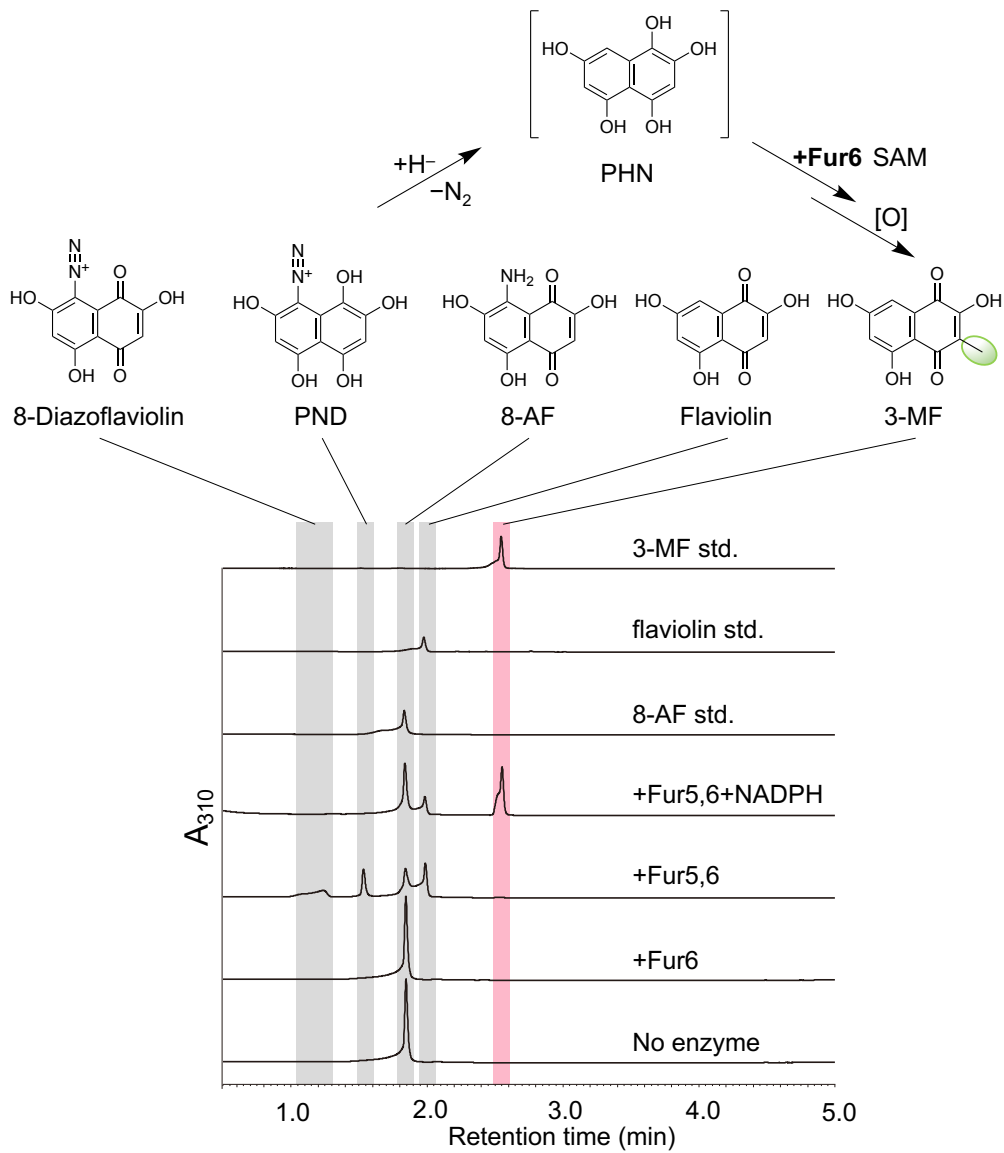


図 2-16 Fur5,6 による逐次反応

Reaction Mixture 2 にてカッコで括ってある反応要素のうち加えたものを各クロマトグラムの右上に示している (例: +Fur6+NADPH では Fur6 と NADPH 両方を加えている)。

第4項 Fur5,6 連続反応と還元剤

前項までの 8-AF を基質にした Fur5,6 連続反応解析を通じて、NADPH の存在によって 3-MF の生産が増大することが確認された。ここでは NADPH の他に還元剤となりうる候補化合物を添加して同様に 3-MF の生成を調べた。反応は表 2-10 の条件で行い、還元剤としては NADPH、NADH、DTT、還元型グルタチオン (GSH)、L-システイン (L-Cys) をそれぞれ添加した系で反応を行った。反応液と当量のメタノールでクエンチした遠心上清を LC-MS/MS 解析に供した。その結果、いずれの還元剤を添加した場合においても、非添加時と比べて (図 2-17 の一番下のクロマトグラム)、3-MF の増大が観測できた。このことから PND から PHN への還元は広範な還元剤によって達成されることが明らかとなった。

表 2-10 還元剤添加する Fur5,6 の連続反応系

Reaction Mixture	
100 mM	HEPES-NaOH pH 7.5
100 μM	8-AF
1 mM	ATP
5 mM	MgCl ₂
1 mM	NaNO ₂
1 mM	SAM
(1 mM	還元剤)
2 μM	Fur6
2 μM	Fur5
Total 100μL	30°C 1 h

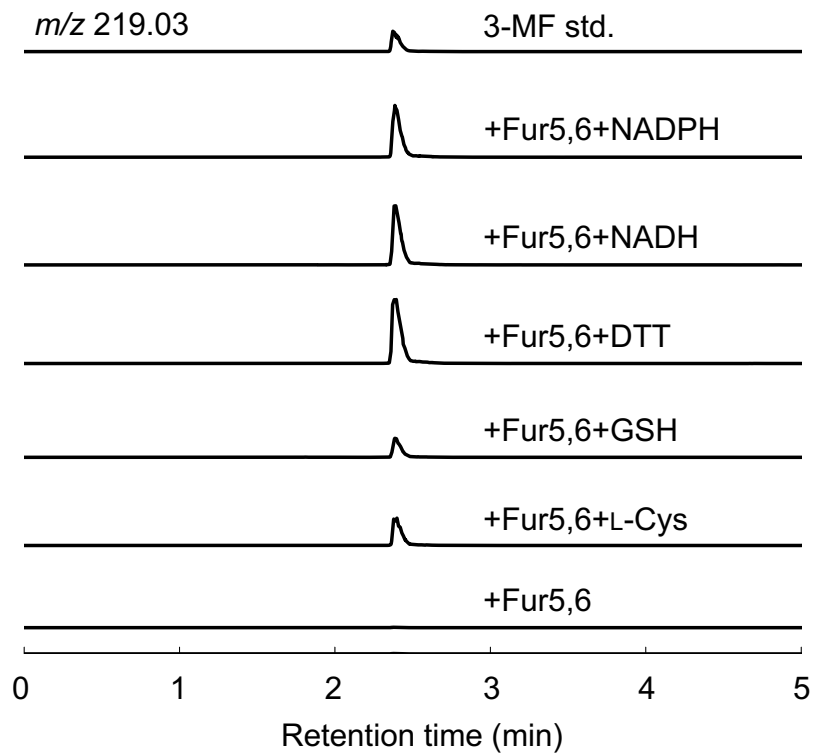
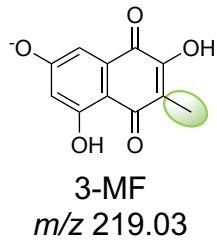


図 2-17 還元剤添加時の Fur5,6 連続反応の LC-MS 分析の XIC クロマトグラム
(m/z 219.03)

下から順に還元剤非添加、L-Cys 添加、GSH 添加、DTT 添加、NADH 添加、NADPH 添加のクロマトグラムを表している。いずれの還元剤の添加によっても 3-MF の生成量は増大した。

第5項 還元的脱アミノ化における還元酵素の関与の検証

前項までの Fur5,6 連続反応解析を通じて、NADPH など生体内小分子による PND の非酵素的な還元による PHN の生成反応を明らかにした。NADPH によって効率的に PND が PHN に変換されることから、NADPH 依存性の還元酵素の関与も考えられた。すでに報告されている KO-3988 株の Furaquinocin 生合成クラスター中¹⁰には還元酵素は見出されなかったが、同じ Furaquinocin 生産株の *Streptomyces reveromyceticus* SN-593 の生合成クラスター⁹⁵には NAD(P)H 依存性デヒドロゲナーゼが存在し、これを FurX と名付けた。なお FurX のホモログは Naphterpin や Furanonapthoquinone のクラスター中にも存在していた (図 2-18)。この FurX が NAD(P)H を用いて PND を PHN へと変換する可能性 (図 2-20)を考えて、Fur5,6 の連続反応に FurX を添加した表 2-11 のような反応系で 3-MF の生成量を比較した。FurX の遺伝子は合成遺伝子を用い、pSE101 にクローニングし、*S. albus* G153 に形質転換した株から Ni-NTA アフィニティクロマトグラフィーによって組換えタンパク質を調製した (図 2-19)。その結果、予想に反して、FurX 添加によって 3-MF の生産は変化しなかった。このことから FurX は Fur5,6 の連続反応には関与せず、NADPH などの生体小分子が非酵素的に PND を PHN に変換することで 8-AF の還元的脱アミノ化が達成されていることが明らかとなった。

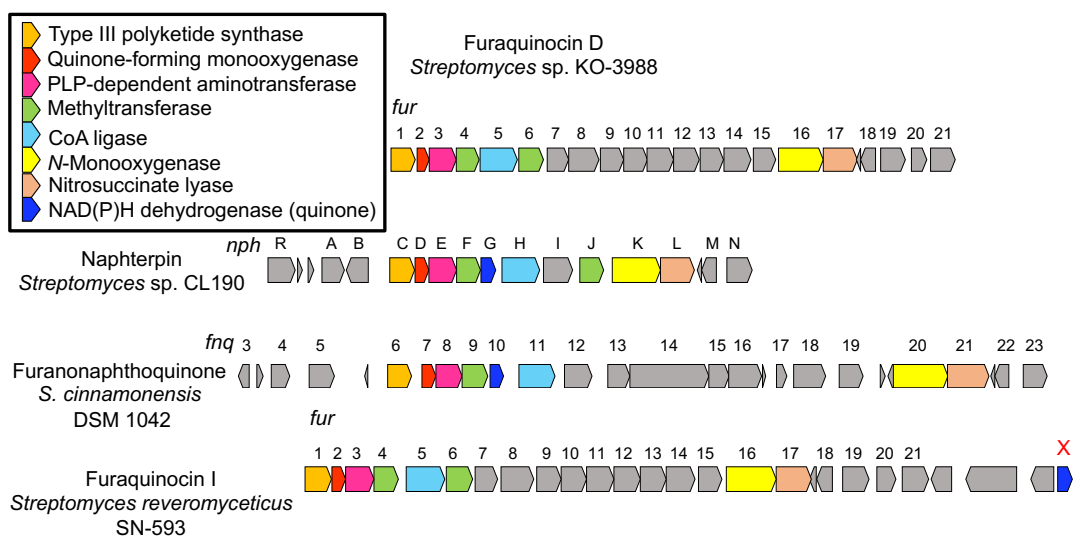


図 2-18 メロテルペノイド生合成クラスターにおける FurX ホモログ

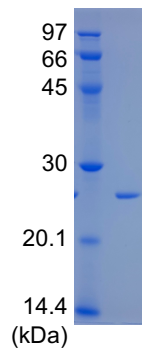


図 2-19 精製した FurX の SDS-PAGE (約 23 kDa)

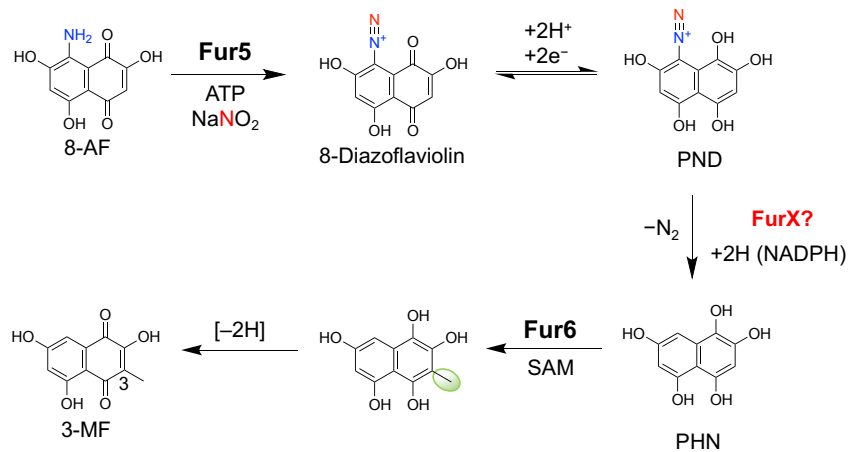


図 2-20 Fur5,6 連続反応における FurX の関与の可能性

表 2-11 Fur5,6,X の反応系

Reaction Mixture	
100 mM	HEPES-NaOH pH 7.5
100 μM	8-AF
1 mM	ATP
5 mM	MgCl ₂
1 mM	NaNO ₂
1 mM	SAM
(2 μM	Fur5)
(1 mM	NADPH or NADH)
(10 μM	FurX)
(2 μM	Fur6)
Total 100 μL	30°C 1 h

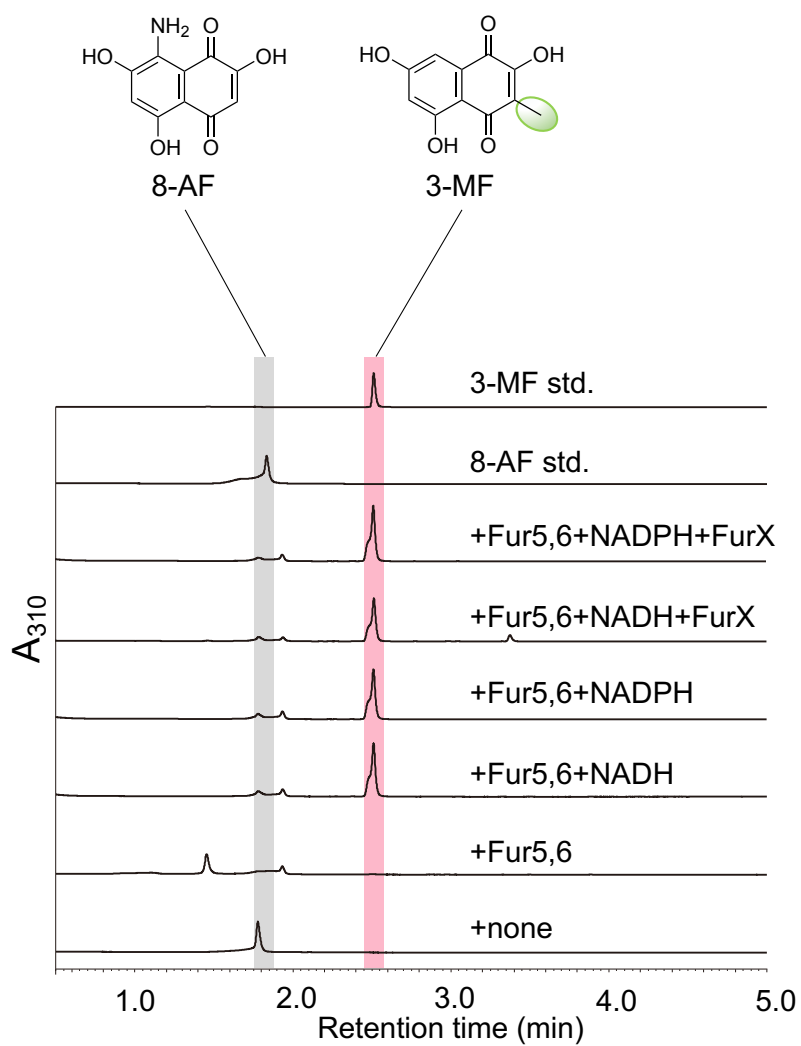


図 2-2 1 Fur5,6 連続反応系における FurX の添加実験 (310 nm の吸収波長)

表 2-1 1 にてカッコで括弧で括弧してある反応要素のうち加えたものを各クロマトグラムの右上に示している (例: +Fur5,6+NADPH+FurX では Fur5、Fur6、FurX および NADPH を加えている)。

第6項 還元的脱アミノ化で発生する窒素ガスの GC-MS による検出

前項までで、ジアゾ化酵素 Fur5 による 8-AF のジアゾ化と NADPH による非酵素的な還元によって PHN が生成し、還元的脱アミノ化が達成されることを明らかにした (図 2-2 2)。一方で Fur5 によって生成した PND のジアゾ基は、窒素ガスとして脱離することが予想され、この窒素ガスを GC-MS で検出することにした。しかし、窒素ガスは大気中に 78% (v/v) と大量に存在するため、反応によって生成した窒素ガスを検出することは困難であると考えられた。そこで、修士課程において精製したアミノ基を ^{15}N 標識した 8-AF と ^{15}N 標識された亜硝酸ナトリウムを用いて、密閉容器内で反応を行い、気相中の $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$ (N_2) ガスとして検出することで天然存在の窒素ガスと区別できる様にした。第2項と同様に Fur5,6 の連続反応に NADPH を添加した表 2-1 2 の系で反応を行った。

その結果、 ^{15}N 標識した 8-AF と亜硝酸、Fur5 依存的に $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$ ガスの検出ができた (図 2-2 3)。このことから Fur5 の作用で形成されたジアゾ基は窒素原子の由来が異なるハイブリッドな窒素ガスとして放出されていることが明らかとなった。

表 2-1 2 $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$ ガス検出のための Fur5,6 連続反応系

Reaction Mixture	
100 mM	HEPES-NaOH pH 7.5
200 μM	8-AF (^{14}N or ^{15}N)
2 mM	SAM
2 mM	ATP
10 mM	MgCl_2
2 mM	NaNO_2 (^{14}N or ^{15}N)
2 mM	NADPH
2 μM	Fur6
(2 μM)	Fur5)
Total 200 μL	30°C 2 h

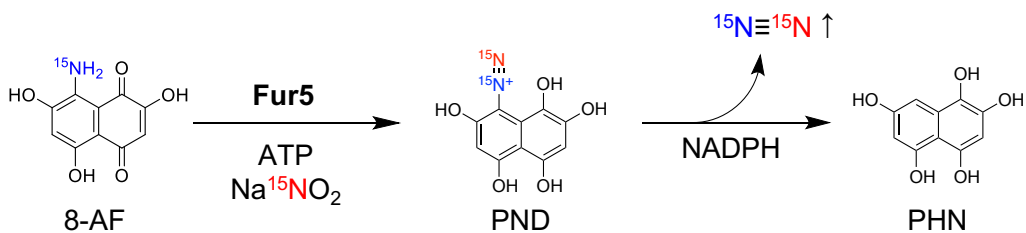


図 2-2 2 Fur5 によるジアゾ化を起点とする還元的脱アミノ化の模式図

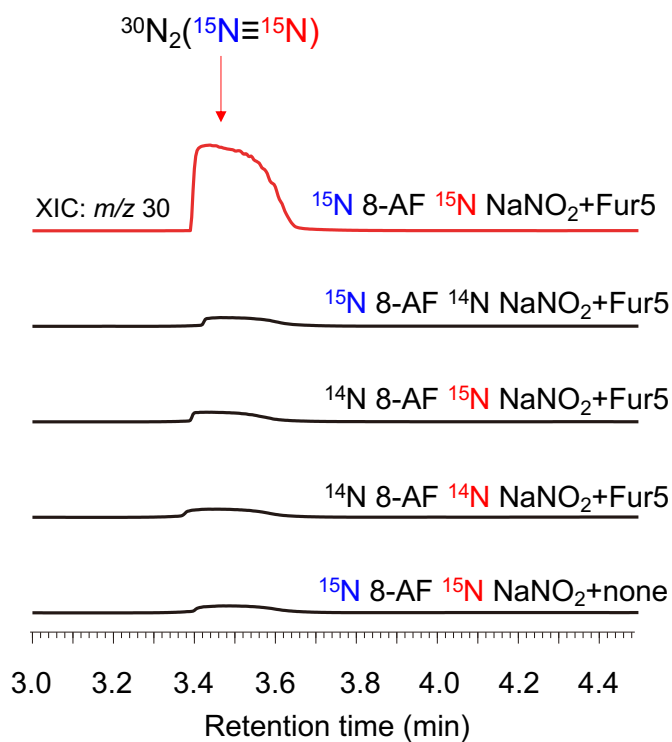


図 2-2 3 $^{30}\text{N}_2$ ガス検出反応系の GC-MS の XIC クロマトグラム (m/z 30)

8-AF と NaNO₂ の ¹⁵N 標識の有無と Fur5 の添加の有無(+none or +Fur5)をクロマトグラムの右上に示している。

第4節 Fur6 の結晶構造解析

前節までで Fur6 の生理的基質が 1,2,4,5,7-Pentahydroxynaphthalene (PHN)であることが示唆された。より詳細な Fur6 の反応機構を明らかにし、PHN が確かに生理的基質であることを示すため、Fur6 の結晶構造解析を行うことにした。

第1項 Fur6 のゲル濾過クロマトグラフィーによる精製と結晶化スクリーニング

Fur6 の結晶構造を取得するため、Fur6 のゲル濾過クロマトグラフィーによる精製を行った。Ni-NTA カラムによるアフィニティクロマトグラフィーによって *E. coli* BL21(DE3)から Fur6 を精製後、ゲル濾過クロマトグラフィーによって分画した。紫外吸収のクロマトグラムが確認できて SDS-PAGE によって純度が確認できた画分を結晶化スクリーニングに供した。結晶化には Hampton 社の Crystal Screen、Crystal Screen2、PEG/Ion、Rigaku 社の Wizard Classic1, 2, 3 および Wizard Precipitant Synergy を用いた。結晶化条件は 10 mg/mL Fur6+5 mM 8-AF +2 mM SAH であった。その結果、Wizard Precipitant Synergy の 9 番および PEG/Ion スクリーニングキットの 28 番の条件にて結晶が得られた (図 2-24)。この条件で得られた結晶の X 線結晶構造解析を行ったが、位相が決定できなかつたため、セレノメチオニン置換体の Fur6 を用いた SAD 法によって位相決定を行うことにした。

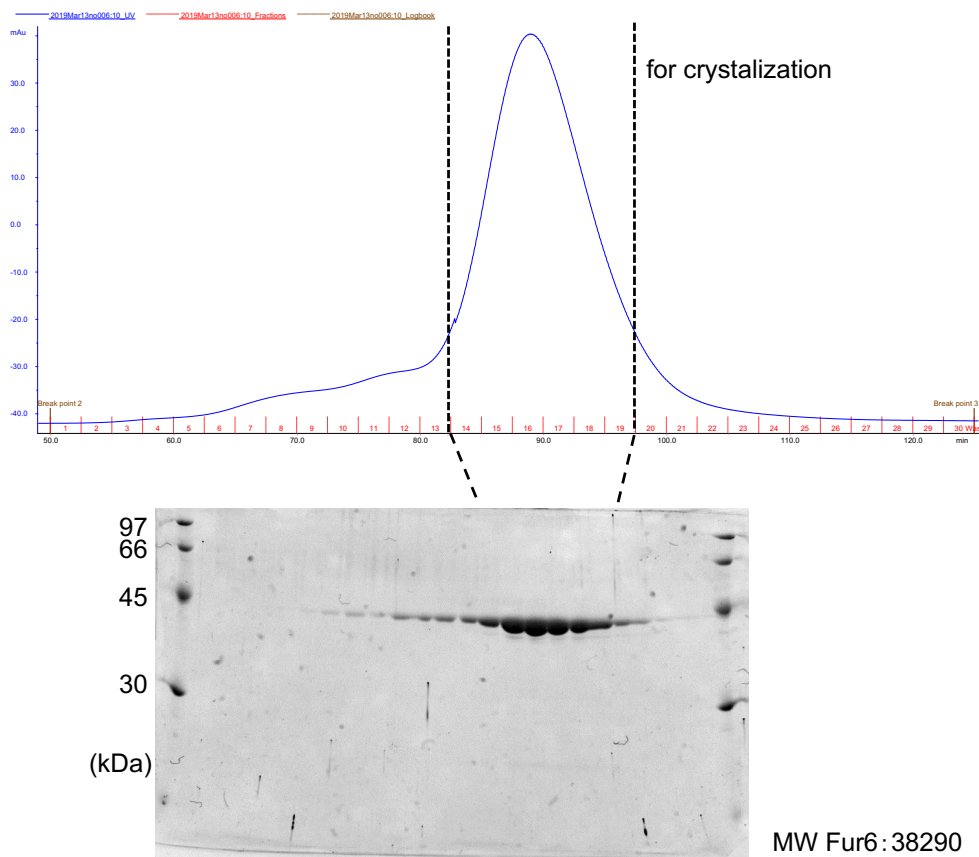
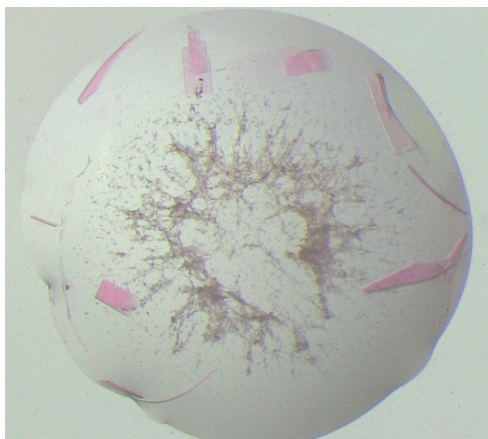


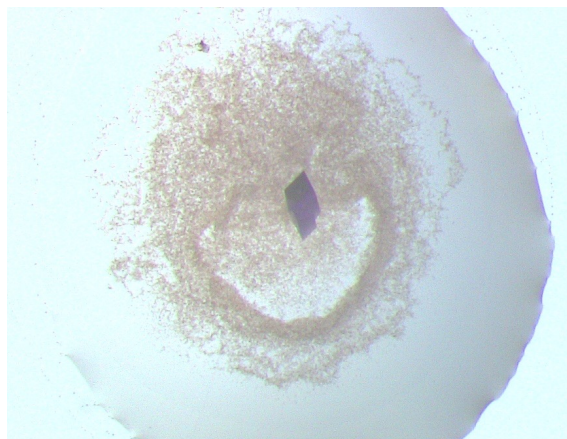
図 2-24 Fur6 のゲル濾過クロマトグラムと SDS-PAGE

フラクション 14-19 を結晶化スクリーニングに用いた。



③, Wizard Precipitant Synergy #9

0.66 M Ammonium sulfate*
0.33% MPD*
0.1 M HEPES/Sodium hydroxide pH7.5



③, PEG/Ion #28

20% w/v Polyethylene glycol 3,350*
0.2 M Calcium acetate hydrate pH7.5

第2項 セレノメチオニン置換体を用いた Fur6 の構造決定

前項で得られた条件の最適化を行い、より良質な結晶を得ることとした。種々条件を検討した結果、PEG/Ion #28 の条件周辺で良質な結晶が再現よく得られることが明らかとなったため、この条件でセレノメチオニン置換体の Fur6 の結晶を取得し (宿主 *E. coli* B834)、X 線結晶構造解析に供した。SAD 法を用いて位相決定を行った結果、Fur6 の構造決定に 2.12Å の分解能で成功した (表 2-13)。

表 2-13 Fur6 の X 線結晶構造解析の各種統計値

Date of data collection	20200721
Protein name	Fur6 (SAH)
Crystal ID	NT1_2D_2
Beamline	SPring-8 332XU
Wavelength (Å)	1.000
No. of images	4400
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell parameters	
a, b, c (Å)	74.98, 91.84, 125.35
α, β, γ (°)	90, 90, 90
Resolution (Å)	50-2.12 (2.18-2.12)
Mosaicity	0.25-1.25
Wilson B factor	45.697
Rsym (%)	15.7 (68.7)
I/σ(I)	10.69 (2.05)
Completeness (%)	100.0 (99.2)
No. of obs. reflections	763438
No. of uniq. reflections	94785
Redundancy	8.1
CC (1/2)	0.987 (0.813)

Fur6 の全体構造は Class I メチル基転移酵素⁹⁶ の構造と比較的よく類似しており、ホモ二量体を形成していた (図 2-2 5)。また、活性中心には SAM アナログである SAH を結合していた (図 2-2 6)。

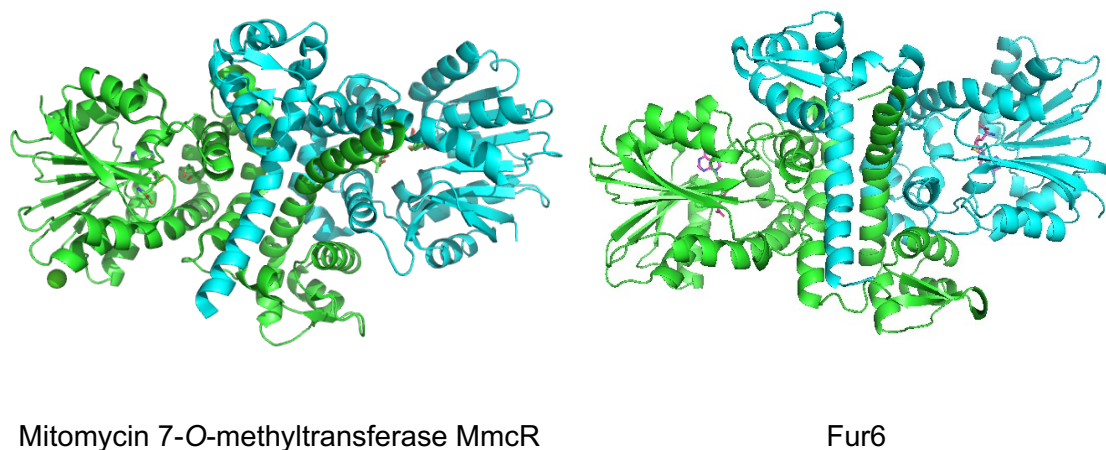


図 2-2 5 Fur6 の結晶構造とホモログの結晶構造の比較

Mitomycin 生合成における 7-O-methyltransferase MmcR と Fur6 との構造比較。それぞれ A 鎖を緑、B 鎖をシアンで示した。

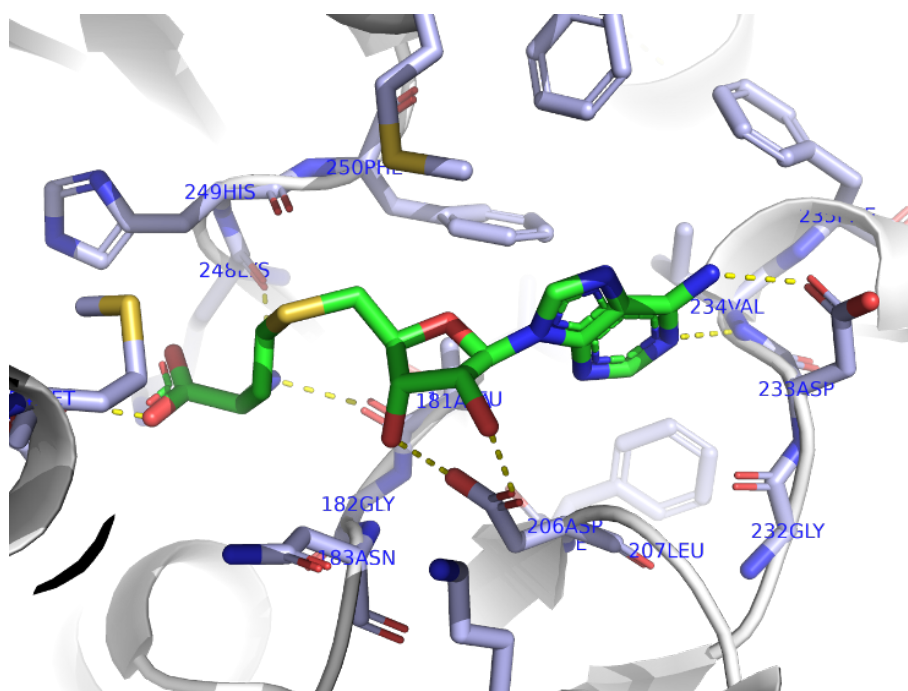


図 2-2 6 Fur6 による SAH の認識

活性中心ポケット周辺のアミノ酸残基と SAH との水素結合による認識が確認された。

第3項 Fur6の基質複合体構造の予測

前項で得られたFur6の結晶構造は基質を結合していなかったため、SAHの硫黄原子の付近にPHNを配置してMD計算を行うことにした。なお、この項での計算は全て、本研究科の生物情報学研究室に実行していただいた。なおSAHはSAMに置き換えて計算を行った結果、PHNは5位が脱プロトン化してフェノラートになった状態でポケット内に安定に保持されることが明らかとなった(図2-27)。DFT計算によると5位のpKaは最も低い値であることが示唆されることから(図2-28)、このモデルは妥当であると言える。PHNはTyr138、Trp151、Asp253を始めとする残基によって認識されていることが示唆された。またSAMのメチル基もPHNの3位の近傍に存在していたことから十分メチル化が起これうるコンフォメーションであることが示された。

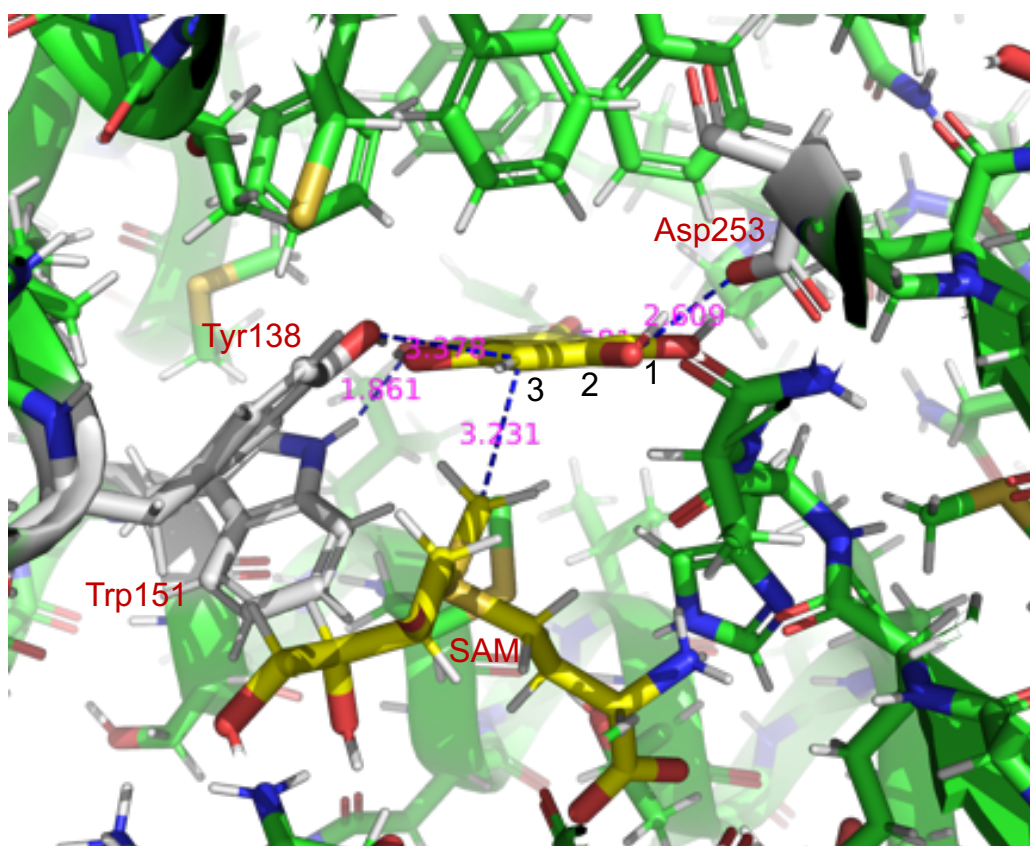


図 2-27 PHNをポケットに配置したFur6のMD計算の結果

Tyr138、Trp151、Asp253との水素結合によってPHNが認識している様子が明らかとなった。メチル供与体のSAMはPHNの3位の近傍に存在しており、3位をメチル化しうるコンフォメーションであった。

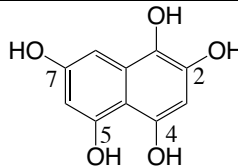
PHN structure	Position	pKa
	2-OH	8.02
	4-OH	6.80
	5-OH	6.74
	7-OH	9.27

図 2-28 DFT 計算による PHN の予測 pKa

5 位のヒドロキシ基の予測 pKa が最も低く算出されており、生理条件でも脱プロトン化し得ると考えられる。

第4項 Fur6 の変異体作製

前項で推定された Fur6 の残基が実際に基質認識に関わっているのかどうか調べるため、周辺の残基も含めて変異タンパク質を作製することにした。pHis8 にクローニングした Fur6 発現ベクターを鋳型として変異導入 PCR をおこなった。変異体作製に用いたプライマーを表 2-14 に示した。PCR 産物は1時間の DpnI 処理後、*E. coli* BL21(DE3)に導入し、変異体 Fur6 を取得した。Ni-NTA アフィニティクロマトグラフィー精製を行った結果、いずれの場合にも可溶性で組換え酵素を取得することができた (図 2-29)。

表 2-14 Fur6 の変異体作成に用いたプライマー

Fur6_Y138F_f2	5'-ACCTTGTTCGGCGCGGTCGCCGAGCAC-3'
Fur6_Y138F_r2	5'-CGCGCCGAACAAGGTGCCCTCGGTCACCCCG-3'
Fur6_W151F_f	5'-GACGCCTTCTCGAACCTGATGAACACGGTCACC-3'
Fur6_W151F_r	5'-GTTTCGAGAAGGCGTCGCGCAGATCCCG-3'
Fur6_E210A_f	5'-CTGCCGGCGAAGGAGCAGGAGGCGCTGG-3'
Fur6_E210A_r	5'-CTCCTTCGCCGGCAGGTCGAAGGTGGTG-3'
Fur6_E253A_f	5'-TTCCTGGCCATGTTTCGACAAGGACGACGTG-3'
Fur6_E253A_r	5'-GAACATGGCCAGGAAGTGCTTGATCAGGAC-3'
Fur6_Y99F_f	5'-CTCGCCTTTATGAACATGATCAAGGTGGTGGCGCTGCG-3'
Fur6_Y99F_r	5'-GTTCATAAAGGCGAGCGCGCGCTTCAGATCG-3'
Fur6_T307A_f	5'-CGGCTGCGCGATGGGCCAGGGCGGCC-3'
Fur6_T307A_r	5'-CCCATCGCGCAGCCGATGAAGAAGGCCGGG-3'

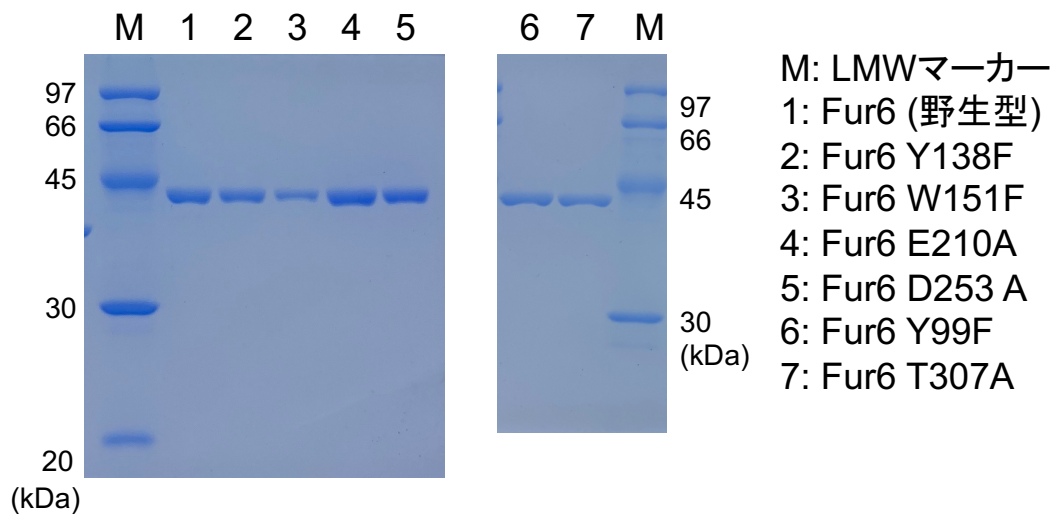


図 2-29 Fur6 変異体の SDS-PAGE

全ての変異体を可溶性タンパク質として取得することができた。

第5項 Fur6 変異体の活性測定

前項で作製した Fur6 の変異体を用いて Fur6 の活性測定を行った。第3節第1項で行ったように Flaviolin と還元剤である Dithionite を用いることで一時的に PHN を発生させ、Fur6 の活性を検出することにした。反応は表 2-15 のような条件で行った。反応液と当量のメタノールでクエンチした遠心上清を PDa-QDa 解析に供した。その結果、Y138F、W151F、D253A において顕著な活性が消失した。このことから第3項で作製した PHN 結合型の Fur6 のモデルが支持された。

表 2-15 Fur6 変異体の反応系

Reaction Mixture	
100 mM	HEPES-NaOH pH 7.5
100 μ M	Flaviolin
1 mM	SAM
5 mM	Dithionite
(2 μ M	Fur6)
Total 100 μ L	30°C 1 h

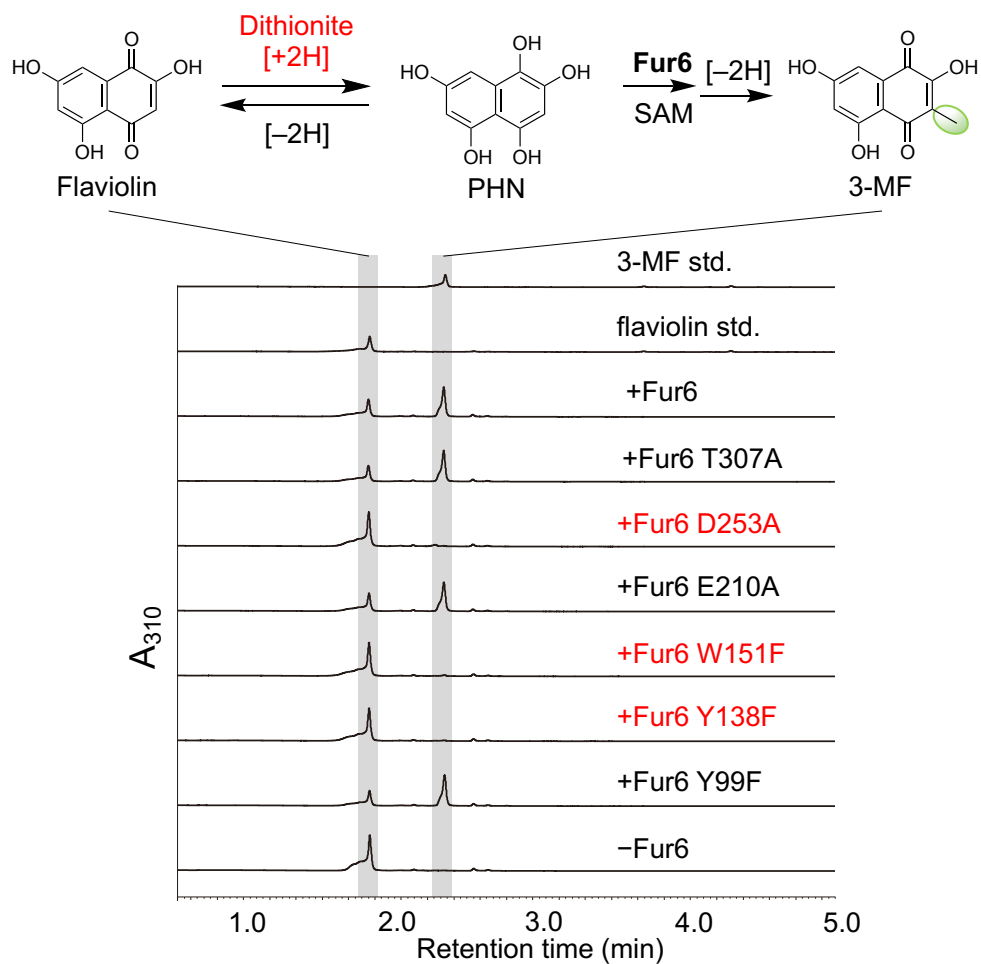


図 2-30 Fur6 変異体の活性 (310 nm の吸収波長)

一番下の段は Fur6 を添加していない条件。それ以外は野生型もしくは変異型の Fur6 を添加した条件になっている。

第5節 Fur4 の機能解析

前項までで Fur5, NADPH が関与するジアゾ化を経由した還元的脱アミノ化によって生じる PHN がメチル基転移酵素 Fur6 の基質となってメチル化され、空気酸化により 3-MF が生成することを明らかにした。Fur6 の基質が一時的に生じる還元型の基質だったことから、MMF までの変換に必要な酵素のうち残るメチル基転移酵素 Fur4 も PHN のメチル化で生じた 3-Methyl PHN が生理的基質であり、その生成物の自動酸化によって MMF が生成するのではないかと推測した (図 2-3 1)。

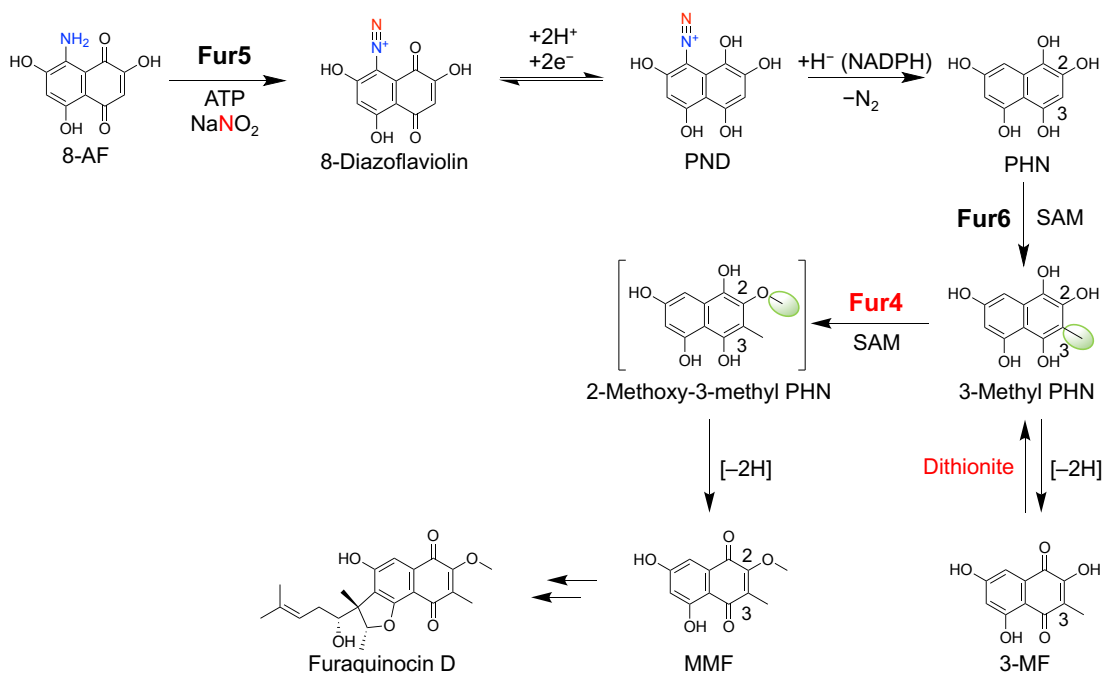


図 2-3 1 Furaquinocin の推定生合成経路 (Fur4)

Fur6 の反応条件と同様に Dithionite を還元剤として用い、3-MF を基質とした Fur4 の反応を検出を試みた。反応は表 2-1 6 の条件で行った。反応液と当量のメタノールでクエンチした遠心上清を PDa-QDa 解析に供した。その結果、Fur4 だけではほとんど 3-MF が MMF に変換されることはなかったが、Dithionite 添加時に顕著な MMF の生産の増大が観測された (図 2-3 2)。このことから 3-MF が還元された 3-Methyl PHN が Fur4 の基質となって 2 位のヒドロキシ基がメチル化されて 2-Methoxy-3-Methyl PHN が生成し、自動酸化によって MMF が生成したことが明らかになった。

表 2-1 6 Fur4 の反応系

Reaction Mixture	
100 mM	HEPES-NaOH pH 7.5
10 μM	3-MF
1 mM	SAM
(5 mM	Dithionite)
(2 μM	Fur4)
Total 100μL	30°C 1 h

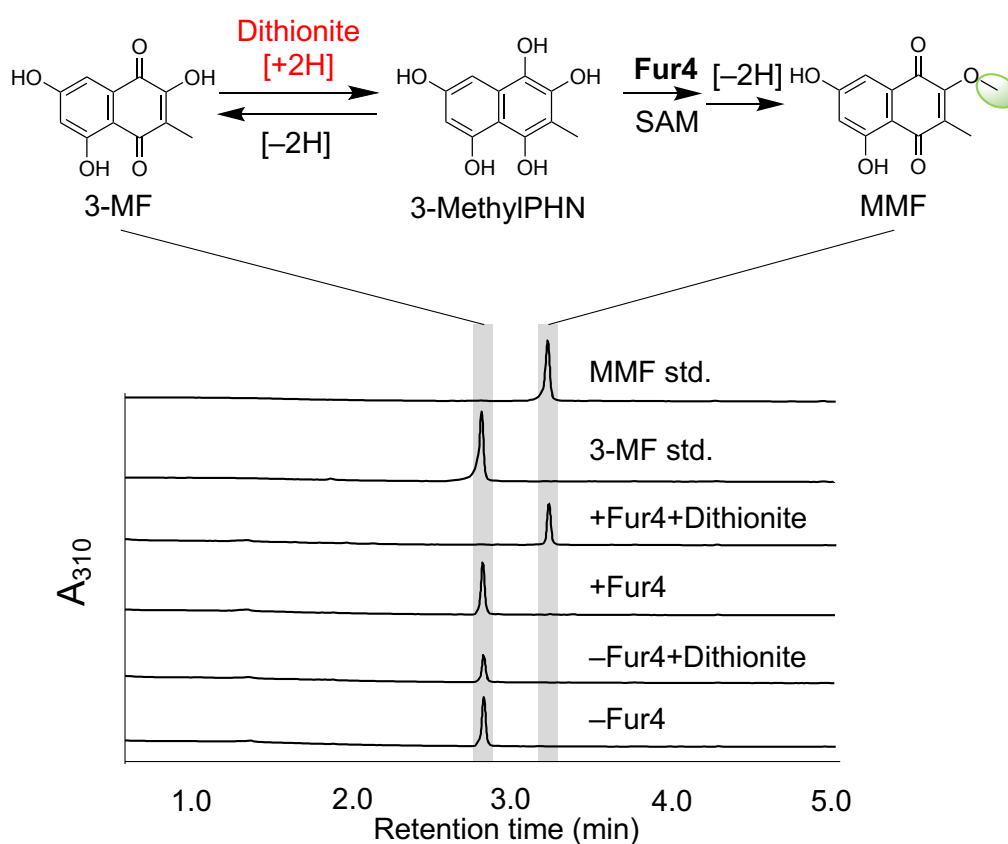


図 2-3 2 3-MF を基質とした Fur4 の反応のクロマトグラム (310 nm の吸収波長)

下から 1,2 段目は Fur4 非添加、3,4 段目は Fur4 添加条件におけるクロマトグラムを表している。さらに Dithionite を添加した系はそれも明記してある。

第6節 Fur7の機能解析

これまでプレニル基転移酵素 Fur7 は基質 MMF を GPP によってゲラニル化することで、Fur-P1 が生成すると報告されていた⁹²。しかし Fur6 や Fur4 が還元型の基質を用いて反応することを考えると、Fur7 も還元型の MMF である 2-Methoxy-3-Methyl PHN を基質としてゲラニル基転移反応を触媒すると推測した (図 2-3 3)。

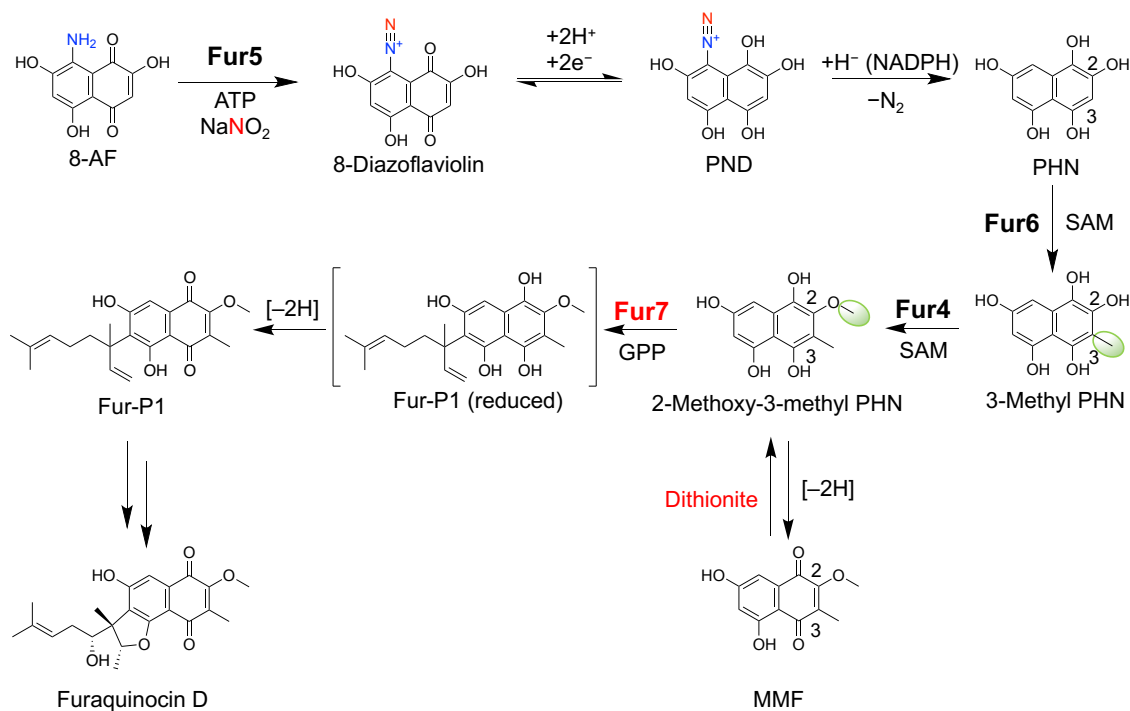


図 2-3 3 Furaquinocin 推定生合成経路 (Fur7)

Fur6, 4 の反応条件と同様に Dithionite を還元剤として用い、MMF を基質とした Fur7 の反応検出を試みた。反応は表 2-1 7 の条件で行った。反応液と当量のメタノールでクエンチした遠心上清を PDa-QDa 解析に供した。その結果、Fur7 だけでは MMF から Fur-P1 への変換はわずかであったが、Dithionite 添加時に顕著な Fur-P1 の生産の増大が観測された。このことから MMF が還元された 2-Methoxy-3-Methyl PHN が Fur7 の基質となって 7 位の炭素がゲラニル化され、自動酸化によって FurP1 が生成したことが明らかになった (図 2-3 4)。

表 2-17 Fur7 の反応系

Reaction Mixture	
100 mM	HEPES-NaOH pH 7.5
100 μM	MMF
1 mM	GPP
(5 mM	Dithionite)
(2 μM	Fur7)
Total 100μL	30°C 1 h

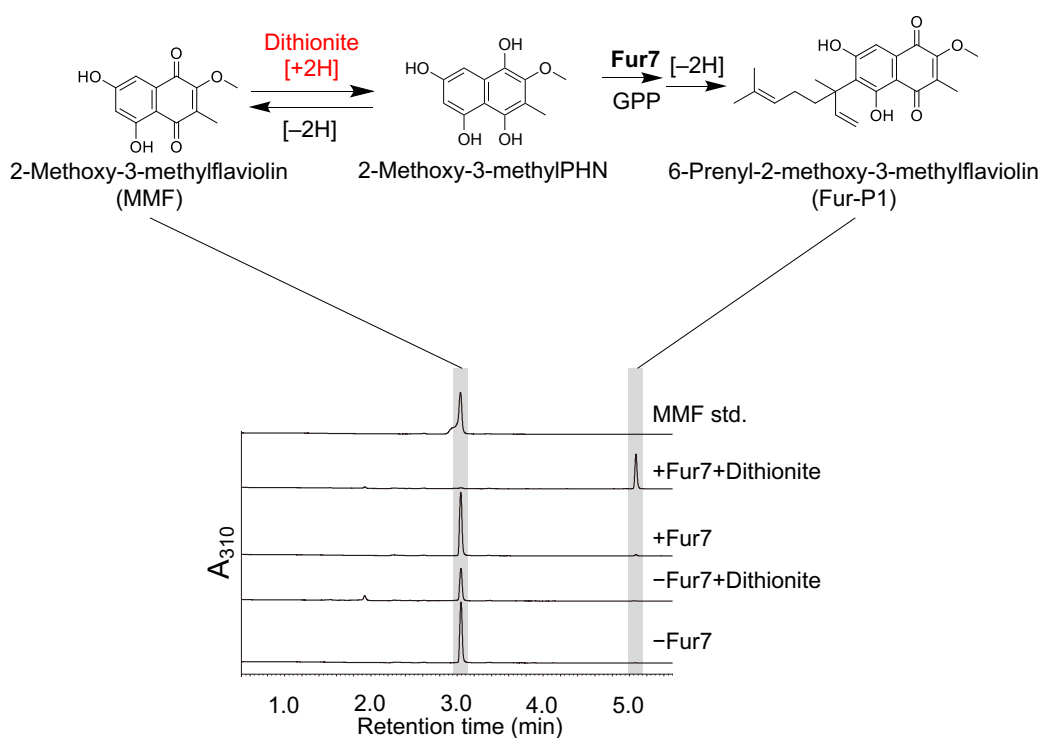


図 2-34 MMF を基質とした Fur7 の反応のクロマトグラム (310 nm の吸収波長)

下から 1,2 段目は Fur7 非添加、3,4 段目は Fur7 添加条件におけるクロマトグラムを表している。さらに Dithionite を添加した系はそれも明記してある。

第7節 Fur21 の機能解析

当研究室の工藤によって、SAM 依存性メチル基転移酵素のホモログである Fur21 は SAM 非依存的に基質 Fur-P1 を環化することで、Furaquinocin C を生成することが示唆されていた (工藤慧博士論文, 2018)。しかし Fur6、Fur4、Fur7 が還元型の基質を用いて反応することを考えると、Fur21 も還元型の Fur-P1 を基質として環化反応を触媒すると推測した (図 2-3 5)。

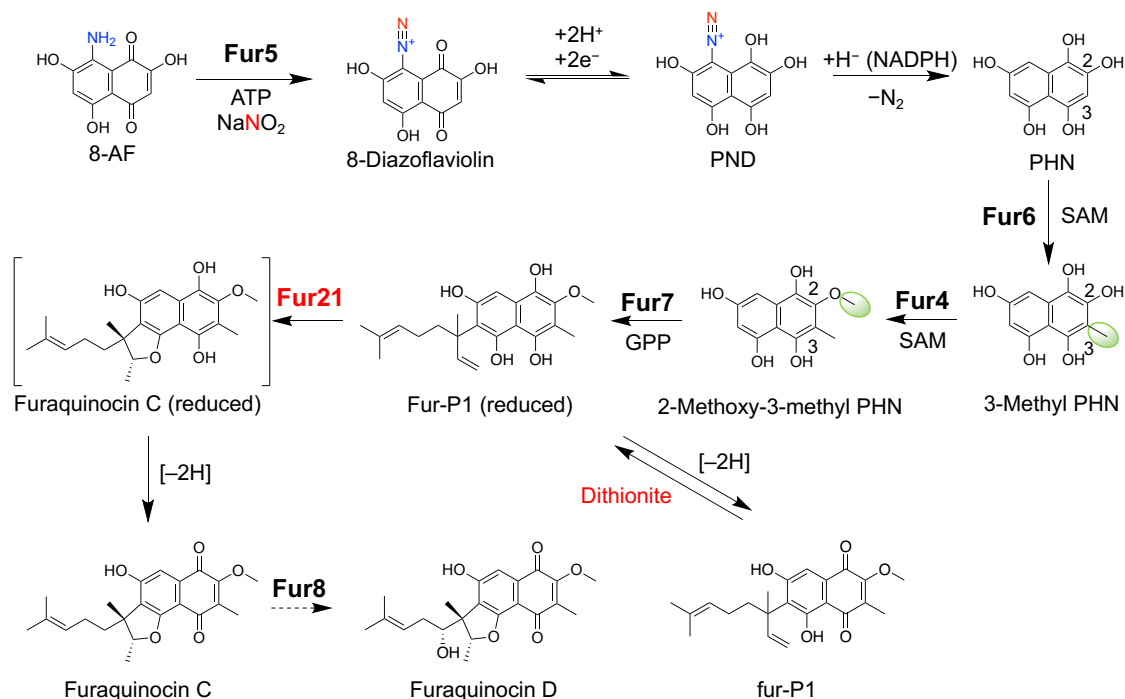


図 2-3 5 Furaquinocin 生合成経路 (Fur21)

第1項 Fur21 の *in vitro* 反応解析

Fur7 の反応条件と同様に Dithionite を還元剤として用い、MMF を基質とした Fur7、Fur21 による逐次反応の検出を試みた (図 2-3 6)。反応は表 2-1 8 の Reaction Mixture 1 の条件で Fur7 の反応を行った後に Reaction Mixture 2 へと移して Fur21 による反応を行った。反応液と当量のメタノールでクエンチした遠心上清を PDa-QDa 解析に供した。その結果、Reaction Mixture 2 において Fur21 だけ添加した場合 (図 2-3 7 の下から3段目)より、Fur21 と Dithionite を両方添加した場合 (図 2-3 7 の下から4段目)の方が、より Furaquinocin C 生成量は多かった。このことから MMF が還元された 2-Methoxy-3-Methyl PHN が Fur7 の基質となって 7 位の炭素がゲラニル化されて生じた還元型の Fur-P1 が Fur21 の基質となって環化し、生成した還元型の Furaquinocin C の自動酸化によって Furaquinocin C が生成したことが明らかになった (図 2-3 6、図 2-3 7)。

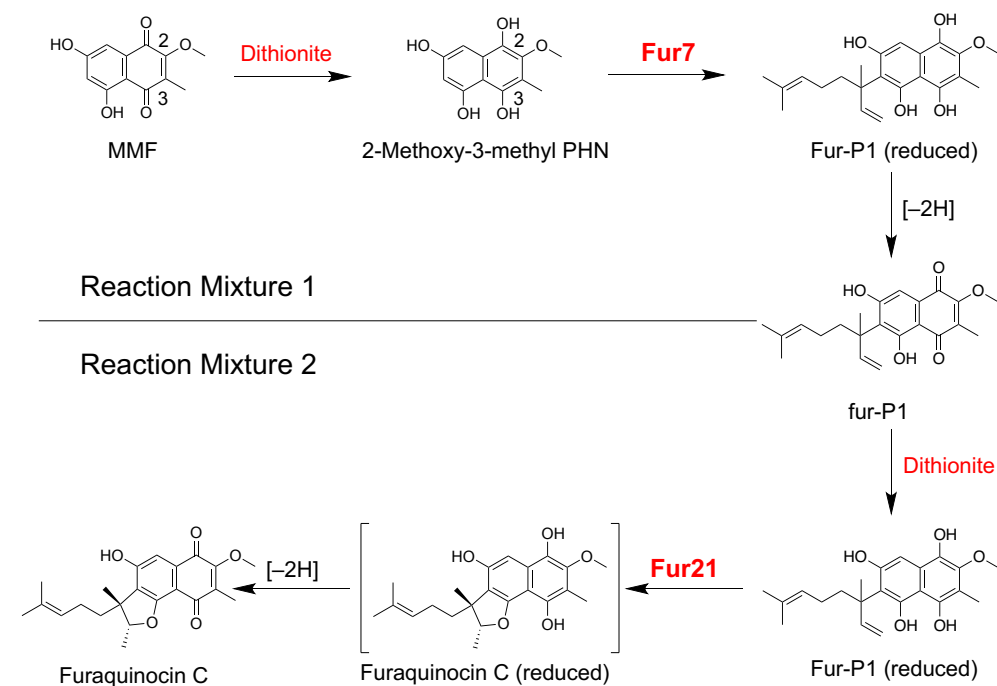


図 2-3 6 Fur7,21 の逐次反応により予想される経路

表 2-1 8 Fur7,21 の逐次反応系

Reaction Mixture 1	
200 mM	HEPES-NaOH pH 7.5
100 μM	MMF
1 mM	GPP
5 mM	Dithionite
2 μM	Fur7
Total 50 μL	30°C 1 h
Reaction Mixture 2	
	Reaction Mixture 1
(5 mM	Dithionite)
(2 μM	Fur21)
	DW
Total 100 μL	30°C 1 h

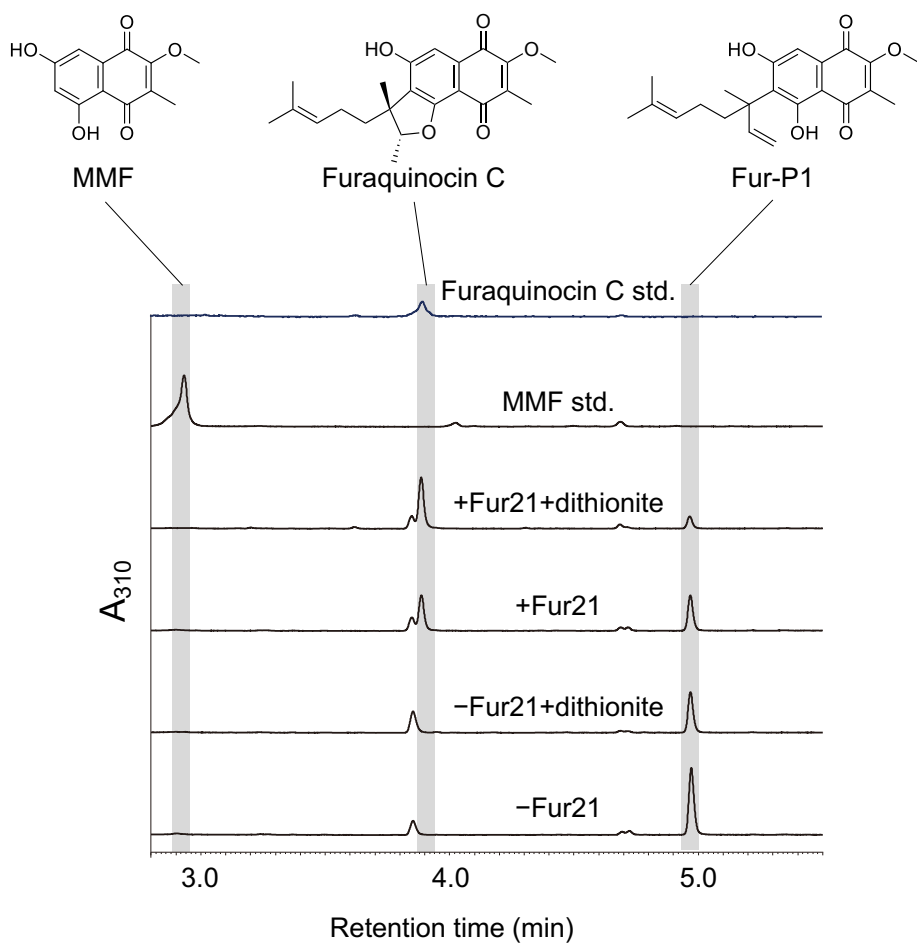


図 2-37 MMF を基質とした Fur7,21 による逐次反応のクロマトグラム (310 nm の吸収波長)

下から 1,2 段目は Fur21 非添加、3,4 段目は Fur21 添加条件におけるクロマトグラムを表している。さらに Dithionite を添加した系はそれも明記してある。

第2項 Fur21 の SAM や SAH の依存性の検証

前項において Fur21 が還元型の Fur-P1 の環化による還元型の Furaquinocin C の生成を触媒することが明らかとなった。Fur21 は SAM 依存性のメチル基転移酵素のホモログであるため、SAM や SAH を反応に用いることで反応が促進されることも予想された。そこで表 2-19 の様な条件で反応を行い、SAM や SAH の有無による反応の違いを検証することにした。

しかしながら、SAM や SAH の添加によって反応が促進されることはなかった (図 2-38 の下から 3,4 段目)。SAH を加えた場合にはやや反応が阻害されており、基質と競合している可能性も考えられた。

表 2-19 Fur7,21 の連続反応系 (with SAM or SAH)

Reaction Mixture	
100 mM	HEPES-NaOH pH 7.5
100 μ M	MMF
1 mM	GPP
(1 mM	SAM or SAH)
5 mM	Dithionite
2 μ M	Fur7
(2 μ M	Fur21)
Total 100 μ L	30°C 1 h

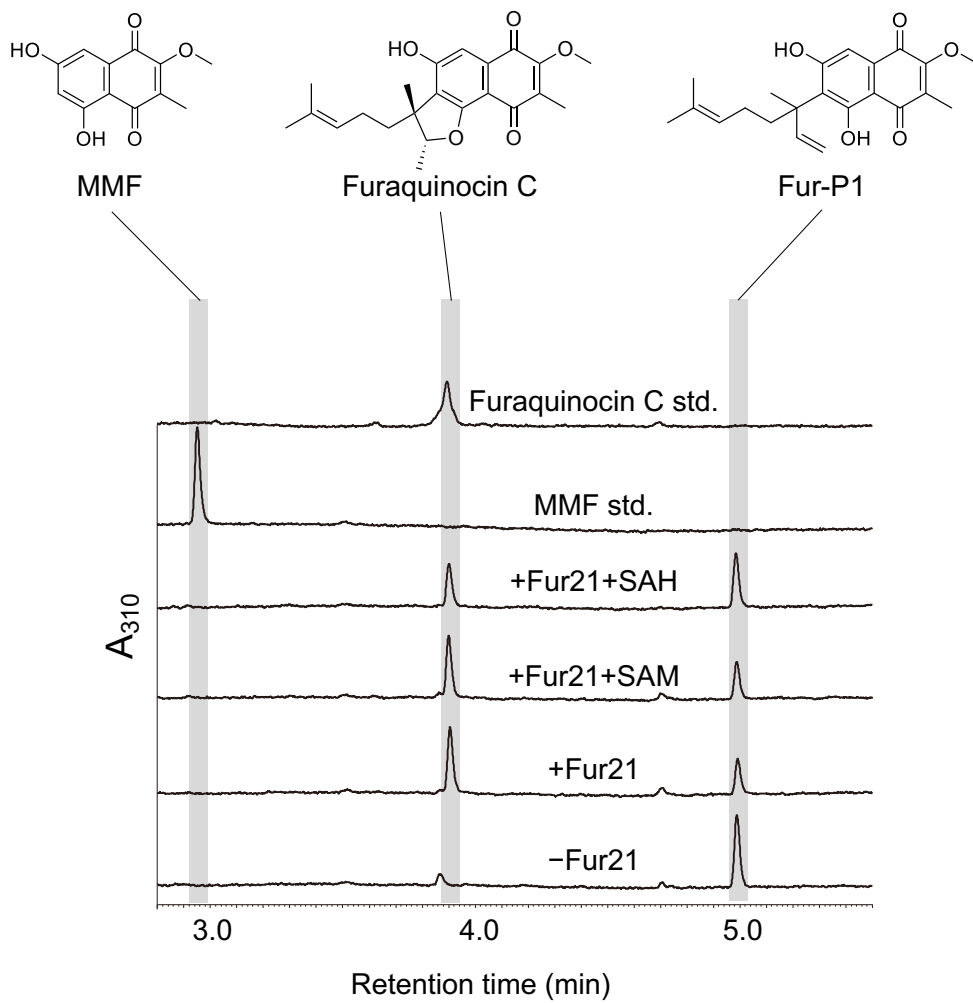


図 2-38 SAM もしくは SAH を添加した Fur7,21 の連続反応 (310 nm の吸収波長)
 一番下のクロマトグラムは Fur21 非添加の系、下から 2 段目は Fur21 のみを添加した系を、下から 3 段目は Fur21 と SAM を添加した系を、下から 4 段目は Fur21 と SAH を添加した系を表している。

第3項 Fur21 のゲル濾過クロマトグラフィー精製

Fur21 は SAM 依存性のメチル基転移酵素のホモログでありながら、反応に SAM を必要とせず、基質環化反応を触媒するユニークな酵素である。そこで Fur21 のより詳しい反応機構を理解するため、Fur21 の X 線結晶構造解析を目指した。まず、Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーで精製した Fur21 をゲル濾過クロマトグラフィーに供した。その結果、ほぼ単一のピークとして Fur21 のゲルろ過クロマトグラムを得ることに成功し、これを結晶化スクリーニングに用いることにした (図 2-3 9)。

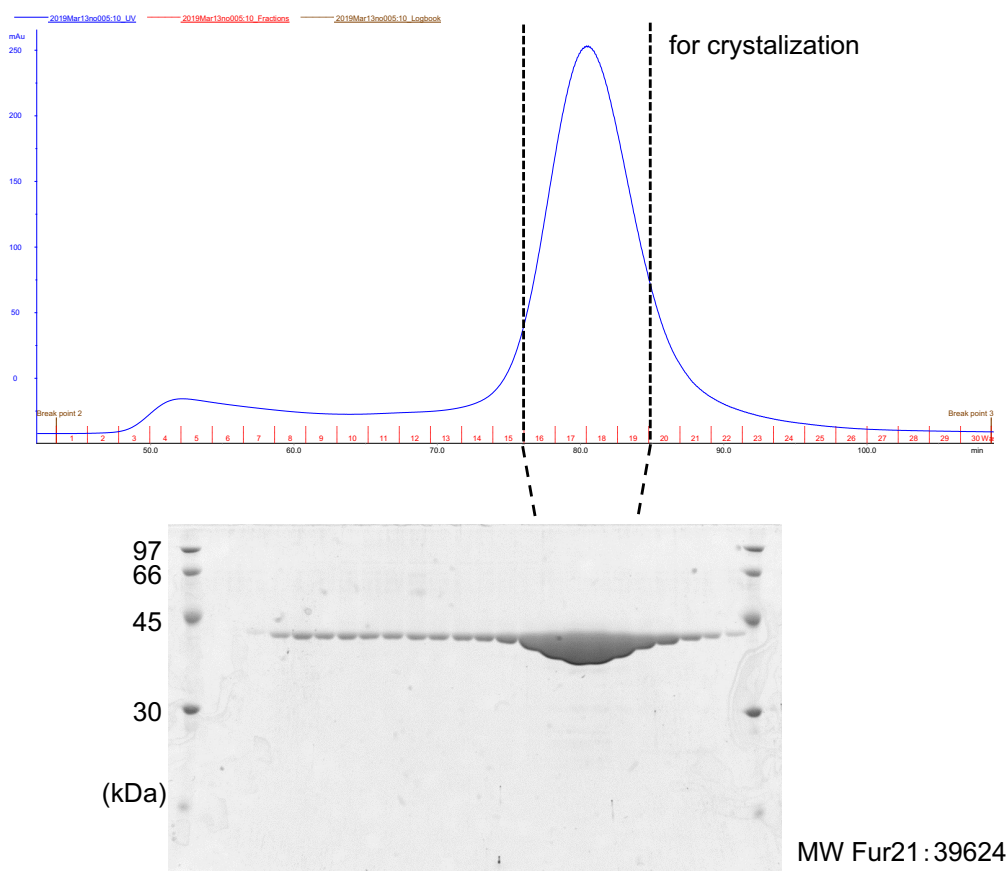


図 2-3 9 Fur21 のゲル濾過クロマトグラム

フラクション 16-19 を結晶化スクリーニングに用いた。

第4項 Fur21 の結晶化スクリーニング

前項で得られた Fur21 を結晶化スクリーニングに供した。スクリーニングキットは Hampton 社の Crystal Screen、Crystal Screen2、PEG/Ion、Rigaku 社の Wizard Classic1, 2, 3 および Wizard Precipitant Synergy を用いた。他にも種々の PEG、塩、沈殿剤を含む条件でスクリーニングを行った。①10 mg/mL Fur21 ②10 mg/mL Fur21+1 mM Furaquinocin C の条件で結晶化スクリーニングを行ったが、いずれの場合も結晶を得ることはできなかった。

第8節 Furaquinocin の還元的生合成の生理的意義

前節まででメロテルペノイドである Furaquinocin の還元的な生合成を明らかにした (図 2-40)。この経路においては PHN 生成を起点として還元型のヒドロキノンとして Furaquinocin 類が生合成され、自動酸化によって酸化型のキノンとして検出される。このことから、Furaquinocin はキノン型ではなく、還元されたヒドロキノン型こそが生体内では機能を有しているのではないかと考えた。

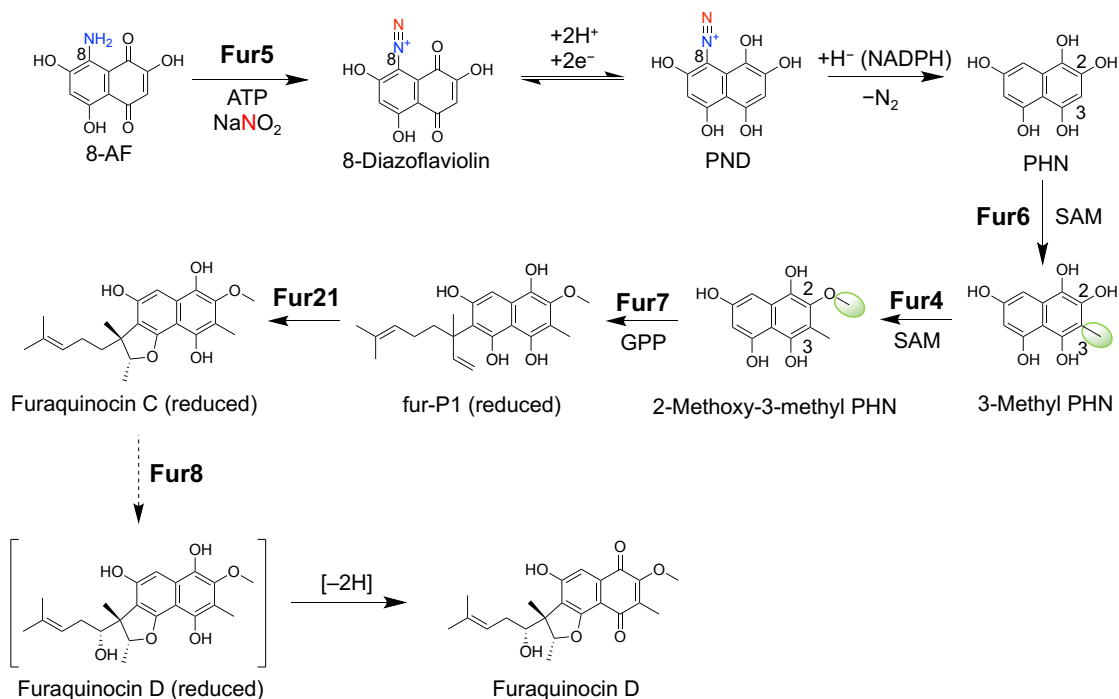


図 2-40 前節までで推定された還元型 Furaquinocin の生合成

Furaquinocin は還元型 (ヒドロキノン)として生合成され、空気中の自動酸化によって酸化型(キノン)となって検出されると予想した。

結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* においてはバイオフィーム形成条件において、一般的に細菌の呼吸鎖で利用されるメナキノンではなく、III型ポリケタイド合成酵素によって生合成される Polyketide quinone (PkQ)を呼吸鎖に用いることが明らかにされている⁹⁷ (図 2-41)。この例のように、パラキノン構造を持つ放線菌のメロテルペノイドも呼吸鎖に関与している可能性が考えられた。*M. tuberculosis* の例では Alcohol dehydrogenase と呼吸鎖タンパク質の Cytochrome *c* を用いた *in vitro* 反応系において、Cytochrome *c* の還元による 550 nm の吸光の上昇を測定し、PkQ の存在によって 550 nm の吸光の上昇速度が増加することから、PkQ が電子メディエーターとして働きうることを示していた。そこで、これに倣い、Alcohol dehydrogenase と Cytochrome *c* を用いた *in vitro* 反応系に Furaquinocin を添加し、Cytochrome

c の還元速度が上昇するかどうか調べた。反応は表 2-20 の条件で行った。その結果、Furaquinocin 添加条件において非添加条件と比べて顕著な 550 nm の増大が確認できた (図 2-42)。このことから Furaquinocin が呼吸鎖において電子メディエーターとして機能していることが明らかとなった。

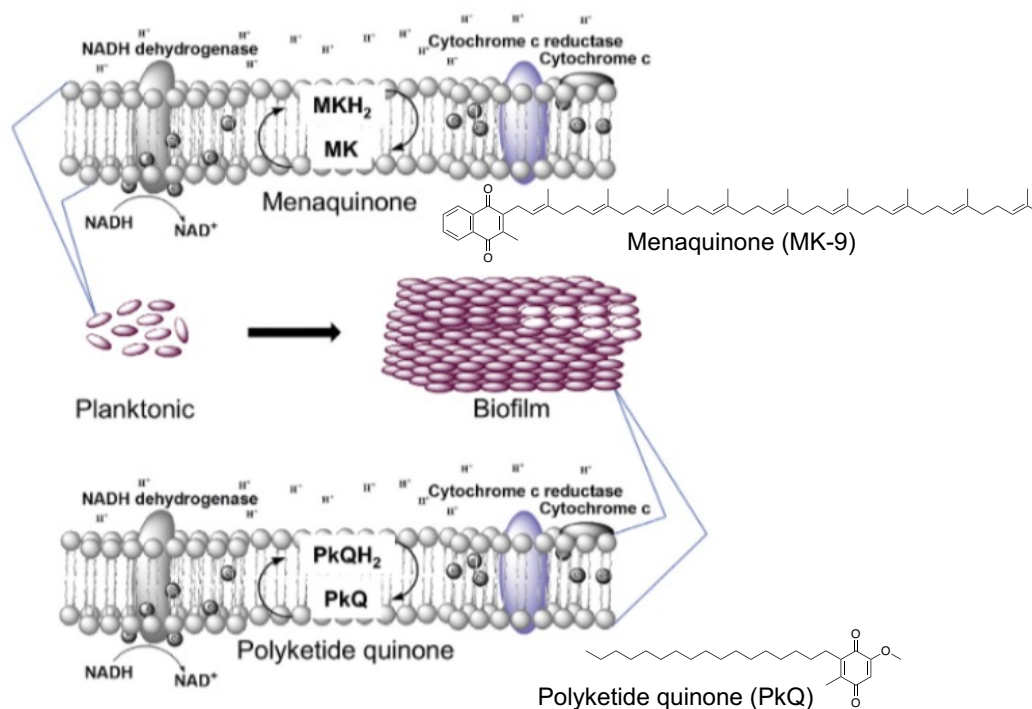
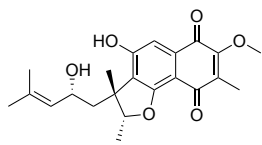


図 2-41 *Mycobacterium tuberculosis* における Menaquinone と PkQ の使い分け

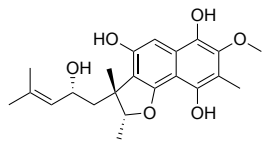
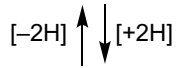
Mycobacterium tuberculosis においては通常の Planktonic な条件では Menaquinone (MK)を電子メディエーターとして呼吸鎖に用いるが、低酸素濃度なバイオフィーム形成条件では Polyketide quinone (PkQ)を電子メディエーターとして呼吸鎖に用いる。

表 2-20 Furaquinocin を電子メディエーターとして用いた Cytochrome *c* の還元系

Reaction Mixture	
50 mM	Phosphate buffer pH 8.8
100 μM	Cytochrome <i>c</i>
29.6 U (0.1 mg/mL)	Alcohol dehydrogenase
1%(v/v)	Ethanol
500 μM	Furaquinocin D
Total 500 μL	25°C 15 min



Furaquinocin D



Furaquinocin D (reduced)

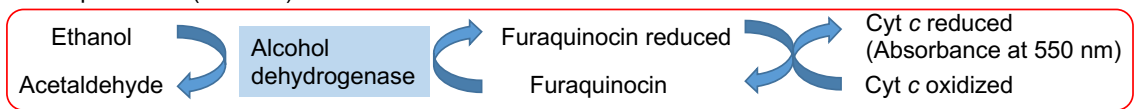
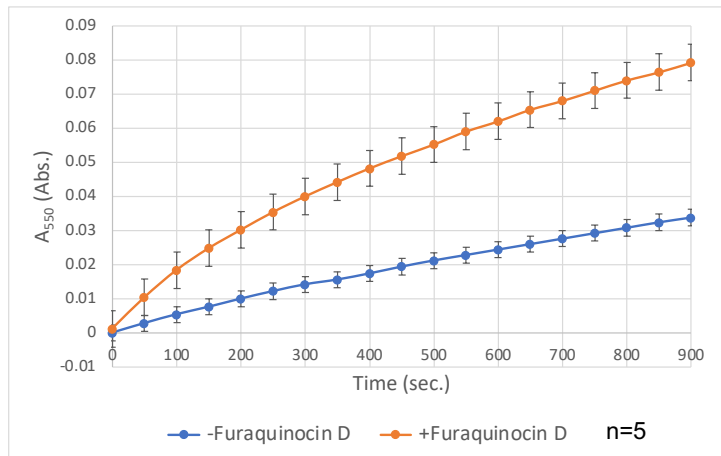


図 2-4 2 電子メディエーターとして機能する Furaquinocin

Furaquinocin 非添加条件 (青色のグラフ)と比べて Furaquinocin 添加条件 (橙色のグラフ)では顕著な Cyt *c* の還元速度の上昇が確認できた。

第9節 考察

本章では Furaquinocin を対象として還元的脱アミノ化を含む Furaquinocin の還元的生合成の全容を明らかにした (図 2-4 3)。まずジアゾ基形成酵素 Fur5 が 8-AF を基質として用い、Fur16,17 依存的に生成する亜硝酸、および ATP 依存的に 8-Diazoflaviolin を生じる。この過程で ATP は AMP へと変換される。8-Diazoflaviolin は電子吸引性のジアゾ基を有しており、酸化還元電位が高いと予想されるため、2,4,5,7,8-Pentahydroxynaphthalene-1-diazonium (PND) へと平衡が偏り、NADPH を始めとする生体内還元物質によるヒドリド転移と脱窒素の結果、1,2,4,5,7-Pentahydroxynaphthalene (PHN) を生じる。こうして還元的脱アミノ化が達成される。PHN は C-メチル基転移酵素 Fur6 の基質となって SAM 依存的に 3 位の炭素がメチル化されて 3-Methyl PHN を生成する。PHN が Fur6 の生理的基質であることは、得られた Fur6 の結晶構造と PHN との複合体構造の MD 計算と変異体実験によっても支持された。続いて O-メチル基転移酵素 Fur4 によって 2 位のヒドロキシ基が SAM 依存的にメチル化され、2-Methoxy-3-methyl PHN が生成する。MMF はこの 2-Methoxy-3-methyl PHN が空气中で自動酸化することで検出されていた化合物であると結論づけた。さらに 2-Methoxy-3-methyl PHN は MMF よりも極めて効率的に Fur7 によるゲラニル化の基質となり、還元型の Fur-P1 へと変換され Fur21 による環化と続き、還元型の Furaquinocin を生成することを明らかにした。

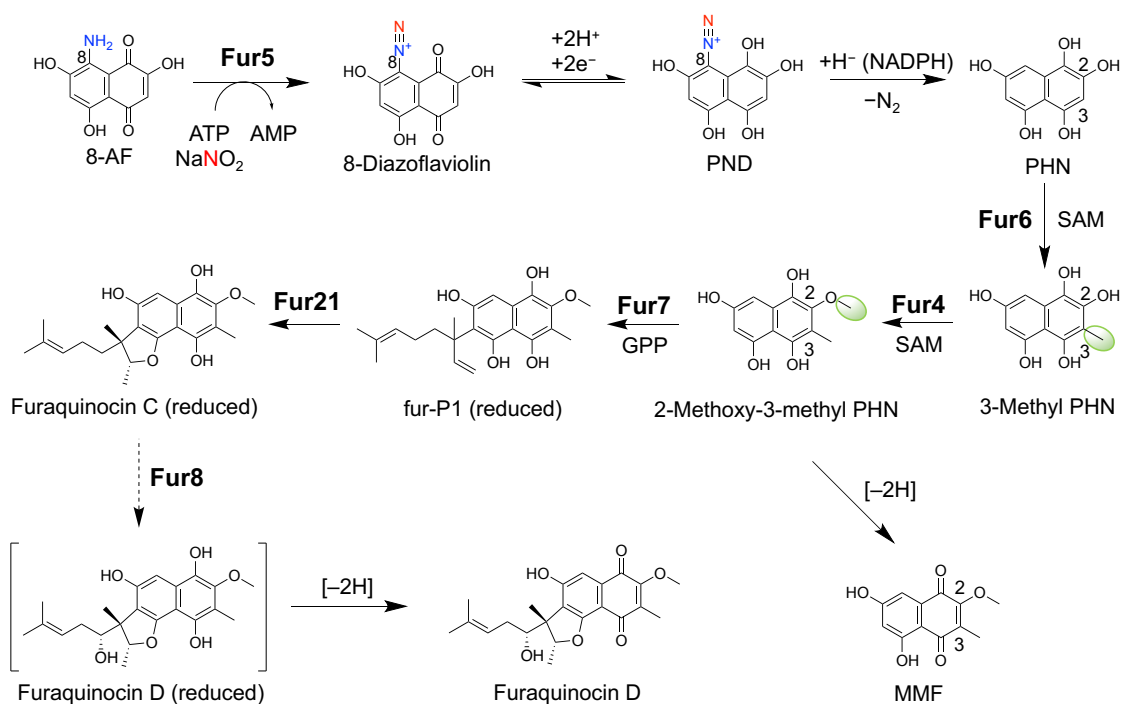


図 2-4 3 本章で明らかにした Furaquinocin の還元的生合成

Fur5 によるジアゾ化を起点とした 8-AF からの Furaquinocin の還元的生合成の経路を示した。

Fur5 は 8-AF からの Furaquinocin 生合成において初発段階で作用する酵素で、亜硝酸と ATP 依存的に 8-AF の 8 位のアミノ基のジアゾ化を触媒する。Fur5 は反応の過程で ATP を AMP へと変換するため、亜硝酸をアデニル化することで活性化していると考えられる。ただし、アデニル化された亜硝酸を検出することはできなかった。これは、アデニル化亜硝酸が極めて反応性が高い上、8-AF が Fur5 に結合した時に活性中心でのみ発生できる様に構造的に制御されているためであると考えている。有機化学においては酸性条件にすることで亜硝酸からニトロソニウムイオン(${}^{\oplus}\text{N}=\text{O}$)を発生させ、アミンからの求核攻撃を受けやすくする戦略をとっている (図 2-4 4)。Fur5 は亜硝酸をアデニル化することによって亜硝酸の窒素原子の求電子性を上げ、8-AF のアミノ基からの求核攻撃を可能にしていると考えられる (図 2-4 5)。序論で述べたように Cremeomycin 生合成においては非酵素的にもジアゾ化が進行するため、ジアゾ化酵素と推定された CreM のジアゾ化への関与ははっきりと証明されていない⁶⁶。しかし、Furaquinocin 生合成においては非酵素的に 8-AF のジアゾ化が起こることはなく、酵素的ジアゾ化を明示的に証明した初めての例であると言える。8-AF は図 2-4 6 のような共鳴構造の寄与によって 8 位のアミノ基がイミン性を帯び、求核性が下がっていることで、Cremeomycin とは違い非酵素的なジアゾ化が起こりにくくなっていると考えられる。なお Fur5 の反応液の分析で検出された Flaviolin は PND の自発的脱窒反応によって徐々に生成したと考えられる (図 2-4 5 の一番下の段)。有機化学と違い、より温和な pH 条件においてもジアゾ化を触媒できる Fur5 は酵素ツールとしても有用であると考えられる。

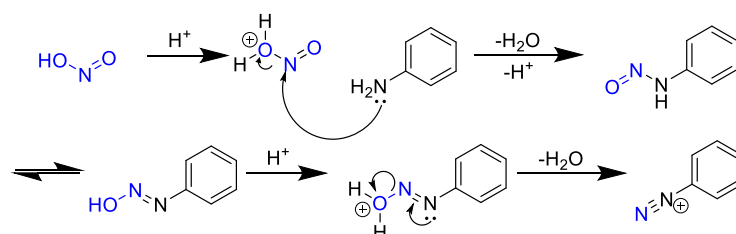


図 2-4 4 有機化学におけるジアゾ化

有機化学の反応において、ジアゾニウム化合物は、亜硝酸ナトリウムを酸性条件で処理することで生じる活性種と芳香族アミン (図はアニリン)の反応で生じる。

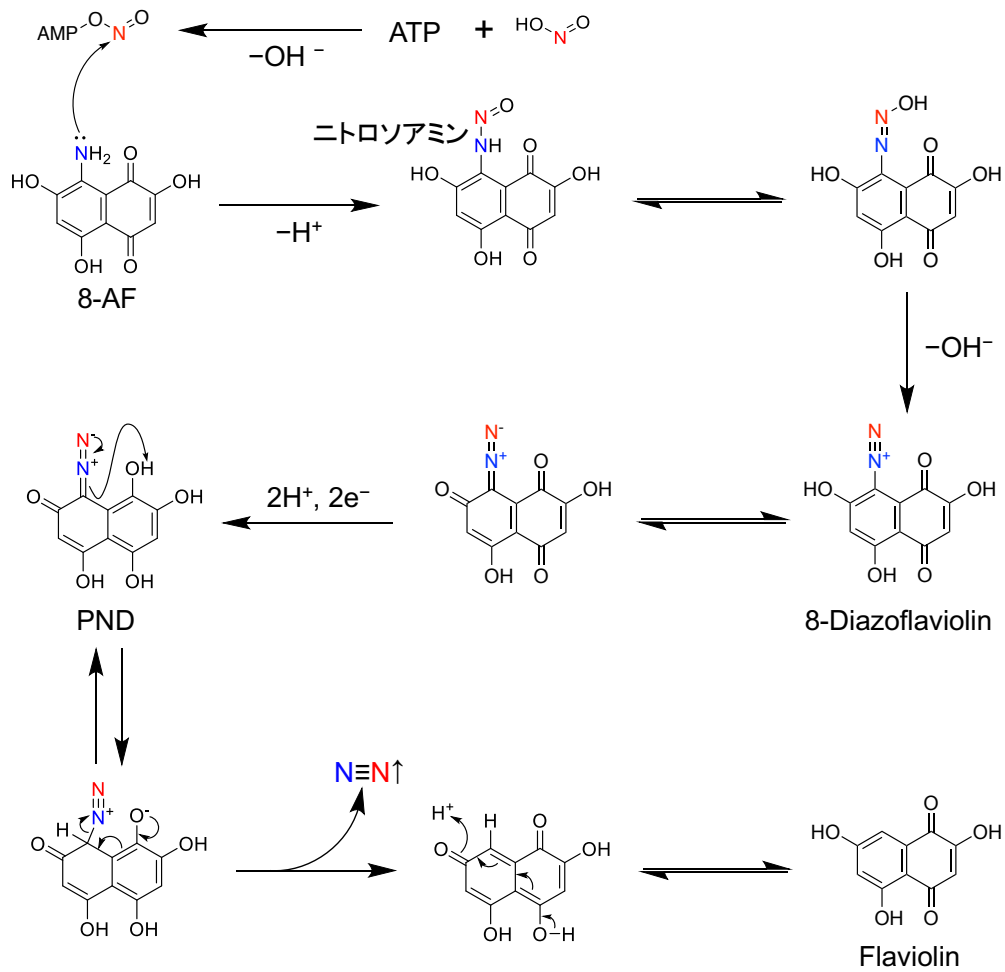


図 2-4 5 ジアゾ化酵素 Fur5 の推定反応機構と PND の自発的分解

アデニル化によって求電子性が増した亜硝酸の窒素原子に 8-AF のアミンが求核攻撃することでジアゾ基形成反応が始まると考えられる。PND から自発的に窒素が脱離することで Flavinol が生成すると考えられる。

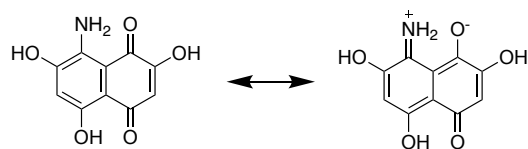


図 2-4 6 8-AF の共鳴構造

8-AF はこのような共鳴構造によってアミンの求核性が通常の芳香族アミンと比べて低くなっていると考えられる。

ナフトキノンは NADH によって非酵素的に還元されることが知られている⁹⁸が、8-AF を始めとした Furaquinocin の中間体の多くは非酵素的に NADH や NADPH によって還元されることはなかった。電子供与性の官能基はキノンの酸化還元電位を下げることで知られており^{99,100}、2,5,7 位の電子供与性のヒドロキシ基によってナフトキノンの酸化還元電位が下がり、NADPH などで非酵素的に還元されない様になっていると考えられる。一方で Fur5 によって電子吸引性のジアゾ基が導入されることでナフトキノンの酸化還元電位が上がり、Fur5 の反応によって生じた 8-Diazoflaviolin が PND へと還元される方向に平衡が偏って以降の反応が進行しやすくなっていると考えられる。なお今回用いた反応系においては亜硝酸が電子供与体として働くことで 8-Diazoflaviolin の還元が起きたと考えられる。

今回明らかにした還元的脱アミノ化の分子実態は、Fur5 による 8-AF のジアゾ化と続く NADPH による非酵素的なヒドリド還元によって PHN が生じることで達成されており、生体内ではこのような芳香族アミンの還元的脱アミノ化を触媒する酵素はほとんど知られていない。ただ、数少ない反応機構の解析例として GMP reductase がある。この反応ではシステインが基質 GMP と結合することによって、アンモニアとしてアミノ基が脱離する反応機構が提唱されている (図 2-4 7)¹⁰¹。

今回見出したジアゾ化を経由する還元的脱アミノ化は GMP reductase とは異なり、図 2-4 8 のような反応機構なのではないかと推定される。Fur5 によるジアゾ化と NADPH による還元的脱アミノ化においては、アンモニアよりもより強力な脱離基であるジアゾ基を窒素ガスとして脱離させることで、反応の進行を容易にしていると考えられる。

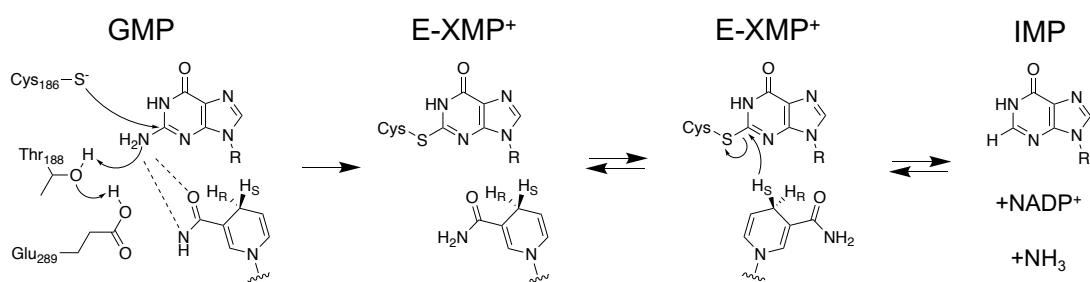


図 2-4 7 GMP reductase による還元的脱アミノ化

GMP reductase の反応においては Cys186 が GMP と結合することで炭素原子の求電子性を高め、ヒドリド還元を起こしやすくしている。

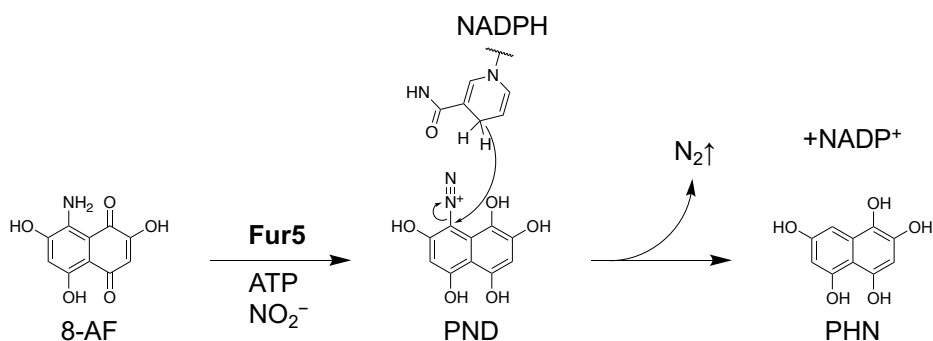


図 2-4 8 今回明らかにした還元的脱アミノ化の反応機構

Fur5 によって脱離基として優秀なジアゾ基 (窒素ガスとして脱離する) が生成するため、ヒドリド還元が起こりやすくなっている。

Fur6 は C-メチル基転移酵素であり、PNH の 3 位をメチル化することを明らかにした。SAM 依存性のメチル基転移は、基質の求電子性の部分から SAM のメチル基への S_N2 反応様の求核攻撃によって始まる¹⁰²。酸素より炭素は求核性が一般に低く、C-メチル基転移酵素の反応機構は O-メチル基転移酵素ほどは解析されていない。3-Hydroxykynurenine の 4 位の炭素のメチル化を触媒する C-メチル基転移酵素 SibL においてはチロシンが関与する図 2-4 9 のような反応機構が提唱されている。ここでは Tyr295 の補助によって 4 位の炭素の求核性が上がることで SAM への求核攻撃とメチル化を可能にしていると考えられる。最終的にもう一方の Tyr134 のプロトンの引き抜きによって再芳香化し、4 位のメチル化が完了すると推定されている¹⁰²。

Fur6 の反応においてはまず pK_a の最も低い 5 位のヒドロキシ基が脱プロトン化してフェノラートとなった状態で酵素活性中心ポケットに結合し、Trp151 や Asp253 による基質の認識によって正しい配向に配置されると考えられる。5 位のフェノラートからの電子の流れによって 3 位の求核性が上がり、SAM への求核攻撃が可能になり、3 位がメチル化される。その後 Tyr138 が関与する協奏的なプロトンリレーによって 3 位のプロトンが引き抜かれ、反応が終結すると考えられる。MD 計算で得られたモデルにおいて、Tyr138 は PHN のナフタレン環に対して SAM と反対側に位置しており、メチル化後の 3 位のプロトンの引き抜きに適した位置に存在している。ここで Asp253 は PHN の 1 位と 2 位のヒドロキシ基を認識することで、6 位ではなく 3 位の選択的なメチル化を可能にしていると考えられる (図 2-5 0)。Fur5, NADPH による還元的脱アミノ化によってキノン部分がヒドロキノンに変化することで 1 位がケトンからヒドロキシ基となることで初めて Asp253 による認識が可能になっていると考えられる。また、Flaviolin 類縁体においては 5 位のヒドロキシ基は 4 位のケトンと水素結合を形成しているため脱プロトン化しづらく、これも Fur6 によって認識されづらく、反応が進行しない原因の一つであると推測できる (図 2-5 1)。

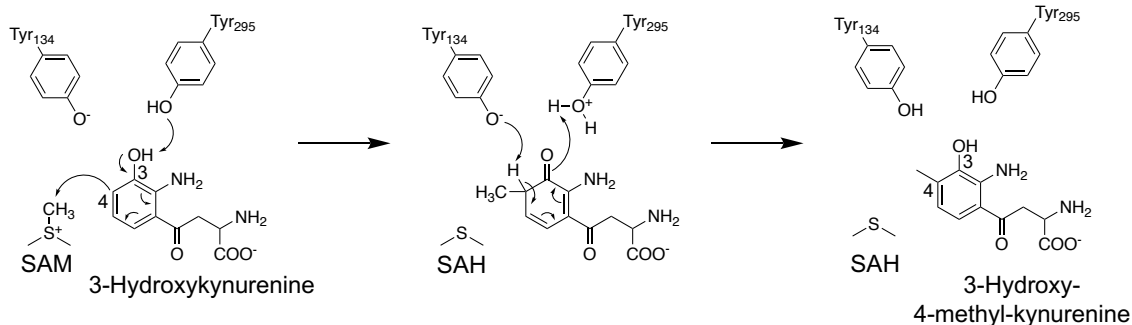


図 2-49 C-メチル基転移酵素 SibL の反応機構

Tyr295 の補助によって 4 位の炭素の求核性が上がることで SAM への求核攻撃とメチル化を可能にしていると考えられている。最終的にもう一方の Tyr134 のプロトンの引き抜きによって再芳香化し、4 位のメチル化が完了する。

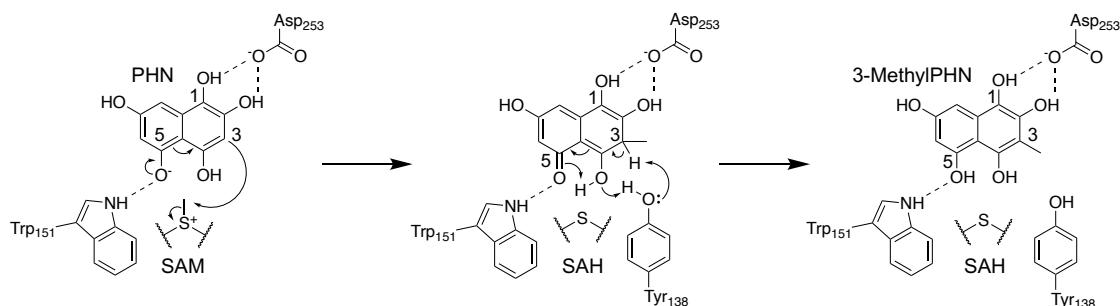


図 2-50 Fur6 の推定反応機構

5 位のフェノラートからの電子の流れによって 3 位の求核性が上がることで、SAM によってメチル化される。その後 Tyr138 が関与する協奏的なプロトンリレーによって 3 位のプロトンが引き抜かれ、反応が最終する。

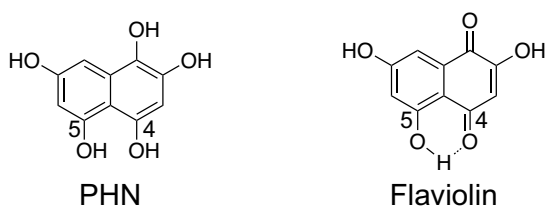


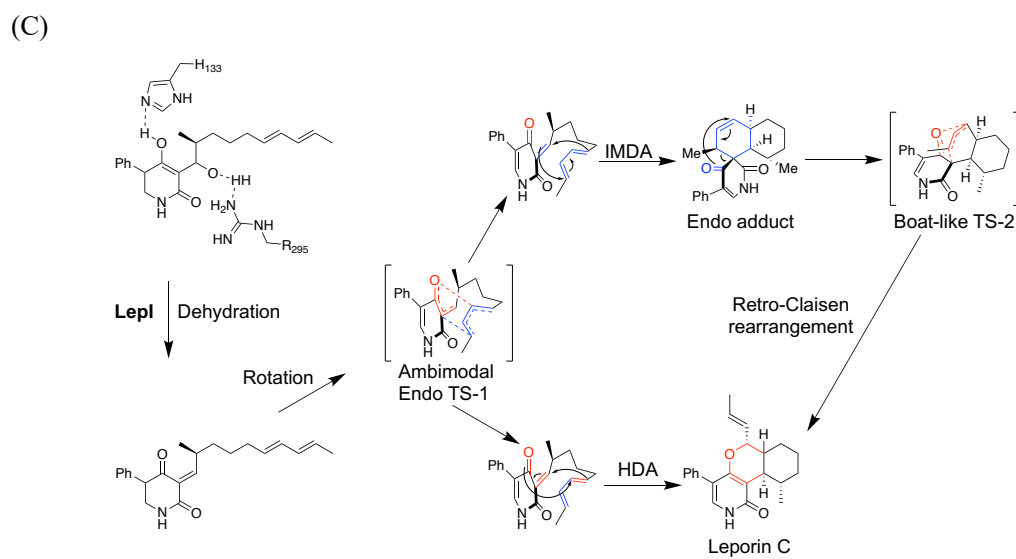
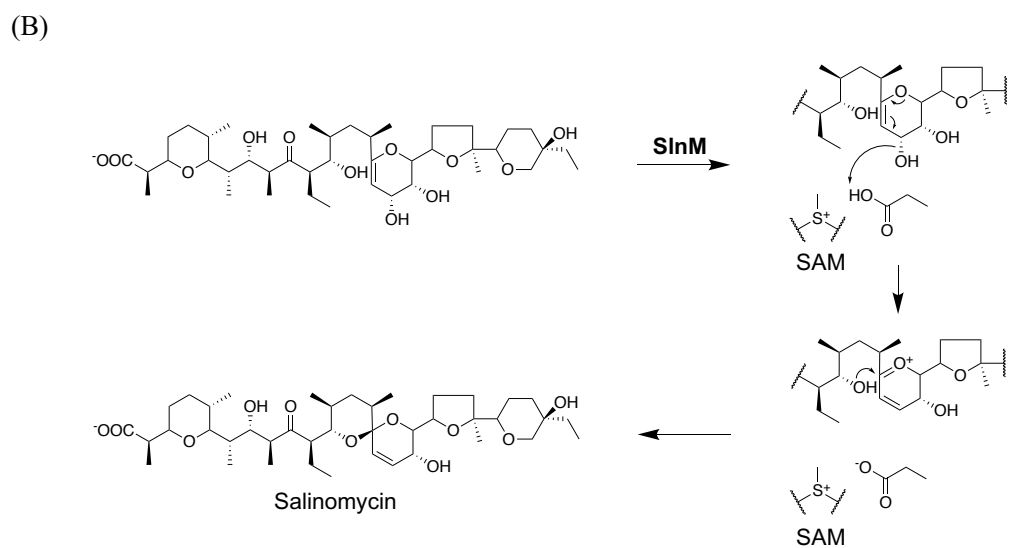
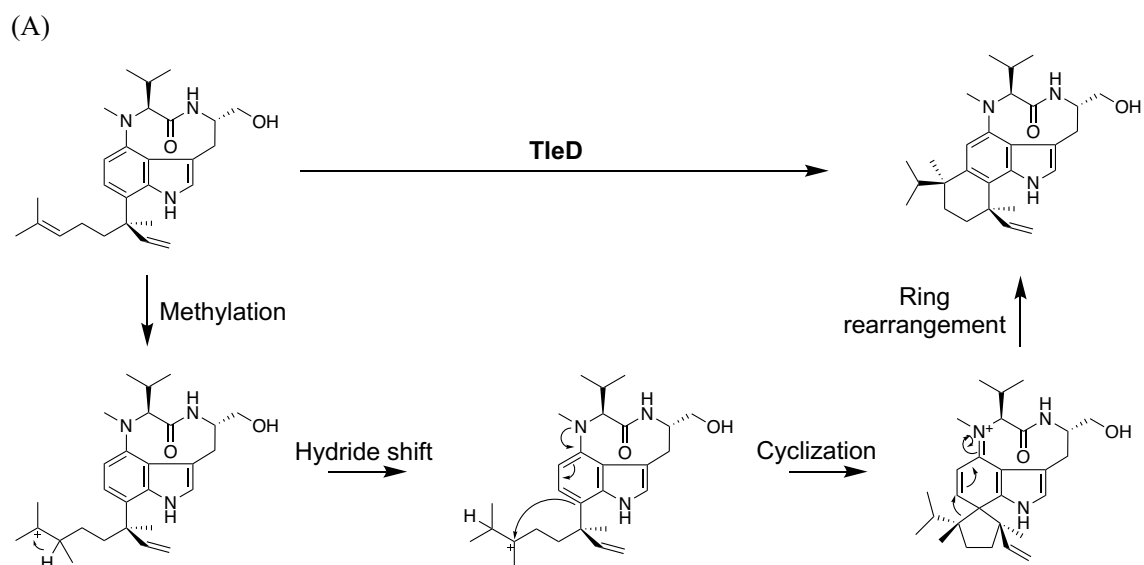
図 2-51 PHN と Flaviolin の構造比較

Flaviolin においては 5 位のヒドロキシ基が 4 位のケトンと水素結合を形成しており、脱離しづらくなっている。

これまでは Fur7 の基質は MMF であるとされてきたが⁹²、第 6 節で示した様に反応速度が桁違いに異なっていることから、MMF のキノンがヒドロキノンに還元された 2-Methoxy-3-methyl PHN が Fur7 の生理的な基質であることが明らかになった。Fur7 によるプレニル化もゲラニル基の求電子的な付加であるため、キノンがヒドロキノンに還元されることで環電子密度が上がり、プレニル化が起こりやすくなっていると考えられる。

Fur21 は SAM 依存性メチル基転移酵素のホモログでありながら、SAM 非依存的に環化を触媒する酵素であることを明らかにした。SAM 依存性メチル基転移酵素のホモログで環化反応を触媒する酵素の例はいくつか知られているが、いずれとも Fur21 の性質は異なる¹⁰³。TleD^{104,105} の触媒する環化反応においては SAM によるメチル化が必要である一方、Fur21 による環化はメチル化を必要としない。SlnM はメチル化を必要としない点で Fur21 と共通ではあるが、SAM が活性に必要である点で Fur21 と異なり、SAM アナログである Sinefungin でも活性が維持され、SAH で活性阻害が起こることから、SAM の正電荷が活性に必須であることが示されている¹⁰⁶。SAM の正電荷が活性に重要な例として他に Leporin 生合成酵素 LepI も知られており^{107,108}、ambimodal DA/HDA 反応、retro-Claisen 転位を触媒する SAM 依存性多機能酵素である。SpnF も SAM 依存性メチル基転移酵素様で環化を触媒するが、その環化様式は[4+2]環化付加反応であるため、Fur21 の触媒するヒドロアルコキシ化とは異なる。SpnF 反応における SAM の役割ははっきりとは明らかになっていないが、結晶構造中では SAM の電子密度がはっきりと観測されることから構造の維持に重要であると考えられ¹⁰⁹、Fur21 においても同様の役割を担っている可能性はある。

一方でカビ *Penicillium herquei* NRRL 1040 由来の PhnH は Fur21 と同様なヒドロアルコキシ化を触媒する酵素として同定されており、結晶構造とドッキングシミュレーションにより反応機構が推定されている。しかし、この PhnH はメチル基転移酵素とは異なり DUF3237 スーパーファミリーに属する 150 アミノ酸残基程度の小タンパク質であり、メチル基転移酵素のホモログである Fur21 とは大きく異なるタンパク質ファミリーである。しかし Fur21 の環化も酸塩基触媒による機構である可能性も考えられ (図 2-5 4)、今後の構造解析およびシミュレーションによって明らかとなることを期待する。



(D)

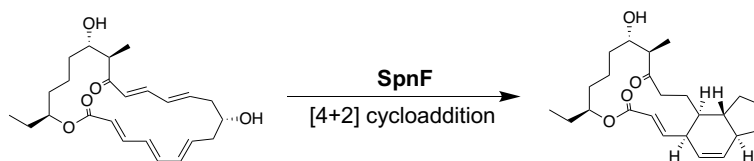


図 2-5 2 SAM 依存性メチル基転移酵素ホモログが触媒する環化反応の反応機構

(A) メチル基転移酵素 TleD の触媒する環化反応. (B) メチル基転移酵素ホモログ SImM が触媒する環化反応. (C) メチル基転移酵素様の LepI が触媒する intramolecular Diels-Alder (IMDA) 反応と hetero-Diels-Alder (HAD) 反応. (D) メチル基転移酵素様の SpnF が触媒する [4+2] 環化付加反応.

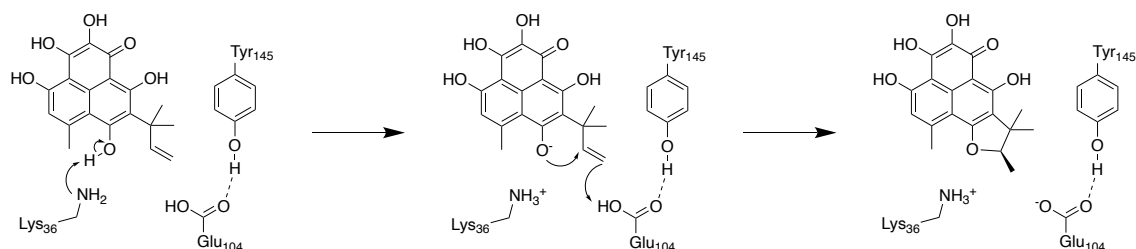


図 2-5 3 DUF3237 スーパーファミリーの PhnH が触媒する環化の推定反応機構

Lys36 による基質ヒドロキシ基のプロトンの引き抜きと、Glu104 によるオレフィンのプロトン化を介したヒドロアルコキシ化反応機構。

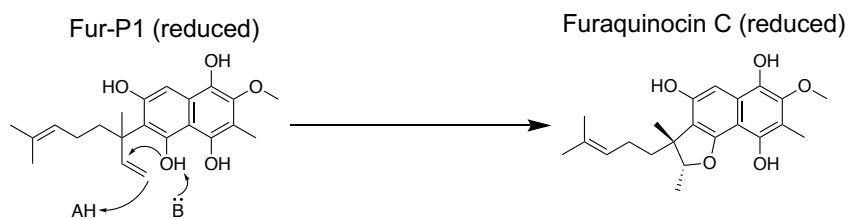


図 2-5 4 Fur21 の推定反応機構

Fur21 のアミノ酸残基の酸塩基触媒によるヒドロアルコキシ化の予想反応機構。

第8節では、Furaquinocin Dは電子メディエーターとして機能し、呼吸鎖タンパク質である Cytochrome *c* を還元しうることを明らかにした。Menaquinone や PkQ においては長鎖のイソプレン側鎖やアルキル側鎖を有することで膜中にアンカーされ、電子メディエーターとして機能する。Furaquinocin の場合にはより短いゲラニル側鎖が付与されているため、膜との相互作用は Menaquinone や PkQ に比べて低いと考えられる。膜との結合性の緩さから細胞質内でも再還元されることができ、Menaquinone などと比べて流動性のある電子メディエーターとして働き、膜表層に存在する呼吸鎖タンパク質の還元に関与している可能性が考えられる。

第3章 *Streptomyces antibioticus* B-546 における Fur5 ホモログと共脱窒

第2章で見出した還元的脱アミノ化の反応様式 (図 3-1) は共脱窒の反応様式 (図 3-2) と酷似している。共脱窒は亜硝酸と、アミノ基供与体の両窒素原子由来のハイブリッドな窒素原子が放出される現象であり、両方の窒素原子が硝酸ないし亜硝酸に由来する通常の脱窒 (図 3-3) と大きく様式が異なる。共脱窒はカビにおいて初めて見出された現象であるが、放線菌 *Streptomyces antibioticus* B-546 も共脱窒を行うことが報告されている¹¹⁰。カビにおいてはシトクロム P450 のホモログである P450_{nor} が共脱窒を担っていることが明らかにされているが¹¹¹、放線菌においては共脱窒の分子基盤が明らかにされていない。第2章で見出された Fur5 によるジアゾ化を起点とした還元的脱アミノ化は、亜硝酸と有機態窒素 (8-AF) の両方由来のハイブリッドな窒素ガス放出が起こるため、共脱窒現象の一種であると言える。このことから、*S. antibioticus* においても Fur5 ホモログが共脱窒反応の起点となるジアゾ化を担っていることが示唆される。*Streptomyces antibioticus* DSM41481 のゲノム上には亜硝酸合成カセット CreD, E ホモログと還元的脱アミノ化酵素 Fur5 ホモログが近傍に存在してクラスターを形成しており、アミノ基を持つ芳香族 *p*-アミノフェニルピルビン酸合成カセット¹¹² もクラスター内に含まれることを見出した。*p*-アミノフェニルピルビン酸と亜硝酸が Fur5 によって、ジアゾ化され NADPH など生体内還元物質によるヒドリド還元によって窒素ガスとして脱離することで共脱窒が達成されると考えられる。以上の考察から、この遺伝子クラスターが放線菌の共脱窒反応に関与している可能性が考えられた (図 3-4)。

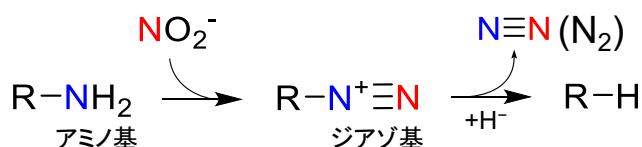


図 3-1 前章で見出した還元的脱アミノ化の様式

アミノ基が亜硝酸とともに縮合してジアゾ基を形成し、ヒドリド還元によって窒素ガスとして放出されることで還元的脱アミノ化が完了する。

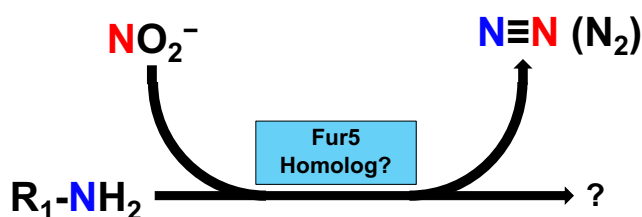


図 3-2 共脱窒の反応様式

有機態の窒素と亜硝酸由来のハイブリッドな窒素ガスが放出される共脱窒。



図 3-3 通常の脱窒の反応様式

通常の脱窒反応においては硝酸還元酵素 (NAR)や亜硝酸還元酵素 (NIR)が関与し、窒素ガス (N₂)の両窒素原子は同じ硝酸由来である。

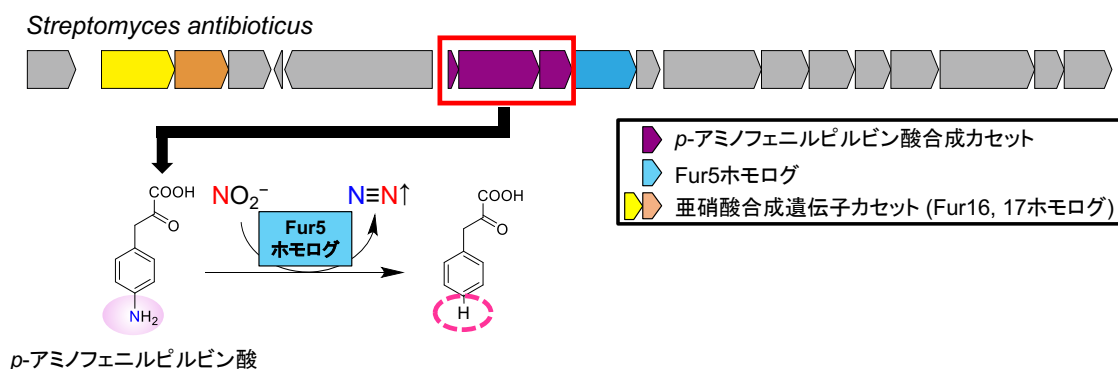


図 3-4 *Streptomyces antibioticus* ゲノム中の Fur5 ホモログ

S. antibioticus のゲノムには亜硝酸合成系である ANS 経路、ジアゾ基形成酵素 Fur5 のホモログ、芳香族アミンである p -アミノフェニルピルビン酸の合成遺伝子カセットがクラスターを形成している。

第1節 *Streptomyces antibioticus* B-834 のゲノムの調製と解読

データベース上には *S. antibioticus* DSM41481 のゲノム情報は存在していたものの、共脱窒を行うことが報告されている *S. antibioticus* B-546 のゲノム情報は存在していなかった。そのため、B-546 株のゲノム調製と解読を行うことにした。試験管中 (10 mL) の J 培地で 3 日間培養した前培養液を 34% Sucrose 濃度条件の J 培地 (+0.5% Glycine) の試験管 (10 mL) に 0.5% 植菌し、7-10 日間培養した。ゲノムの調製は実験項に記し、シーケンスの解読は北海道システム・サイエンス株式会社に委託した。その結果、DNA 塩基配列はやや異なるものの、*S. antibioticus* B-546 のゲノム中にも上で述べた Fur5,16,17 のホモログと p -アミノフェニルピルビン酸を含むクラスター (図 3-4) が存在していることが明らかとなった。

第2節 一回交叉法による Fur5 ホモログの破壊

前節で明らかとなった遺伝子クラスターの Fur5 ホモログ (Fur5a とする。Identity は 26% 程度)がジアゾ化を触媒し、還元的脱アミノ化に関与している可能性が考えられた。そのため、この遺伝子を破壊して、共脱窒による窒素ガス放出がどの様に変化するか調べることを目指した。*S. antibioticus* B-546 株のゲノム DNA を鋳型とした PCR を行い Fur5a の中間領域を増幅し (表 3-1)、Hind III で消化した断片を Hind III で消化と BAPC75 で脱リン酸化した pUC118apr¹¹³ にクローニングし、破壊用ベクターとした。破壊用ベクターをプロトプラスト-PEG 法により B-546 株に導入し、25 µg/mL Apramycin を含む R2YE プレート上で一回交叉体を選抜した。以下のようなコロニーPCR により破壊株の作製を確認した。プライマーは、一方が pUC118apr 上、他方は B-546 株ゲノム上にアニーリングするように設計した (図 3-5)。野生株では DNA の増幅が見られないが、破壊株では約 1200 bp の DNA の増幅が確認できると予想された (表 3-2)。

破壊株をテンプレートとしたコロニーPCR の結果、予想された通り、破壊株特異的な約 1200 bp の増幅が確認できた (図 3-5)。このことから *fur5a* の破壊株が取得でき、*S. antibioticus* $\Delta fur5a$ とした。

表 3-1 *S. antibioticus* の Fur5 ホモログ破壊用ベクター作製のためのプライマー

HindIII_fur5h-del_f	5'-GGGAAGCTTGACTCCTTCGCGTACTCGGTGCACTACTAC-3'
HindIII_fur5h-del_r	5'-GGGAAGCTTGAGGTAGAAGTCGCCGTTCTCGTCCCG-3'

表 3-2 破壊の確認のためのプライマー

primer A	5'-GCGCAGAGCTGGTCGGCGTACTACCTG-3'
primer B	5'-GGCGAATGGCGGAGCAGACGCTCGTC-3'
primer C	5'-GGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGC-3'
primer D	5'-CCTGGAGCAGCACGACCTCCTCCATGAAGAC-3'

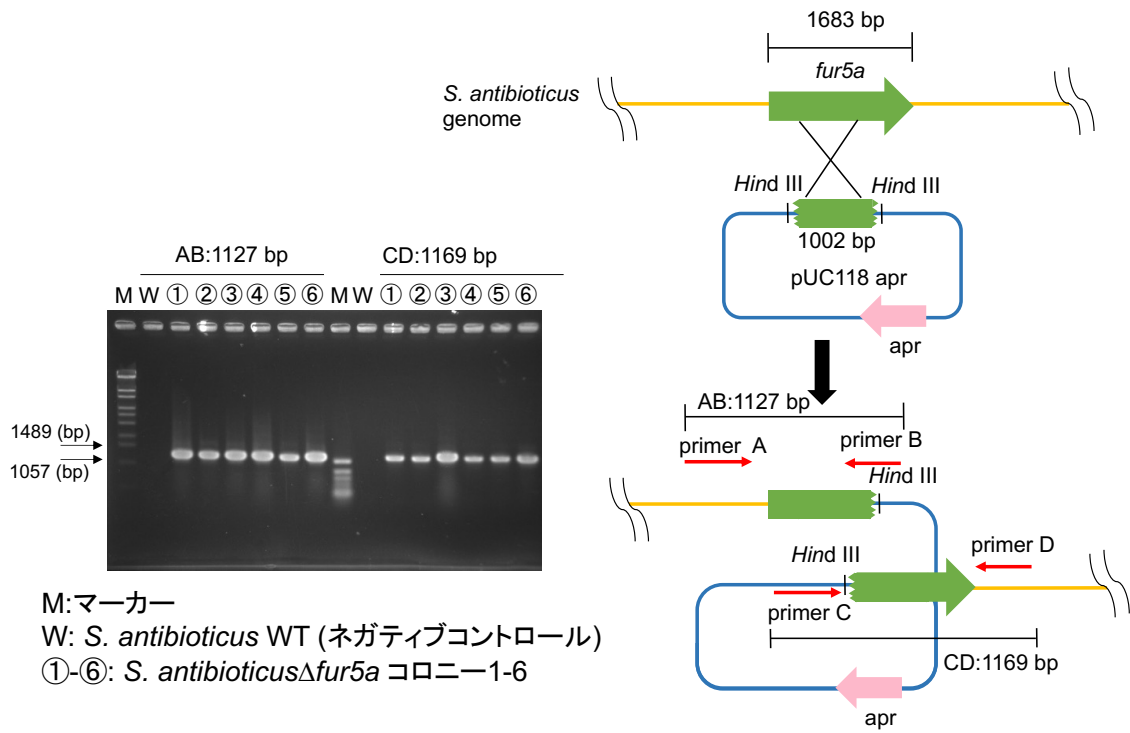


図 3-5 一回交叉法による破壊の様式 (右)とコロニーPCRによる破壊の確認 (左)

prime A,B によって増幅される領域 (1127 bp)と prime C,D によって増幅される領域 (1169 bp)の電気泳動の結果を左に示している。

第3節 Fur5 ホモログ破壊株における共脱窒

前項で作成した *S. antibioticus* $\Delta fur5a$ および野生株に共脱窒能の差異が見出せるか調べるため、両株を TSB 培地 (10 mL, $\Delta fur5a$ 株は 25 $\mu\text{g/ml}$ apr 添加) で 2 日間培養し、GP 培地¹¹⁰ (+10 mM $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$, $\Delta fur5a$ 株は 25 $\mu\text{g/ml}$ apr 添加) に 2% 植菌して 4 日間培養した。なお GP 培地による本培養は密閉式のゴム栓を用いたバッフル内 (100 mL) でおこなった。GC-MS を用いて培養液気相の $^{29}\text{N}_2$ ($^{14}\text{N} \equiv ^{15}\text{N}$) を検出することで共脱窒能を比較した。

その結果、 $\Delta fur5a$ と野生株間で大きな差を見出すことはできなかった。一方で野生株においても大気中の天然存在の $^{29}\text{N}_2$ と明らかな差が見出せなかった。

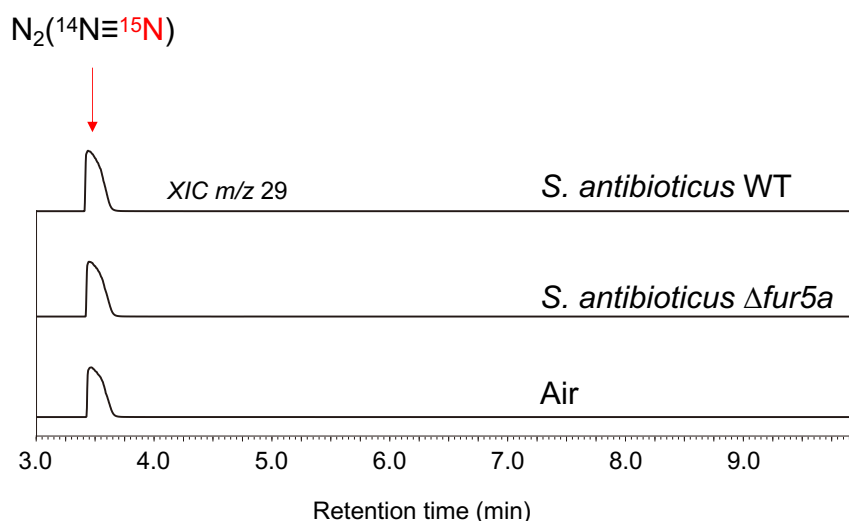


図 3-6 野生株と *fur5a* 破壊株培養液気相の $^{29}\text{N}_2$ の XIC クロマトグラム (m/z 29)

一番下の段から、大気 (ネガティブコントロール)、*fur5a* 破壊株、野生株のクロマトグラム

第4節 考察

本章では共脱窒を放線菌 *S. antibioticus* B-546 における共脱窒の分子メカニズムの解明を目指した。共脱窒に関与すると推察された *fur5* ホモログである *fur5a* の破壊によっては大きな共脱窒能の差異は見出されなかった。しかし、野生株においても共脱窒によって生成すると予想される $^{29}\text{N}_2$ 大気中の天然存在の $^{29}\text{N}_2$ と明らかな差が見出せなかった。今回用いた GP 培地においては生育が非常に悪く、そのため十分な共脱窒が行われなかったのではないかと推察される。今後は、より共脱窒能を引き出すことのできる培地条件を検討していくことで、*fur5a* の共脱窒への関与が明らかになっていくと期待される。

第4章 Naphterpin の生合成に関する研究

Naphterpin は、放線菌 *Streptomyces* sp. CL190 の生産するメロテルペノイドであり、抗酸化活性を示す。Naphterpin の生合成遺伝子クラスターは当研究の松井により決定されているが(松井良太修士論文, 2007)、異種放線菌における Naphterpin の生産には至っていない(図 4-1、表 4-1)。当研究室の磯貝によって、1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalene (THN)合成酵素 NphC と Cupin ドメインを有する酸化酵素 NphD の触媒する連続反応によって THN から Mompain が生合成されることが明らかにされており、続いて PLP 依存性アミノ基転移酵素 NphE によって 8-Amino-flaviolin (8-AF)が生成し、8-AF が Naphterpin 生合成中間体であることが証明されている(磯貝章太博士論文, 2012)。なお、NphE は第1章で明らかにしたように、酸化的アミノ基転移を触媒する二機能性の酵素である。テルペノイド骨格とポリケタイド骨格の縮合反応は、プレニル基転移酵素 NphB によって触媒される。当研究室の織田によって *nphB* 破壊株が作製され(織田浩嗣修士論文, 2004)、*nphB* 破壊株特異的に蓄積する化合物 3,6,8-Trihydroxy-2-methoxy-3-methylnaphthalene-1,4-dione (d2-8)が同定されたが、d2-8 は NphB の基質とならず NphB の生理的基質が菌体内で変換されたシャント産物であると推測された。これまでに NphB の生理的基質の同定には至っていないものの、当研究室の熊野によって2位がプレニル化され、3位にヒドロキシ基が転位した BE69785A(特開平 11-349522)が Naphterpin 生合成中間体であることが示されており(熊野匠人博士論文, 2009)、ゲラニル基を有することから NphB 反応後の化合物であると推測できる(図 4-2)。BE69785A の構造を考慮すると、2位から3位へのヒドロキシ基の転位、8位のアミノ基の還元的脱アミノ化、6位の炭素原子のメチル化といった反応が起こると推測される(図 4-2)。

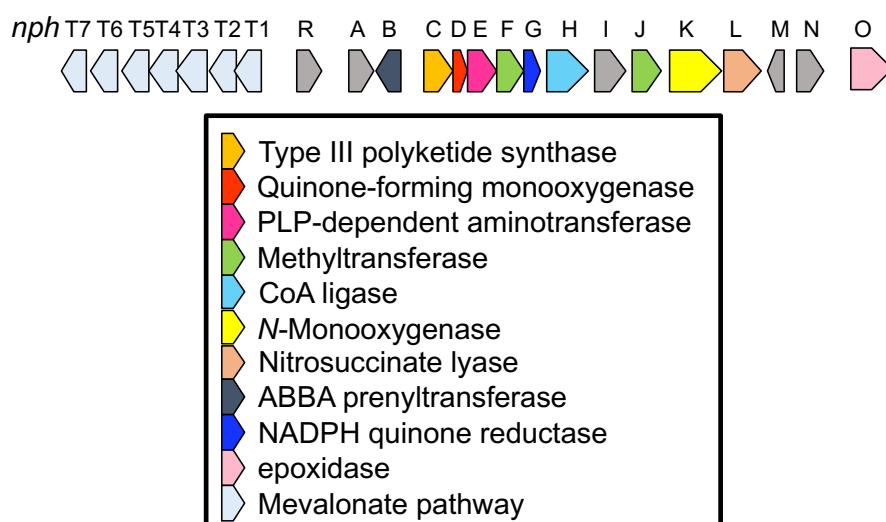


図 4-1 Naphterpin 生合成遺伝子クラスター

表 4-1 Naphterpin 生合成遺伝子クラスターに含まれる ORF の推定アミノ酸配列の相
同性検索結果

Gene	Amino acids (No.)	Proposed function	Sequence similarity (protein, origin)	Similarity / Identity (%)	Protein accession number
NphR	305	putative transcriptional regulator	<i>Streptomyces tendae</i>	85/79	AFS18560
NphA	319	putative sigma factor	<i>Streptomyces tendae</i>	90/84	AFS18561
NphB	307	prenyltransferase	Fnq26, <i>Streptomyces cinnamomensis</i>	61/43	CAL34104
NphC	355	Type III polyketide synthase	RppA, <i>Streptomyces antibioticus</i>	95/89	BAB91443
NphD	188	quinone forming monooxygenase	MomA, <i>Streptomyces antibioticus</i>	89/84	BAD89290
NphE	385	PLP dependent aminotransferase	Fur3, <i>Streptomyces</i> sp. KO-3988	88/79	BAE78971
NphF	331	SAM dependent <i>O</i> - methyltransferase	Fur4, <i>Streptomyces</i> sp. KO-3988	85/75	CAL34087
NphG	206	NAD(P)H:quinone oxidoreductase	Fnq10, <i>Streptomyces cinnamomensis</i>	86/72	CAL32088
NphH	528	fatty acid CoA ligase	NapB4, <i>Streptomyces</i> sp. CNQ525	88/81	ABS50481
NphI	408	putative SAM synthase	Fnq12, <i>Streptomyces cinnamomensis</i>	92/88	CAL34090
NphJ	356	SAM dependent <i>C</i> - methyltransferase	Fur6, <i>Streptomyces</i> sp. KO-3988	84/69	ABS50493
NphK	671	<i>N</i> -monooxygenase	CreE, <i>Streptomyces cremeus</i>	68/59	BAE78984
NphL	473	Nitrosuccinate lyase	CreD, <i>Streptomyces cremeus</i>	71/63	BAE78985
NphM	208	hypothetical protein	Fur18, <i>Streptomyces</i> sp. KO-3988	74/64	BAE78986
NphN	355	GPP synthase	NapT7, <i>Streptomyces</i> sp. CNQ525	81/68	ABS50482
NphO	509	FAD-dependent oxidoreductase	Mcl14, <i>Streptomyces</i> sp. CNH189	77/68	AGH68899

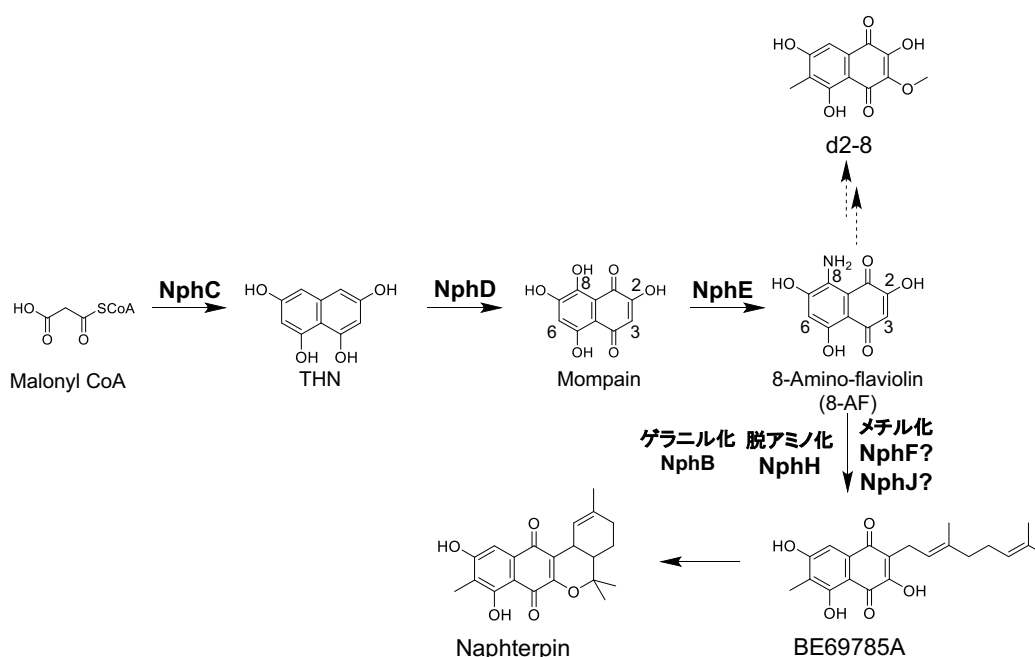


図 4-2 これまでに明らかにされてきた Naphterpin 生合成経路

中間体として 8-AF の他に BE69785 が明らかにされていた。なおプレニル基転移酵素をコードする *nphB* 破壊株においてはシャント産物 d2-8 が蓄積する。

第 1 節 Naphterpin 生合成の転位反応の解析

第 1 項 転位反応における VHPO の関与の検証 (修士課程)

放線菌の生産するメロテルペノイドには THN 由来の骨格を有するものが多く存在し、プレニル化の様式によって Class I と Class II に分けられることが提唱されている¹¹⁴(図 4-3)。Class I メロテルペノイドはヒドロキシ基が隣接して電子密度が高くなり、比較的求核性に富んだ THN の 2 位や 4 位炭素原子がプレニル化されている。しかし Class II メロテルペノイドでは電子密度が低く、本来プレニル化されにくいヒドロキシ基の根本の 3 位の炭素がプレニル化されている。Class II メロテルペノイドは、VHPOs (vanadium-dependent haloperoxidases) がヒドロキシ基に結合した電子密度の低い炭素をプレニル化するために、まず電子密度のより高いヒドロキシ基のオルト位の炭素をまずプレニル化し、セミピナコール転位様の α -ヒドロキシケト転位を起こさせる戦略をとっていることが明らかとなった¹¹⁴(図 4-4)。Napyradiomycin A1 生合成においては VCPO (vanadium-dependent chloroperoxidase) である NapH3 がこの転位反応を担っていることも明らかとなっている。

Naphterpin の生合成クラスター中には NapH3 ホモログは存在しないものの、Naphterpin 生産菌である *Streptomyces* sp.CL190 のゲノム中には Napyradiomycin A1 生産菌の NapH3 と 63% と高いアミノ酸配列相同性を示す NapH3 ホモログが存在することが *in silico* 解析から判明した。しかし、修士課程において行った *naphH3* ホモログの破壊実験から、Naphterpin の生合成においては *naphH3* ホモログが無関係であることが示された(図 4-5、図 4-6)。

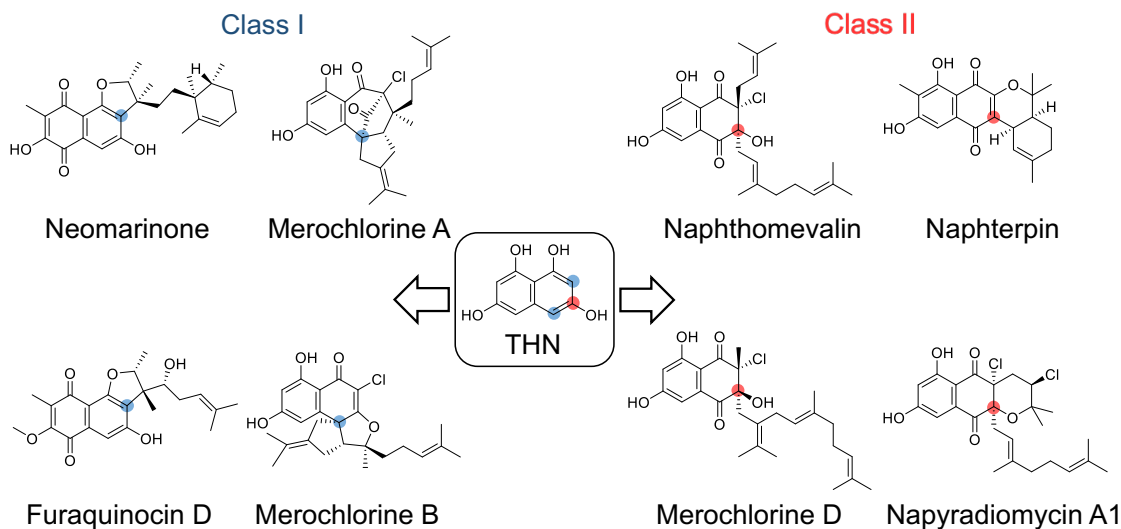


図 4-3 THN 骨格に由来する放線菌の生産するメロテルペノイド

Class I メロテルペノイドにおいては THN 電子密度の高い炭素原子がプレニル化されており、Class II メロテルペノイドにおいては電子密度の低い炭素原子がプレニル化されている。

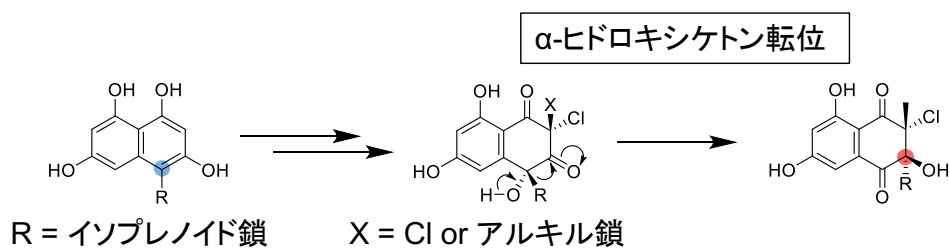


図 4-4 Class II メロテルペノイドにおける VHPO によるイソプレノイド鎖転位反応

一旦、電子密度の高い部分にイソプレノイド鎖を導入し、ヒドロキシ基の導入とセミピナコール転位様の α-ヒドロキシケトン転位によって隣の炭素へとイソプレノイド鎖を転位させる。

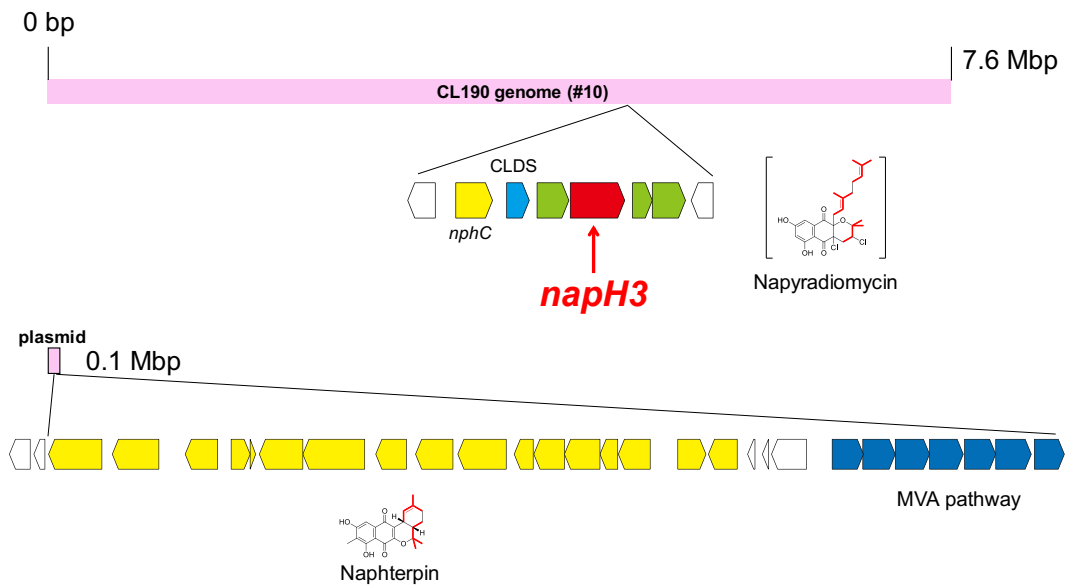


図 4-5 Naphterpin 生産株 CL190 のゲノム中の *naphH3* ホモログ

0.1 Mbp のプラスミド上にある Naphterpin の生合成クラスター内には *naphH3* ホモログは存在しないものの、ゲノム中には Napyradiomycin のクラスターの一部と *naphH3* ホモログが存在していた。CLDS, cyclolavandulyl diphosphate synthase

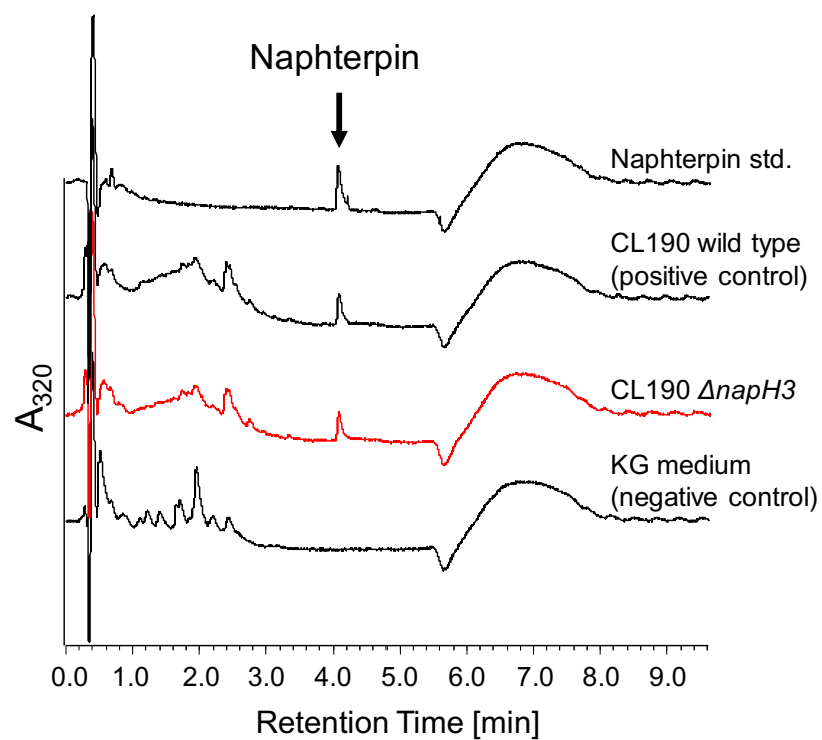


図 4-6 CL190 $\Delta naphH3$ (*naphH3* 破壊株)培養液の UPLC 解析 (320 nm の吸収波長)
 赤色で示した *naphH3* 破壊株においても Naphterpin を生産していた。

第2項 転位反応に関与する酵素の予測

前項で VHPO の Naphterpin 生合成への関与が否定されたため、別の機構を予想することにした。Aurachin 生合成においては FAD 依存性モノオキシゲナーゼ AuaG と NAD(P)H 依存性の還元酵素 AuaH が関与するエポキシ化とヒドリド還元を介した図 4-7 のような反応機構が明らかにされている。Naphterpin 生合成クラスター中には、AuaG や AuaH とは相同性を示さないもののエポキシダーゼと推定される NphO や NADPH 依存性デヒドロゲナーゼである NphG が存在しており (表 4-1)、これらの酵素が関与するエポキシ化や還元を介した 2 位から 3 位へのヒドロキシ基の転位や 3 位から 2 位へのプレニル基の転位が起こるのではないかと予想した (図 4-8)。

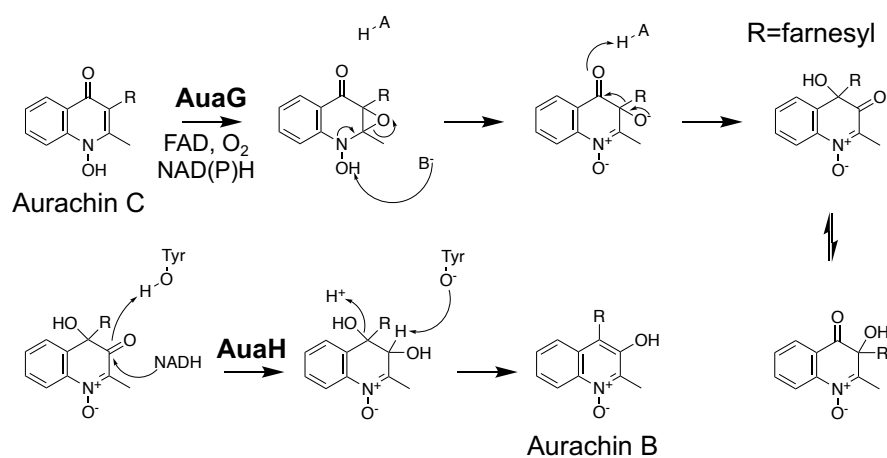


図 4-7 Aurachin 生合成におけるプレニル基転位反応

Aurachin 生合成においては AuaG によるエポキシ化と AuaH によるケトンの還元によってプレニル基 (farnesyl 基) 転位を達成している。

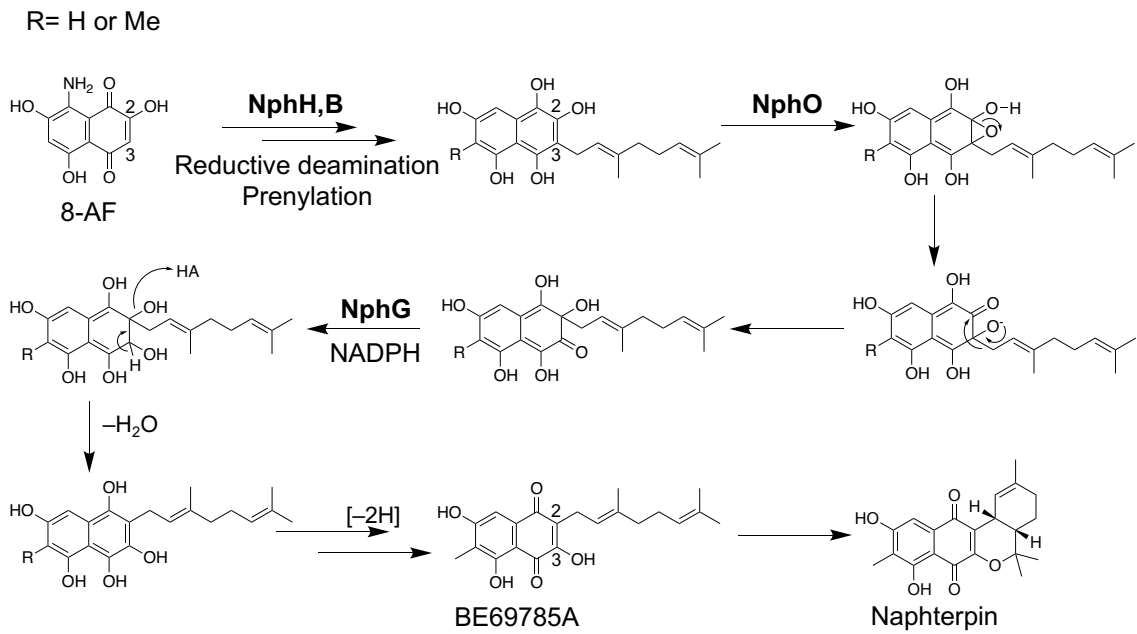


図 4-8 エポキシ化と還元を介した Naphterpin の推定転位反応機構

Naphterpin 生合成において推定した NphO によるエポキシ化と NphG によるケトンの還元を介したプレニル基転位。

第3項 *nphO* の破壊株作製

前項で転位反応のうちエポキシ化に関与すると推定された *nphO* の二回交叉法 (図 4-9) による破壊を目指した。まず *nphO* の中央部 1281 bp を除去する配列とし、その上流と下流の約 2000 bp をそれぞれ Up 配列と Down 配列とした。これらの配列を増幅させるために、Up 配列上流側と Down 配列下流側に *Hind* III サイト、Up 配列下流側と Down 配列上流側に *Xba* I サイトを付加したプライマーを設計した (表 4-2)。これらのプライマーを用いて CL190 株のゲノム DNA を鋳型とした PCR を行い、Up 配列と Down 配列の目的断片を増幅を行った。*Hind* III, *Xba* I で消化した Up 配列と Down 配列それぞれの増幅断片を、*Hind* III で消化と BAPC75 で脱リン酸化した pUC118apr¹¹³ にクローニングし、破壊用ベクターとした。これをプロトプラスト-PEG 法を用いて CL190 株に導入した。得られた一回交叉体変異株を TSB 培地で 2 日間培養を行った後に、前培養液を SK-II 培地 (+1% Gly) に 1% 植菌し、30°C で 2 日間本培養した後、プロトプラスト化し、適宜希釈して TSB 培地で培養することでシングルコロニーを取得した。シングルコロニーを 25 µg/mL Apramycin を含む TSB 寒天培地へと植え継ぎ、apr 感受性となった株を CL190 Δ*nphO* として選抜した。表 4-2 に示したプライマーを用いて PCR を行うことで標的配列の欠失を確認した。その結果、CL190 野生株では 1828 bp の、CL190 Δ*nphO* では 1281 bp 欠落した 547 bp の増幅が確認できたことから、二回交叉株の取得に成功した (図 4-10)。

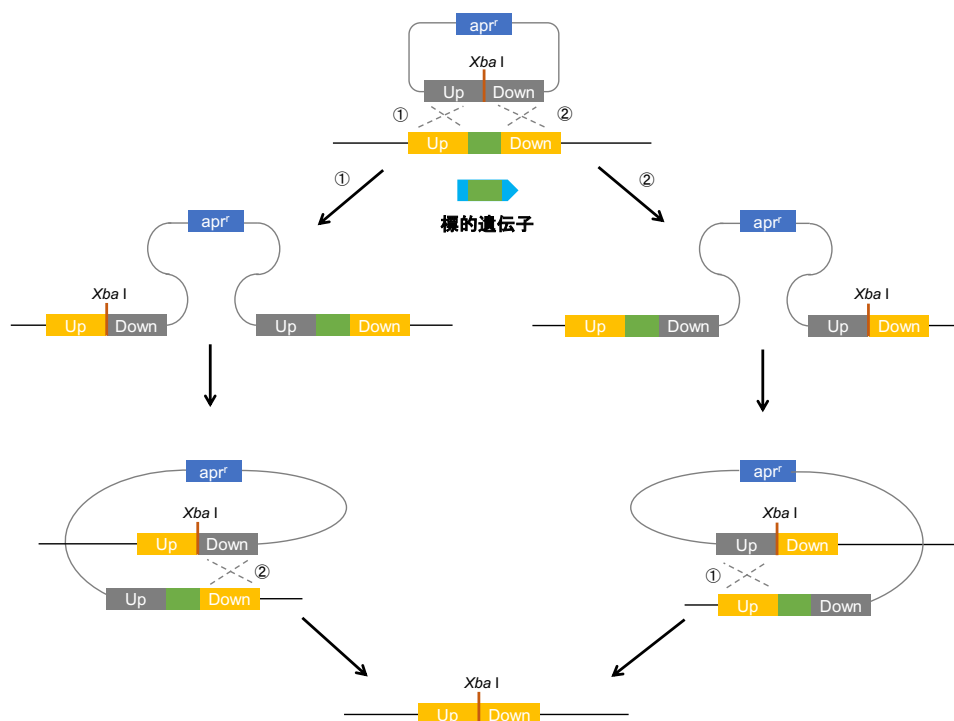


図 4-9 二回交叉法による遺伝子破壊の模式図

表 4-2 *nphO* の破壊と確認に用いたプライマー

dnphO_UP_f	5'-AACGCTCGGTTGCCGCGGGCGTTTTTATCTAGAGTGTGGCGGGAGGAACTGATGGAGATGGC-3'
dnphO_UP_r	5'-CCGTGAGTGGTGCTGGGCATGAAGTTGGCGAGGGCGCGTGCCG-3'
dnphO_DOWN_f	5'-CCCTCGCCAAC TTCATGCC CAGCACC ACTCACGGCCAGGGC-3'
dnphO_DOWN_r	5'-GCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTCTAGAGCAGGTCGTCCGGGAGCGAGTACCC-3'
dnphO_check_f2	5'-CGCTCGACATCCGCTCAAGGTCTGCTCG-3'
dnphO_check_r2	5'-AGCGGTTTCGGCCGGGCAGGGTTTTTCG-3'

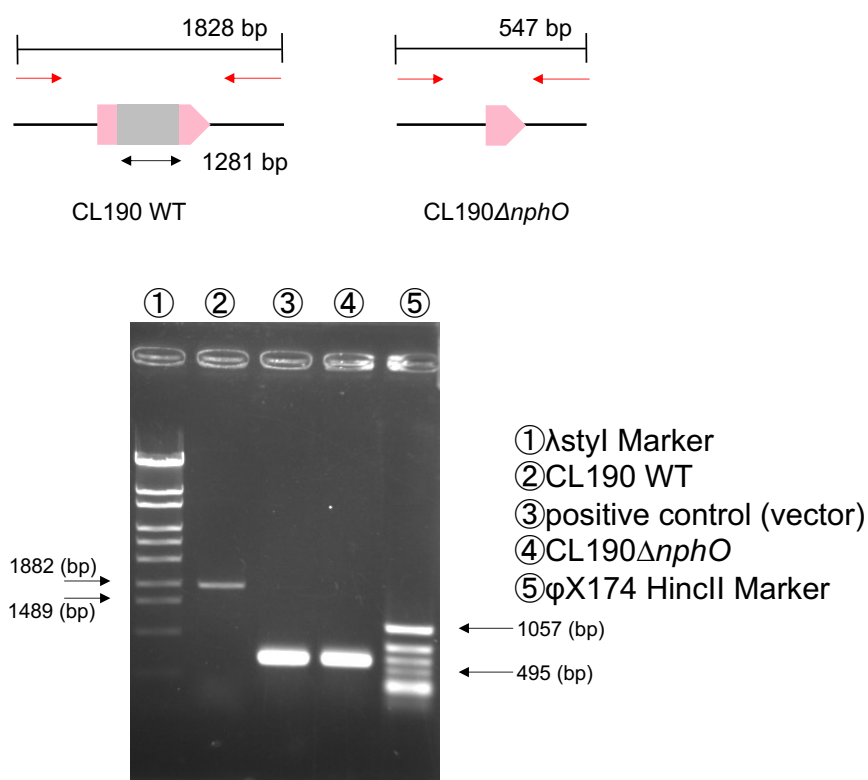


図 4-10 *nphO* の破壊の確認

nphO 破壊株特異的に増幅されるバンドを電気泳動によって確認した。予想通り、野生株では約 1.8 kb の DNA が増幅し、*nphO* 破壊株では約 0.5 kb の DNA が増幅した。

第4項 *nphO* 破壊株の生産物分析

前項で得られた CL190 $\Delta nphO$ が生合成中間体を蓄積する可能性が考えられたため、培養液の分析を行うことにした。CL190 $\Delta nphO$ を TSB 培地で 30°C, 2 日間前培養した。前培養液を KG 培地 (+25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apr) に 2% 植菌し、27°C, 180rpm で日間培養した。培養液 500 μL を当量の酢酸エチルで抽出し、エバポレーターで乾固させ、200 μL の MeOH で再溶解させた遠心上清を LC-MS/MS 解析に供した。その結果、*nphO* の破壊は Naphterpin の生産には影響を与えず、*nphO* は Naphterpin 生産に関与しない、もしくは他の遺伝子によって機能が相補されている可能性が考えられた (図 4-1 1)。

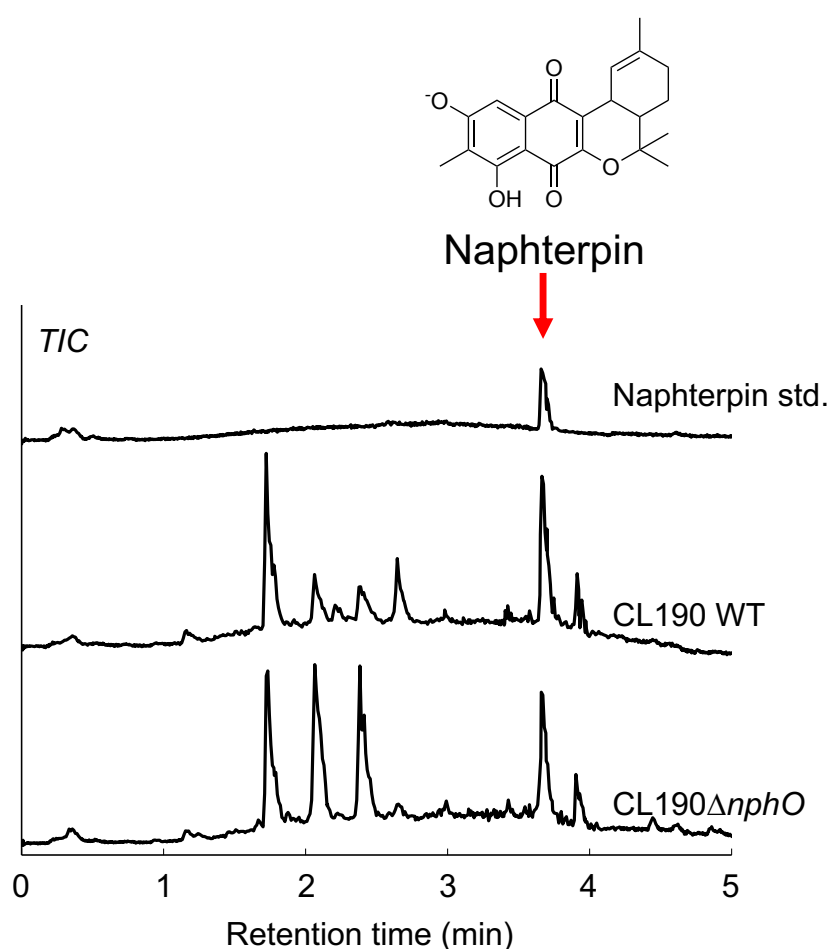


図 4-1 1 *nphO* 破壊株の培養液の LC-MS 分析 (TIC)

一番下のクロマトグラムが CL190 $\Delta nphO$ のクロマトグラムであり、Naphterpin を生産していることが確認できた。

第5項 *nphG* の破壊株作製

第2項で転位反応のうち還元に関与すると推定された *nphG* の二回交叉法 (図 4-9) による破壊を目指した。まず *nphG* の中央部 333 bp を除去する配列とし、その上流と下流の約 2000 bp をそれぞれ Up 配列と Down 配列とした。これらの配列を増幅させるために、Up 配列上流側と Down 配列下流側に *Hind* III サイト、Up 配列下流側と Down 配列上流側に *Xba* I サイトを付加したプライマーを設計した (表 4-3)。これらのプライマーを用いて CL190 株のゲノム DNA を鋳型とした PCR を行い、Up 配列と Down 配列の目的断片の増幅を行った。*Hind* III, *Xba* I で消化した Up 配列と Down 配列それぞれの増幅断片を、*Hind* III で消化と BAPC75 で脱リン酸化した pUC118apr にクローニングし、破壊用ベクターとした。これをプロトプラスト-PEG 法を用いて CL190 株に導入した。得られた一回交叉体変異株を TSB 培地で 2 日間培養を行った後に、前培養液を SK-II 培地 (+1% Gly) に 1% 植菌し、30°C で 2 日間本培養した後、プロトプラスト化し、適宜希釈して TSB 培地で培養することでシングルコロニーを取得した。シングルコロニーを 25 µg/mL Apramycin を含む TSB 寒天培地へと植え継ぎ、apr 感受性となった株を CL190 $\Delta nphG$ として選抜した。表 4-3 に示したプライマーを用いて PCR を行うことで標的配列の欠失を確認した。その結果、CL190 野生株では 930 bp の、CL190 $\Delta nphG$ では 333 bp 欠落した 597 bp の増幅が確認できたことから、二回交叉株の取得に成功した (図 4-12)。

表 4-3 *nphG* の破壊と確認に用いたプライマー

dnphG_UP_f	AACGCTCGGTTGCCGCGGGCGTTTTTTATCTAGAGAGAACGGTGCCGACACGGCCACTGAG
dnphG_UP_r	CCGCCGACACCCGTGACGACCCAGGCCGGATTGGAGTTGATCGCC
dnphG_DOWN_f	CCAATCCGGCCTGGGTCGTACGGGTGTCGGCGGCAGCCTC
dnphG_DOWN_r	GCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTCTAGAAGCAGCCGCCACTGGGGCAGCAGAC
dnphG_check_f	CGGCACCATCCACTCCCTGGCGCTG
dnphG_check_r	CAGCACGATCGGCGTCGACGGGTTTAC

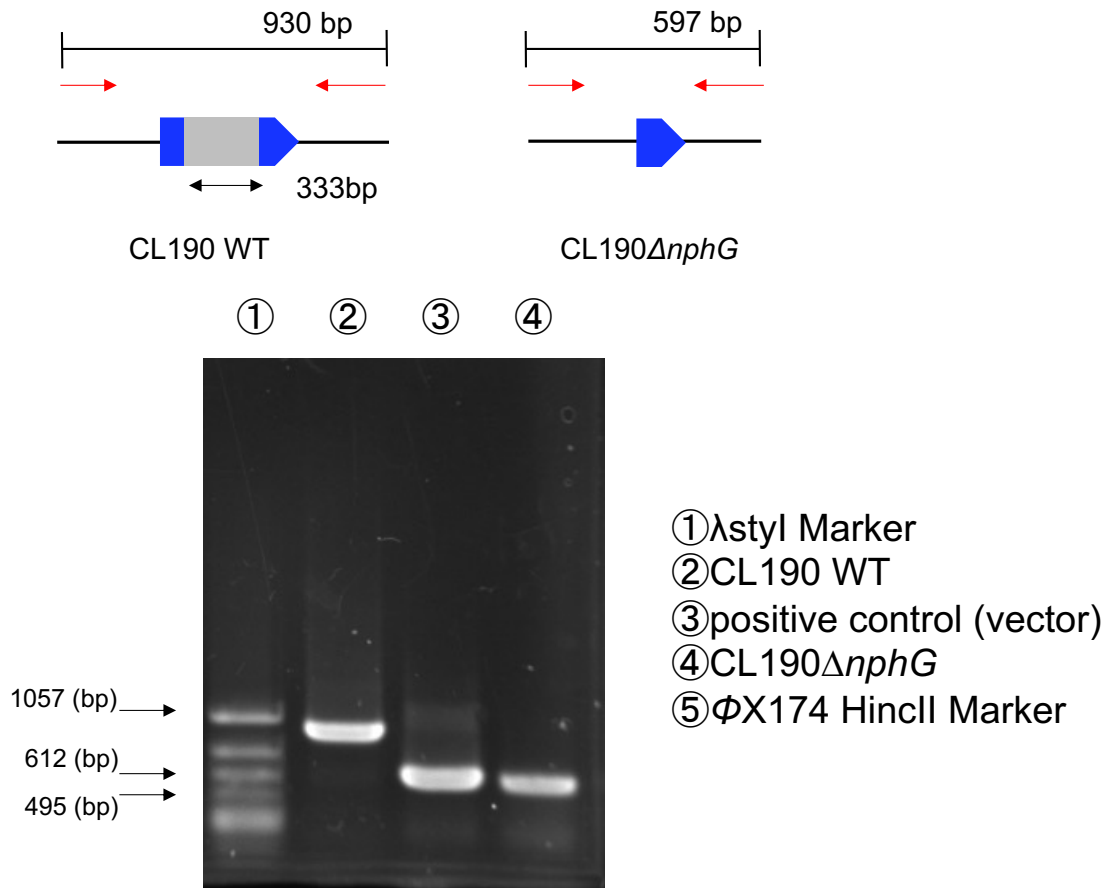


図 4-1 2 *nphG* の破壊の確認

nphG 破壊株特異的に増幅されるバンドを電気泳動によって確認した。予想通り、野生株では約 0.9 kb の DNA が増幅し、*nphG* 破壊株では約 0.6 kb の DNA が増幅した。

第6項 *nphG* 破壊株の培養液の生産物分析

前項で得られた CL190 $\Delta nphG$ が生合成中間体を蓄積する可能性が考えられたため、培養液の分析を行うことにした。CL190 $\Delta nphG$ を TSB 培地で 30°C, 2 日間前培養した。前培養液を KG 培地 (+25 $\mu\text{g/mL}$ apr) に 2% 植菌し、27°C, 180rpm で日間培養した。培養液 500 μL を当量の酢酸エチルで抽出し、エバポレーターで乾固させ、200 μL の MeOH で再溶解させた遠心上清を LC-MS/MS 解析に供した。その結果、*nphG* の破壊は Naphterpin の生産には影響を与えず、*nphG* は Naphterpin 生産に関与しない、もしくは他の遺伝子によって機能が相補されている可能性が考えられた。

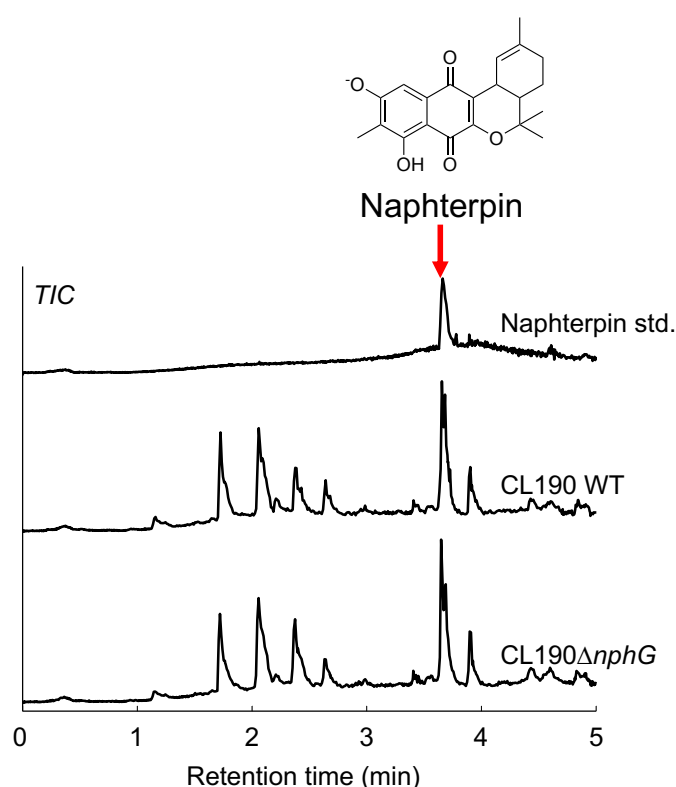


図 4-13 *nphG* 破壊株の培養液の LC-MS 分析 (TIC)

一番下のクロマトグラムが CL190 $\Delta nphG$ のクロマトグラムであり、Naphterpin を生産していることが確認できた。

第2節 Naphterpin の6位のメチル化機構の解析

8-AF から Naphterpin に至る経路においては6位の炭素のメチル化が起こる (図 4-14)。Furaquinocin 生合成においては、C-メチル基転移酵素 Fur6 が3位のメチル化を担う。Naphterpin 生合成クラスター中には Fur6 のホモログである NphJ (identity 70%) が存在しており、NphJ が Naphterpin 生合成における6位のメチル化を担っているのではないかと考えた。そこで NphJ の機能解析を行うことを目指した。

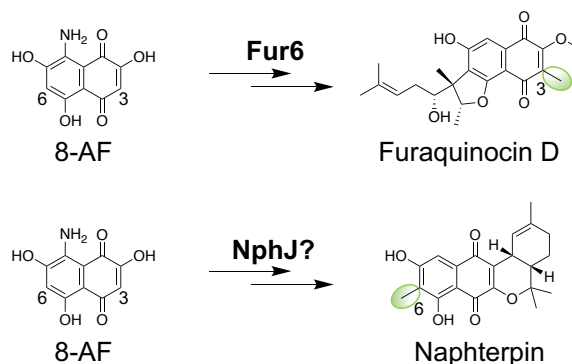


図 4-14 メロテルペノイド生合成におけるメチル化

第1項 *nphJ* 破壊株の作製

Naphterpin 生合成における6位のメチル化に関与すると推定された *nphJ* の二回交叉法 (図 4-9) による破壊を目指した。まず *nphJ* の中央部 777 bp を除去する配列とし、その上流と下流の約 2000 bp をそれぞれ Up 配列と Down 配列とした。これらの配列を増幅させるために、Up 配列上流側と Down 配列下流側に *Hind* III サイト、Up 配列下流側と Down 配列上流側に *Xba* I サイトを付加したプライマーを設計した (表 4-4)。これらのプライマーを用いて CL190 株のゲノム DNA を鋳型とした PCR を行い、Up 配列と Down 配列の目的断片の増幅を行った。*Hind* III, *Xba* I で消化した Up 配列と Down 配列それぞれの増幅断片を、*Hind* III で消化と BAPC75 で脱リン酸化した pUC118apr にクローニングし、破壊用ベクターとした。これをプロトプラスト-PEG 法を用いて CL190 株に導入した。得られた一回交叉体変異株を TSB 培地で2日間培養を行った後に、前培養液を SK-II 培地 (+1% Gly) に1%植菌し、30°C で2日間本培養した後、プロトプラスト化し、適宜希釈して TSB 培地で培養することでシングルコロニーを取得した。シングルコロニーを 25 µg/mL Apramycin を含む TSB 寒天培地へと植え継ぎ、apr 感受性となった株を CL190 Δ *nphJ* として選抜した。表 4-2 に示したプライマーを用いて PCR を行うことで標的配列の欠失を確認した。その結果、CL190 野生株では 1403 bp の、CL190 Δ *nphJ* では 777 bp 欠落した 626 bp の増幅が確認できたことから、二回交叉株の取得に成功した (図 4-15)。

表 4-4 *nphJ* の破壊と確認に用いたプライマー

dnphJ_UP_f	AACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTATCTAGAGGAGCAGCTCACCCCGACGTCCG
dnphJ_UP_r	GTGACCTTGAACCCGCCAGCAGGAGCAGCAGCTGCTCCACGG
dnphJ_DOWN_f	AGCTGCTGCTCCTGCTGGCCGGGTTCAAGGTCACCAACGCGGTC
dnphJ_DOWN_r	GCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTCTAGACTCCAGGACGGTTCGTCGGCCAGC
dnphJ_check_f	CCGTCTCGCCGCTCCCCGCTTTCTC
dnphJ_check_r	GGGCCGTCACATCACGCTGGGTGGAG

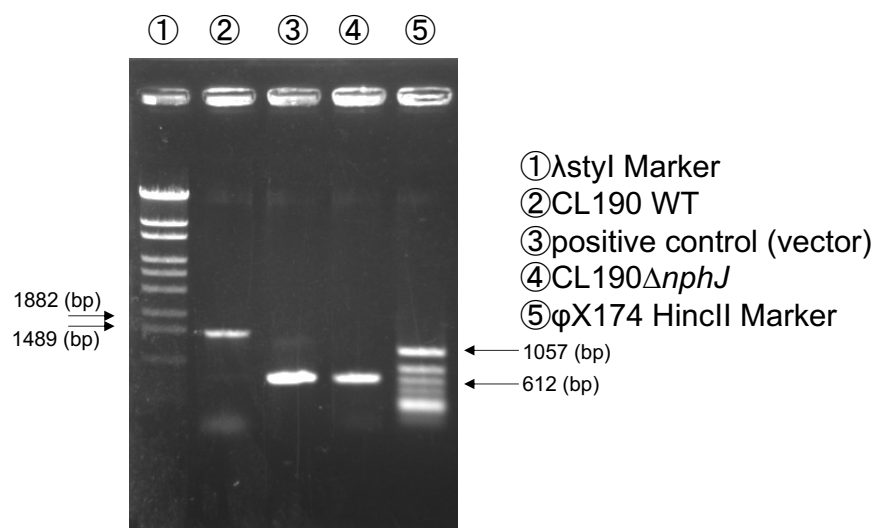
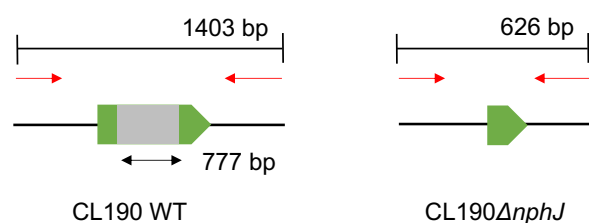


図 4-15 *nphJ* の破壊の確認

nphJ 破壊株特異的に増幅されるバンドを電気泳動によって確認した。予想通り、野生株では約 1.4 kb の DNA が増幅し、*nphJ* 破壊株では約 0.6 kb の DNA が増幅した。

第2項 *nphJ* の破壊株の培養液の生産物分析

前項で得られた CL190 $\Delta nphJ$ が生合成中間体を蓄積する可能性が考えられたため、培養液の分析を行うことにした。CL190 $\Delta nphJ$ を TSB 培地で 30°C, 2 日間前培養した。前培養液を A1 培地 (+25 $\mu\text{g/mL}$ apr) に 2% 植菌し、27°C, 180rpm で日間培養した。培養液 500 μL を当量の酢酸エチルで抽出し、エバポレーターで乾固させ、200 μL の MeOH で再溶解させた遠心上清を LC-MS/MS 解析に供した。その結果、*nphJ* 破壊株においては Naphterpin (m/z 353.1) の生産が消失しており、代わりに m/z 339.1 の化合物が蓄積していた (図 4-1 6)。MS/MS フラグメントのパターンからこの化合物は Naphterpin の 6 位のメチル基が存在しない Demethylnaphterpin であると考えられた (図 4-1 7)。

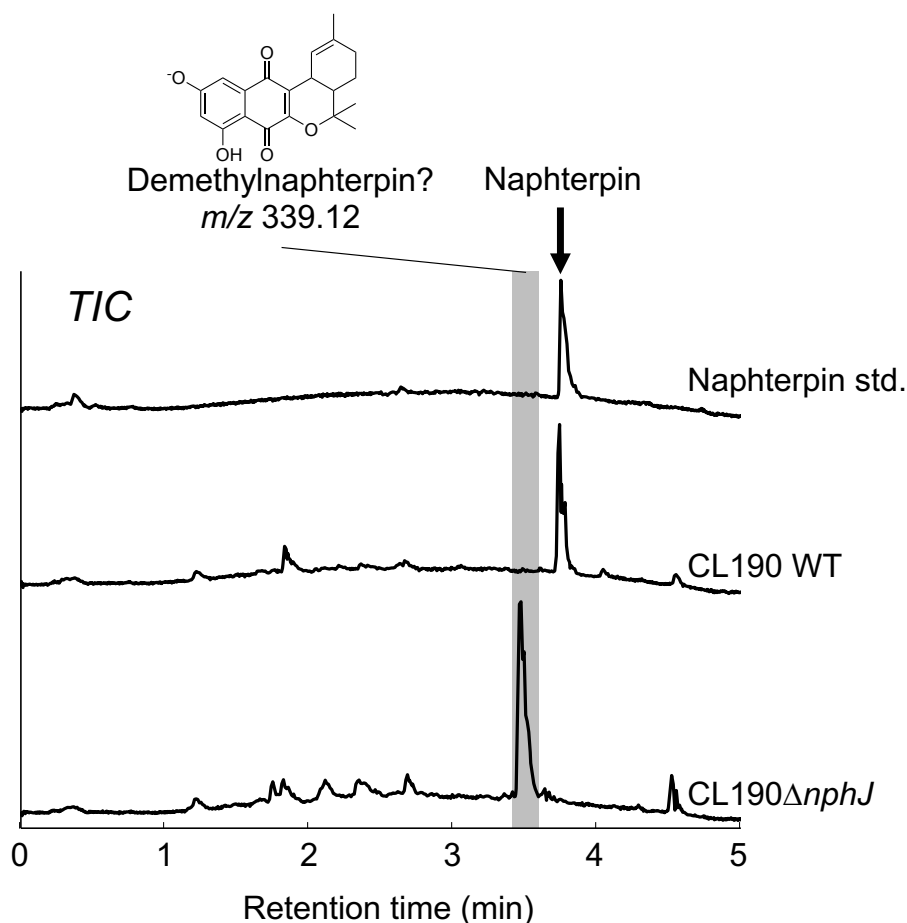
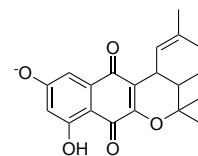
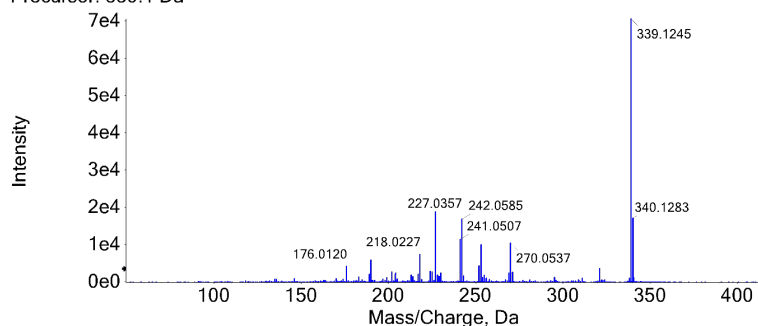


図 4-1 6 *nphJ* 破壊株の LC-MS 分析 (TIC)

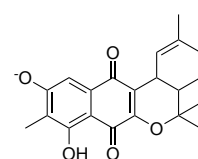
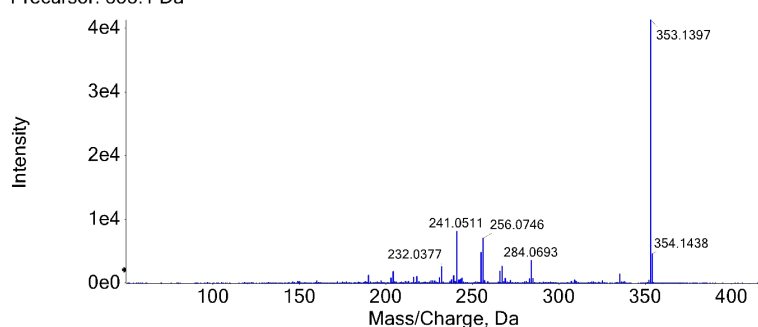
一番下のクロマトグラムが CL190 $\Delta nphJ$ のクロマトグラムである。Naphterpin の生産が消失し、CL190 $\Delta nphJ$ 特異的に Demethylnaphterpin と考えられる化合物が蓄積していた。

Spectrum from A1 CL190dnphJ2 3days.wif..., -TOF MS² (50 - 1000) from 3.401 min
Precursor: 339.1 Da



Demethylnaphterpin?
m/z 339.12

Spectrum from naphterpin.wiff (sample 1)... 2, -TOF MS² (50 - 1000) from 3.654 min
Precursor: 353.1 Da



Naphterpin
m/z 353.14

図 4-17 **nphJ** 破壊株蓄積物の MS/MS フラグメント解析

Demethylnaphterpin は Naphterpin と似た MS/MS フラグメントパターンを示し、それぞれのフラグメントはメチル基の有無の分 (14 kDa)ずれていた。

第3項 *nphJ*破壊株培養液抽出物と NphJ による in vitro 反応

前項で CL190 $\Delta nphJ$ が Naphterpin の 6 位のメチル基が欠失した Demethylnaphterpin を生産することから、*nphJ* が Naphterpin の 6 位のメチル化に関与していることが強く示唆された。Demethylnaphterpin が NphJ の基質となり得るか明らかにするため、CL190 $\Delta nphJ$ 抽出物に対して NphJ が作用し得るか検証した。前項と同様に培養した培養液の酢酸エチル抽出物を 200 μ L の DMSO に溶解させ、CL190 $\Delta nphJ$ 抽出液とした。NphJ は修士課程の研究において pHis8 にクローニングした発現系を作製しており、N 末端 His タグ付き組み換え酵素として発現させることに成功していたのでこれを用いた。Furaquinocin 生合成における Fur6 反応と同様にキノン部分がヒドロキノンに還元された状態で作用する可能性も考えられたため、Dithionite を添加した系でも反応をおこなった。なお NphJ の補因子として SAM も加えた。反応液と当量のメタノールでクエンチした遠心上清を吸光と MS データを同時に取得可能な PDa-QDa 解析に供した。

その結果、Demethylnaphterpin は Dithionite 添加非添加両条件において NphJ によってメチル化されて Naphterpin へと変換されることはなかった (図 4-18)。このことから NphJ は Demethylnaphterpin やその還元体を基質にすることはないと考えられる。NphJ は Demethylnaphterpin よりも前の生合成段階において 6 位のメチル化を担っており、生合成酵素の基質認識のゆるさなどから、NphJ が存在しなくても Demethylnaphterpin までの変換が達成されてしまったと考えられる。

表 4-5 NphJ の反応系

Reaction Mixture	
100 mM	HEPES-NaOH pH 7.5
1 μ L	CL190 $\Delta nphJ$ extract
1 mM	SAM
(5 mM	Dithionite)
(2 μ M	NphJ)
Total 100 μ L	30°C 1 h

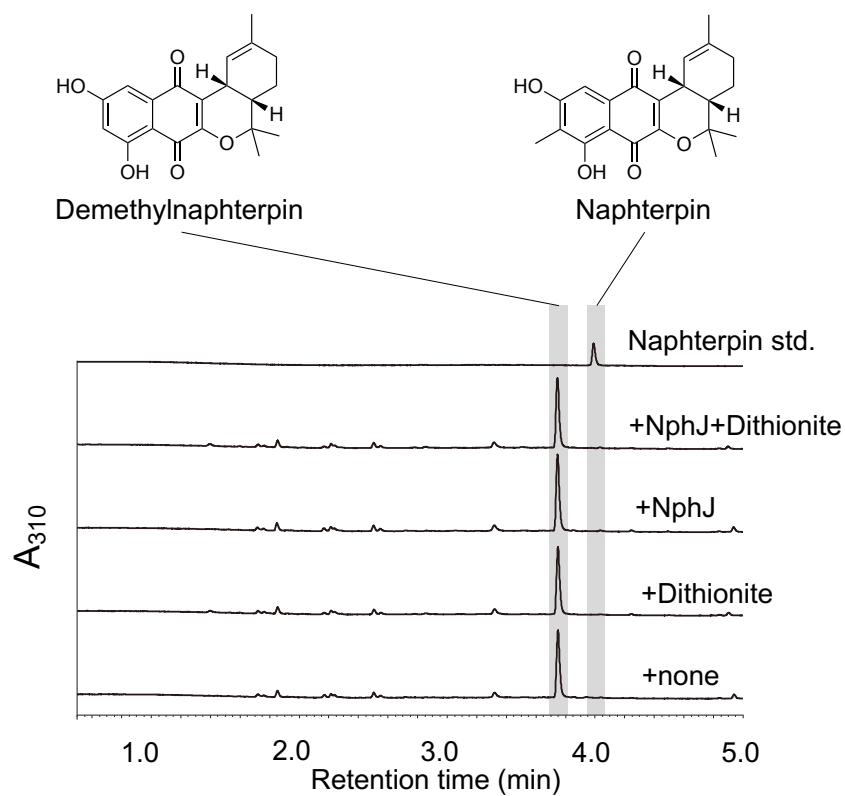


図 4-18 CL190 Δ nphJ 培養抽出物に対する NphJ 反応のクロマトグラム (310 nm の吸収波長)

表 4-5 の反応系にてカッコで括ってある反応要素のうち加えたものを各クロマトグラムの右上に示している (例: +NphJ+Dithionite では NphJ と Dithionite を加えている)

第3節 Naphterpin 生合成の生理的意義

第1項 電子メディエーターとしての Naphterpin

第2章で明らかにした様に Furaquinocin は還元的に生合成され、電子メディエーターとして機能する(図 2-40)。本章では Naphterpin 生合成の詳細を明らかにすることはできなかったが、Naphterpin も Furaquinocin と同様に電子メディエーターとしての機能を有するのではないかと考えた。

第2章第8節と同様に Alcohol dehydrogenase と呼吸鎖タンパク質の Cytochrome *c* を用いた *in vitro* 反応系において、Cytochrome *c* の還元による 550 nm の吸光の上昇を測定した。Naphterpin の存在によって 550 nm の吸光の上昇速度が増加するか調べるため、分光光度計を用いて反応を追跡した。反応は表 4-6 の条件で行った。その結果、Naphterpin 添加条件において非添加条件と比べて顕著な 550 nm の増大が確認できた。このことから Furaquinocin だけでなく Naphterpin も呼吸鎖において電子メディエーターとして機能しうることが明らかとなった(図 4-19)。

表 4-6 Naphterpin を電子メディエーターとして用いた Cytochrome *c* の還元系

Reaction Mixture	
50 mM	Phosphate buffer pH 8.8
100 μM	Cytochrome <i>c</i>
29.6 U (0.1 mg/mL)	Alcohol dehydrogenase
1%(v/v)	Ethanol
500 μM	Naphterpin
Total 500 μL	25°C 15 min

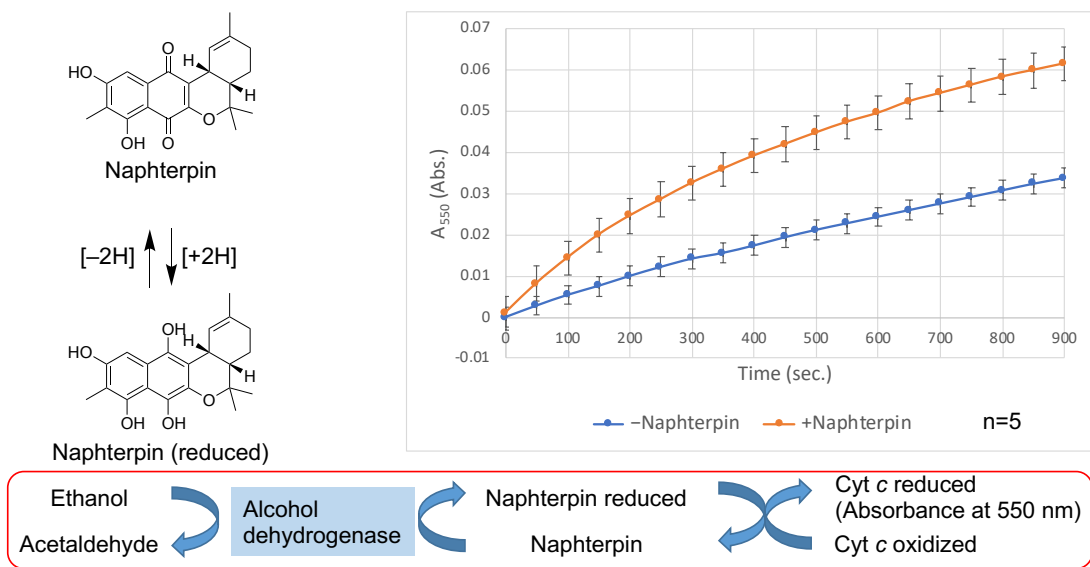


図 4-19 電子メディエーターとして機能する Naphterpin

Naphterpin 非添加条件 (青色のグラフ)と比べて Naphterpin 添加条件 (橙色のグラフ)では顕著な Cyt c の還元速度の上昇が確認できる。

第2項 Naphterpin の細胞内局在

前項では還元型 Naphterpin が細胞膜に局在するタンパク質である Cytochrome *c* を効率的に還元する電子メディエーターとして働き得ることを示した。しかし、Naphterpin の細胞内濃度および細胞外濃度との比較についての知見はこれまでになかった。そこで CL190 株を培養、遠心し、その培養上清画分と菌体画分それぞれの Naphterpin 濃度を概算することにした。CL190 株を TSB 培地にて 2 日間前培養し、KG 培地に 2% 植菌し、2 日間本培養した。培養液上清は当量のメタノールと混合し、遠心上清を分析に用いた。菌体画分はメタノールで上清画分と当量になる様に希釈した。分析は吸光と MS データを同時に取得可能な PDa-QDa を用いておこなった。

まず 5, 10, 50, 100, 250 μM の Naphterpin 標品および対応する 310 nm における吸光度を用いて検量線を作成した (図 4-2 0)。310 nm における上清画分と菌体画分のクロマトグラムは図 4-2 1 の様になり、Naphterpin はほとんど菌体内に存在していることが明らかとなった。菌体画分には培地由来の固形成分も含まれているため、正確な細胞内濃度は算出できなかったが、菌体画分の体積は少なくとも培養液の 1/10 以下であったため 1/10 量として計算すると、Naphterpin の濃度は表 4-7 の様になり、約 400 μM 以上の濃度で Naphterpin が細胞内に存在しており、さらにその疎水性から膜付近に局在していると考えられた。

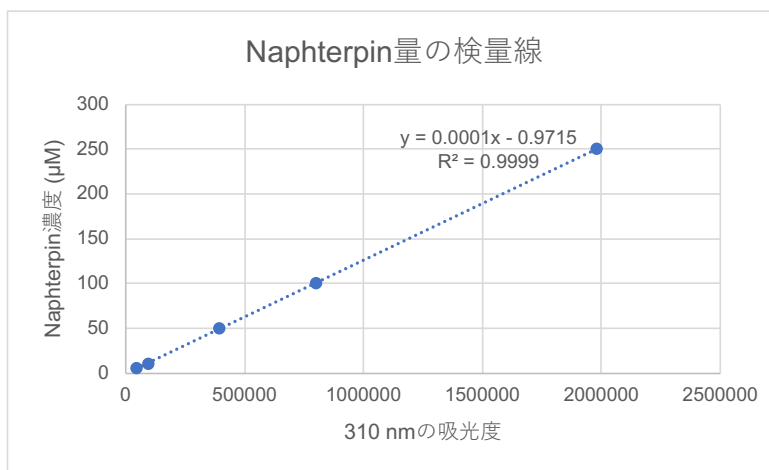


図 4-2 0 Naphterpin 濃度の検量線

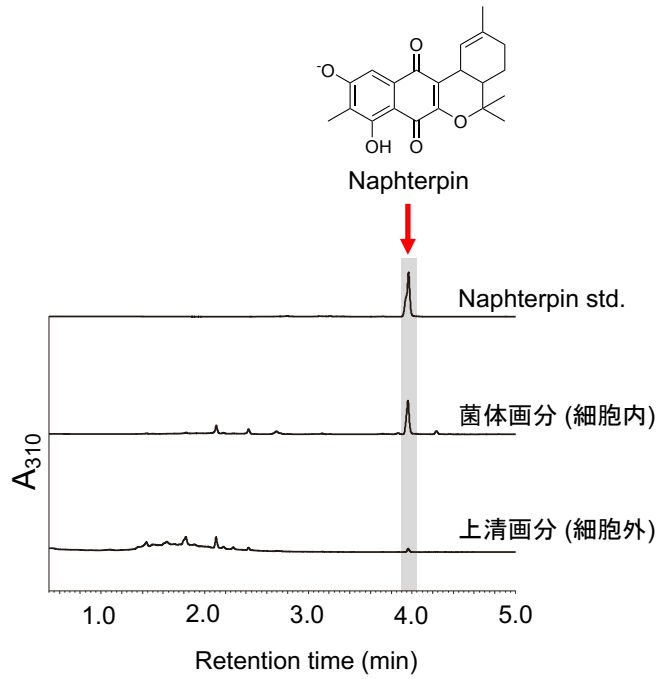


図 4-2 1 CL190 株培養液の細胞内外での Naphterpin 量の比較のクロマトグラム (310 nm の吸収波長)

表 4-7 細胞内外の Naphterpin 濃度

Naphterpin 濃度 (μM), n=4	
細胞内	細胞外
429 \pm 58	< 5

第4節 考察

本章では Naphterpin 生合成に関する研究をおこなった。他の Class II メロテルペノイドと同様に Naphterpin 生合成においても電子密度の高い 3 位の炭素がまずプレニル化された後に、第 1 節で予想したエポキシ化と還元によるプレニル基の 3 位から 2 位への転位反応が起こると考えられる (図 4-2 2)。

しかし、このエポキシ化や還元に関与すると予想された *nphO* や *nphG* の破壊によっては Naphterpin の生産は消失せず、ゲノム中の他の酵素によって相補されている可能性や、実際に *nphO* や *nphG* が Naphterpin 生合成に関与しない可能性が示唆された。今後 NphO や NphG の *in vitro* 反応解析やクラスター外の解析によってこれらが明らかになっていくと期待される。

一方で 6 位のメチル化に関与すると推定された C-メチル基転移酵素 *nphJ* の破壊では、CL190Δ*nphJ* 特異的な Demethylnaphterpin の蓄積が確認でき、実際に *nphJ* が 6 位のメチル化に関与していることが確かめられた。第 2 章で明らかにしたように Furaquinocin 生合成においては C-メチル基転移酵素 Fur6 (NphJ との Identity 70%) が PHN の 3 位をメチル化することから、相同性が高い二つの酵素がどのようにメチル化の位置を制御しているのか興味を持たれる。NphJ の AlphaFold v2.0 による予測構造と Fur6 の結晶構造との活性中心の比較をおこなった。その結果、第 2 章第 4 節で明らかにした Fur6 の基質認識に関わる残基は概ね保存されていたものの、PHN の 1 位と 2 位のヒドロキシ基の認識に関与する Asp253 が、NphJ においては Pro231 へと置換されていた。一方で NphJ 特異的に存在する Glu327 の存在も明らかとなり、Fur6 の基質 PHN の 4a 位と 8a 位の炭素を通る軸を中心に基質が 180 度回転した状態で認識されている可能性が示唆された (図 4-2 3、図 4-2 4)。NphJ の作用するタイミングについては今のところ明らかにできなかったものの、比較的 Naphterpin 生合成の早期段階で作用するのではないかと予測される。

これまで 8-AF の他に BE69785 のみが生合成中間体として検出されてきた。しかし Furaquinocin が還元的に生合成されること、および第 3 節で示した様び Naphterpin も還元型となることで電子メディエーターとして働きうることを考えると、Naphterpin も還元的脱アミノ化によってキノンがヒドロキノンへと変換された後プレニル化などの変換反応が起こると考えられる。

nphF の破壊は当研究室の織田によって行われており、破壊株特異的な代謝物は生産しないものの、Naphterpin の生産は消失することから、Naphterpin の生合成に関与していると考えられる (織田浩嗣修士論文, 2004)。NphF は Furaquinocin 生合成の 2 位のヒドロキシ基の O-メチル基転移酵素 Fur4 と相同性を示す (Identity 75%)。そのため、Naphterpin 生合成においても 2 位のヒドロキシ基をメチル化してメタノールとして脱離しやすくする役割を担っているのではないかと予想される (図 4-2 2)。エポキシ化や環化を担う酵素は今回遺伝子破壊実験によっては明らかにすることができなかったが、NphO や NphG もしくは他の候補遺伝子産物の *in vitro* での反応を解析することで反応検出ができるのではないかと期待され

る。

第3節では Furaquinocin と同様に Naphterpin も電子メディエーターとして働き得ること、そして細胞内に Naphterpin は局在していることを明らかにした。疎水性の高いプレニル基部分を有することから、Naphterpin は細胞内で細胞膜付近に局在し、呼吸鎖タンパク質の酸化還元に関与していると推察される。

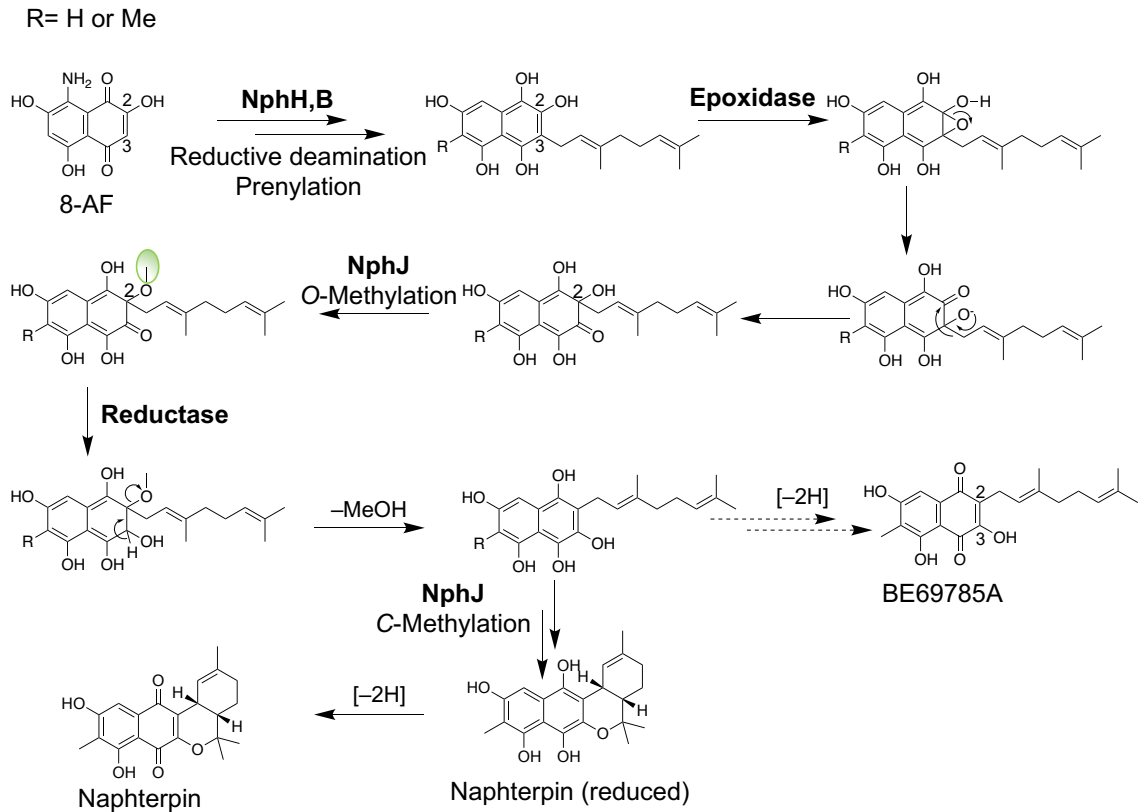


図 4-2 2 Naphterpin の推定生合成経路

エポキシ化と還元を介したプレニル基転位が起これると予想される。その際にヒドロキシ基は *O*-メチル基転移酵素 NphF によってより優秀な脱離基であるメトキシ基へと変換されると考えられる。なお生合成の途中の段階で *C*-メチル基転移酵素 NphJ は 6 位のメチル化を担う。

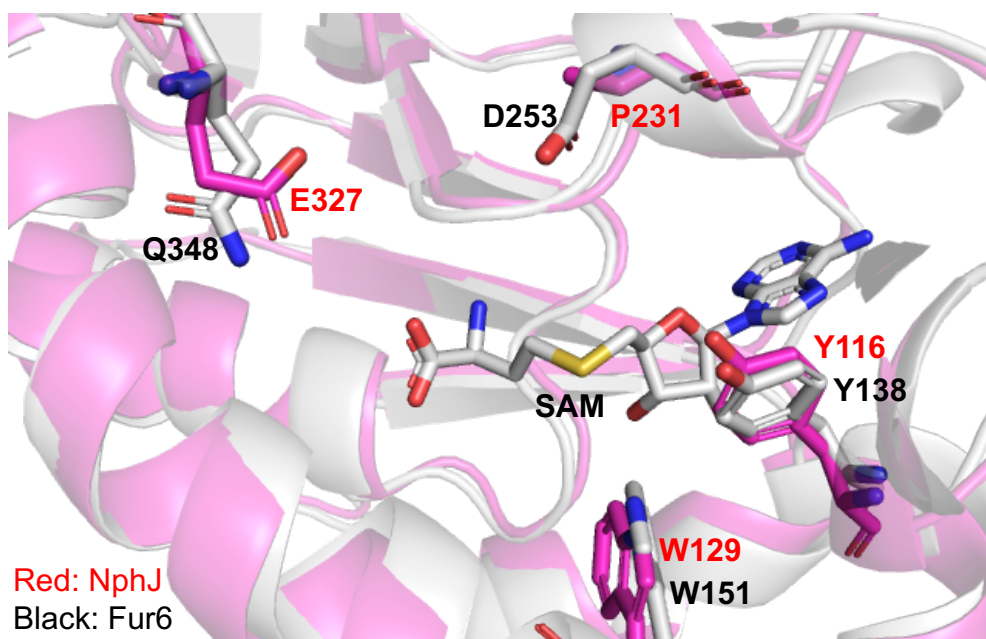


図 4-2 3 AlphaFold v2.0 による NphJ の予測活性中心と Fur6 との比較

両者の相同性は高いため、全体構造は概ね重なっているものの、基質認識に関与すると考えた酸性残基に相違が観測された (Fur6 における D253、NphJ における E327)。

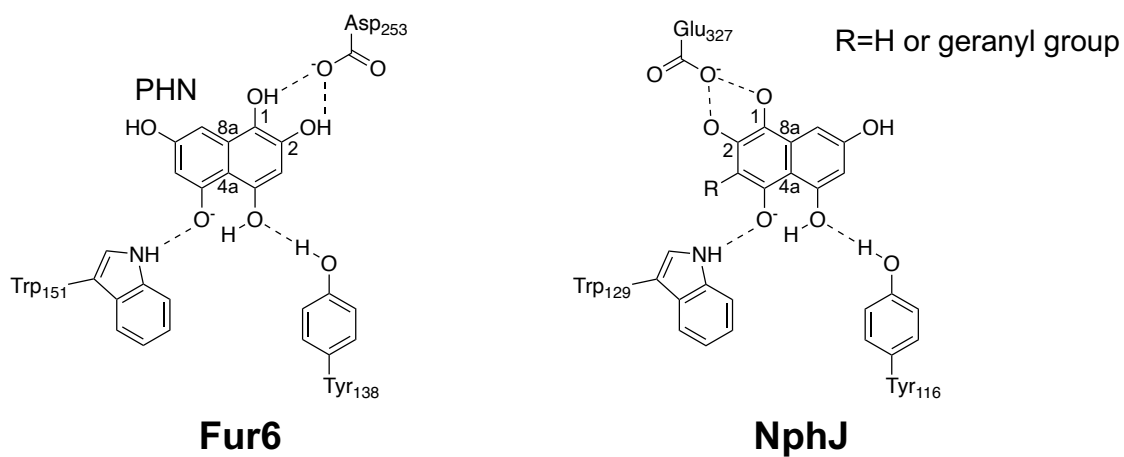


図 4-2 4 NphJ の予測基質認識機構

Fur6 においては Asp253 が 1 位のヒドロキシ基を認識することで 3 位がメチル化され得る配向になっており、NphJ においては Glu327 が 1 位のヒドロキシ基を認識することで 6 位がメチル化され得る配向になっていると推測される。

第5章 総括

本論文では Furaquinocin と Naphterpin 生合成研究を通じてこれらメロテルペノイドの生合成機構の普遍性および多様化機構の一端を解明するとともに、還元的に生合成されたメロテルペノイドの生理的意義についても明らかにした。

第一章では酸素による酸化とアミノ基転移の両方を触媒する酸化的アミノ基転移酵素 NphE の反応機構の解析を *in vitro* および *in silico* 両面から解析を行った。二次代謝の生合成において近年酸素を用いる PLP 依存性酵素が見つかってきてはいるが、PLP 依存性酵素の酸素との反応性についてはそれ以前から知られており、その多くは副反応 (Side reaction) として検出されてきた²⁰。例えば DOPA decarboxylase に代表される PLP 依存性デカルボキシラーゼにおいては、正反応である脱炭酸反応ではなく、酸素との副反応によって酸化的脱アミノ化 (Oxidative deamination) が起こることが知られている (図 5-1)。また、PLP 依存性酵素に限らず、アニオン性の中間体を經由する酵素もしばしば酸素との副反応 (Side reaction) を起こす³¹。例えば Fructose-bisphosphate aldolase は Class II のアルドラーゼであるが、酸素との副反応も起こす (図 5-2)¹¹⁵。これは反応中間体としてカルバニオン中間体 (Carbanionic intermediate) を生成するためであると考えられており、種々の酸化剤も還元しうることが知られている¹¹⁶。以上を考慮すると、PLP 依存性酵素はアニオン性のキノノイド中間体をその反応過程で生じるため、本質的に酸素との反応性を有しており、多様な PLP 依存性酵素のファミリーにおいて収斂的に酸素との反応性を獲得し得る。PLP 依存性アミノ基転移酵素の系統樹の中でも NphE は DegT/DnrJ/EryC1/StrS アミノ基転移酵素ファミリーと近縁であるが (図 1-25)、このファミリーの中には酸素と反応する酵素は含まれていない。DegT/DnrJ/EryC1/StrS アミノ基転移酵素ファミリーは、 α -ケト酸をアミノ基受容体とする一般的なアミノ基転移酵素と異なり、より嵩高い糖誘導体など 6 員環上のケトンを実アミノ基受容体として用いる酵素が多い。NphE においても α -ケト酸よりも嵩高いナフトキノン骨格を有する Mompain をアミノ基受容体として用いており、DegT/DnrJ/EryC1/StrS アミノ基転移酵素ファミリーの様な嵩高いアミノ基受容体を用いる酵素群から進化し、新たに酸素との反応性を獲得したと考えるのは妥当であると考えられる。一方でこれらのファミリーと NphE の酸素への反応性の違いを生み出しているのは構造的特徴であると考えられ、NphE の様にアニオン性の炭素まで通じる酸素の通り道の存在が、酸素を用いる二機能性の PLP 依存性酵素にとって重要なのではないかと推察される。

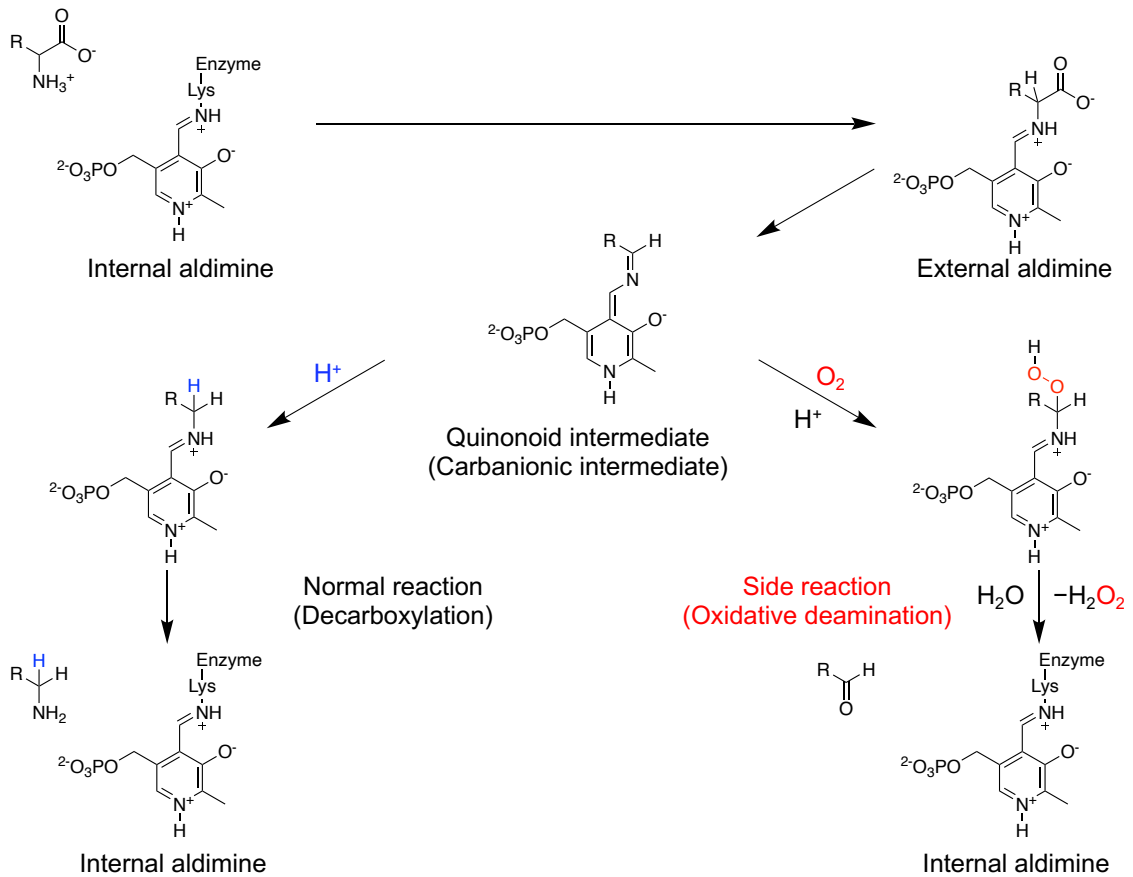


図 5-1 PLP 依存性デカルボキシラーゼと酸素との副反応

正反応 (Normal reaction)である脱炭酸反応 (左)と酸素との副反応 (右)

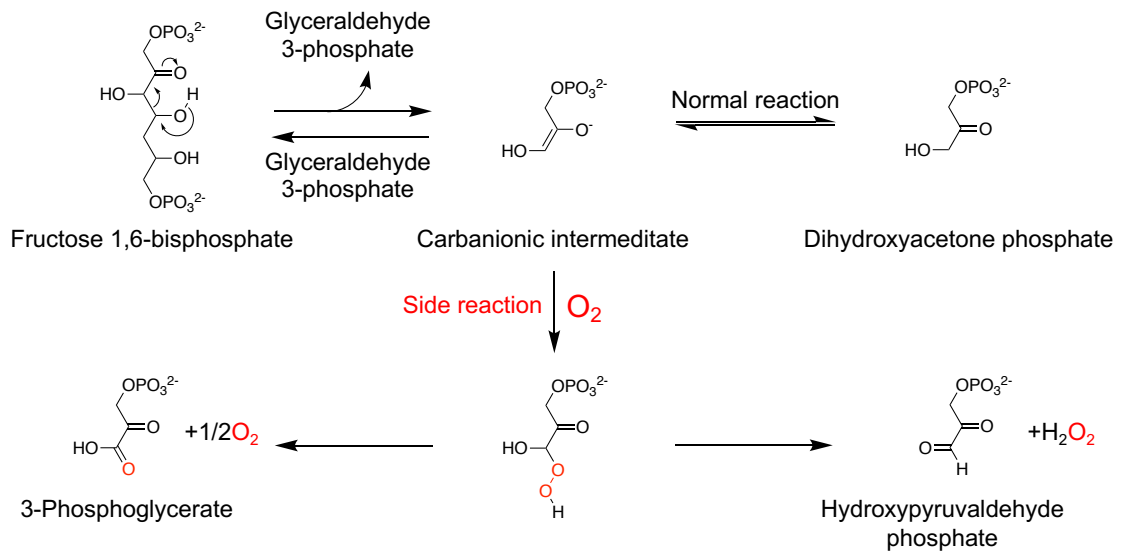


図 5-2 Class II アルドラーゼ (Fructose-bisphosphate aldolase)と酸素との副反応

正反応 (Normal reaction)であるレトアルドール反応 (上段)と酸素との副反応 (下段)

第二章では 8-AF の Fur5 によるジアゾ化を起点とした Furaquinocin の還元的生合成とその生理的意義を明らかにした。Fur5 によるジアゾ化と NADPH による非酵素的なヒドリド還元の結果、8-AF から PHN までの還元的脱アミノ化が達成される (図 5-3)。

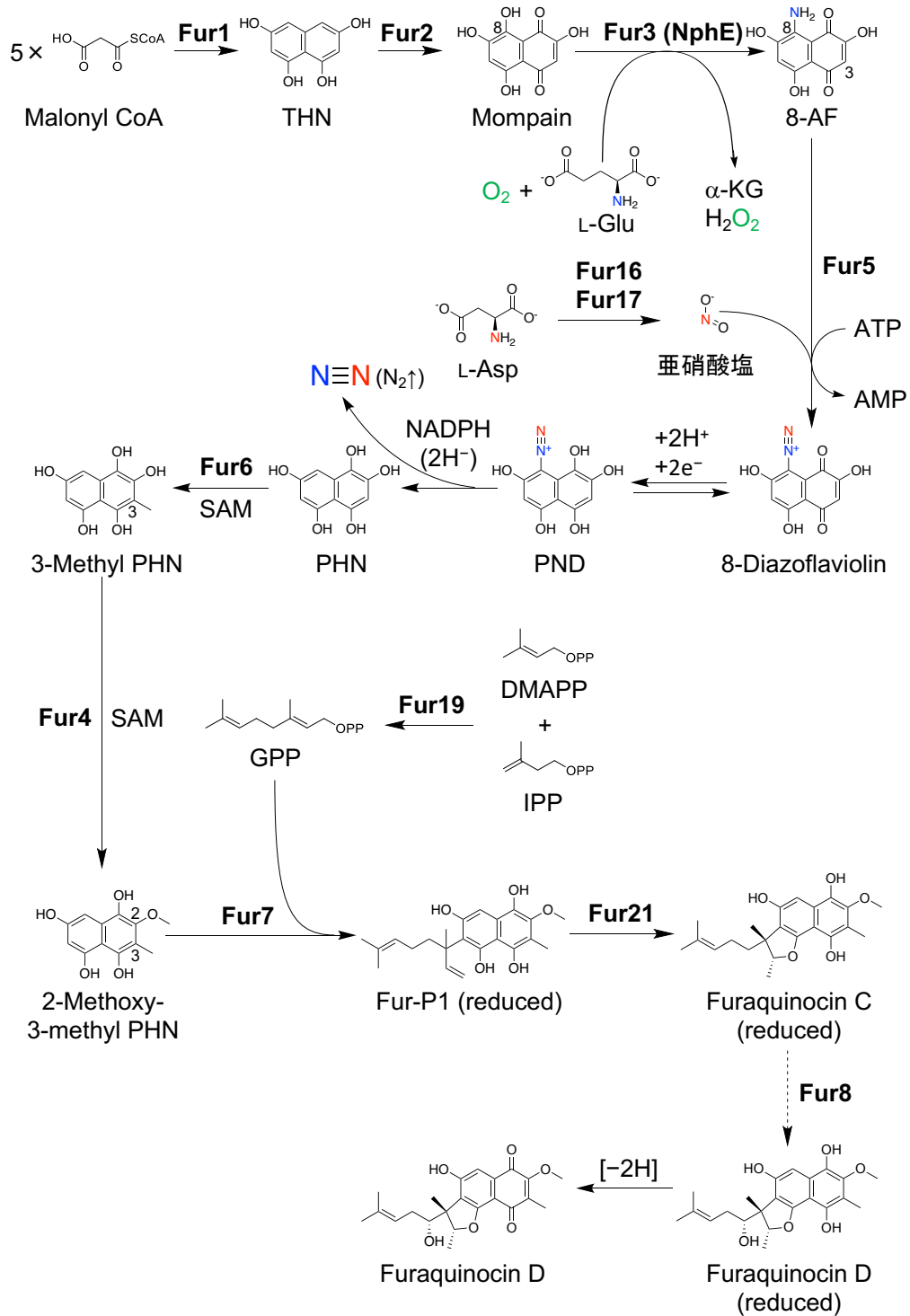


図 5-3 Furaquinocin の還元的生合成

この過程は Furaquinocin において 8-AF が Mompain から Fur3 (NphE ホモログ) によって生成することを考えると、Mompain から PHN への変換においては 8 位のヒドロキシ基が水素原子へと置換されると捉えることもできる。生体内での sp^3 炭素上のヒドロキシ基から水素原子への変換は、脱水とその結果生じる二重結合の還元によって達成できる。例えば二次胆汁酸 DCA の生合成においては BaiE による脱水と BaiH によるオレフィンの還元によってヒドロキシ基の除去が達成される¹¹⁷ (図 5-4)。一方で芳香族炭素上のフェノール性のヒドロキシ基の除去はより困難である。芳香族性のヒドロキシ基 (Ar-OH) の C-O 結合解離エンタルピーは 465 kJ/mol であり、メタンの C-H 結合解離エンタルピー (439 kJ/mol) よりも大きい¹¹⁸。そのため有機化学的には触媒存在下、高温条件で反応を行わなければならない¹¹⁸。1,8-DHN の生合成においては、BdsA による T₄HN や T₃HN の還元によって、それぞれ(R)-Scytalone と Vermelone が生じ、続く SnoaL2 様タンパク質 BdsB によって脱水が起こることによって Scytalone から T₃HN 及び Vermelone から 1,8-DHN への変換が達成されており、還元と脱水を利用することで芳香属性のヒドロキシ基の除去を行なっている¹¹⁹ (図 5-5)。今回のメロテルペノイド生合成においては、Mompain から 8-AF への変換の過程でナフトキノン環の反転が起きており、対称なヒドロキシナフトキノン環を利用することで見掛け上の 8 位のヒドロキシ基の水素原子への置換を可能にしている (図 5-6)。

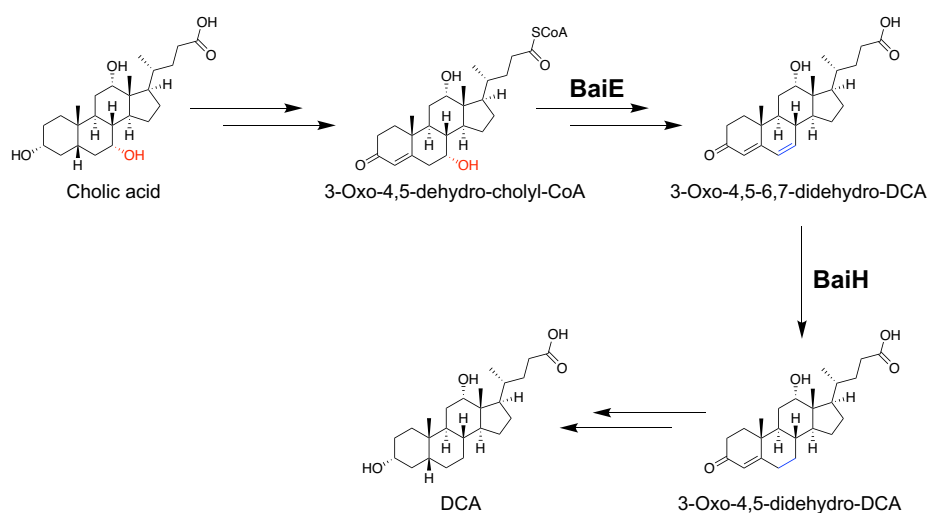


図 5-4 二次胆汁酸 DCA 生合成におけるヒドロキシ基の除去機構

BaiE による脱水と BaiH によるオレフィンの還元によって、ヒドロキシ基の水素原子への置換が起こる。

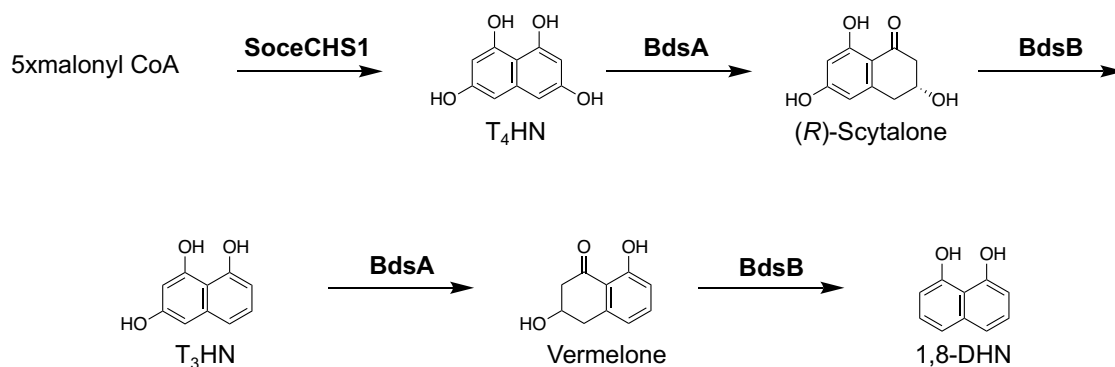


図 5-5 1,8-DHN におけるヒドロキシ基の除去機構

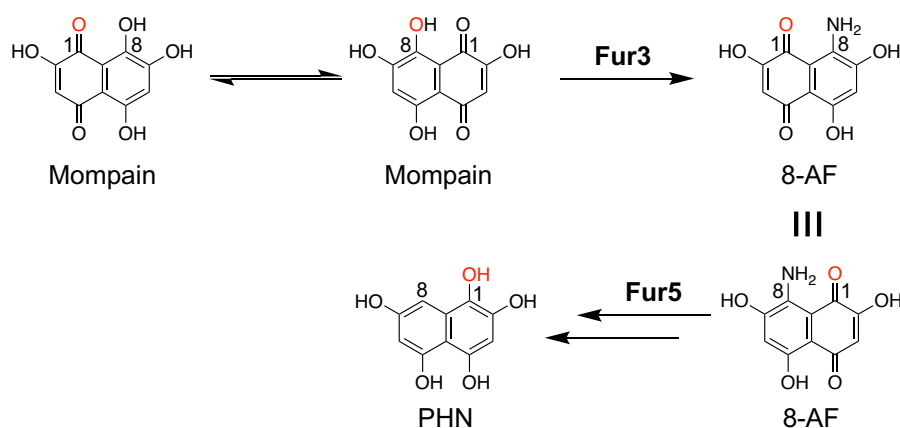


図 5-6 Mompain の対称性と環反転による見かけ上の 8 位のヒドロキシ基の除去

Mompain から 8-AF 生成の過程で環反転が起こるため、見かけ上 Mompain の 8 位のヒドロキシ基が除去される様式になっている。

還元的脱アミノ化の結果生じる PHN は THN と比べて 1 位のヒドロキシ基の存在のみが異なる。このヒドロキシ基の導入によって THN の分子構造の線対称性を崩し、生合成中間体の基質認識および位置選択的官能基導入を可能にしていると考えられる。実際に Furaquinocin 生合成の C-メチル基転移酵素 Fur6 の Asp253 による基質認識において重要であり、3 位の炭素へのメチル化を可能にしていた。さらに Naphterpin 生合成の C-メチル基転移酵素 NphJ の AlphaFold v2.0 による予測構造においては Glu327 が 1 位のヒドロキシ基を認識することで 6 位の炭素をメチル化することが予想された。今後は計算化学と生化学実験の結果を統合することでより生合成下流の酵素における基質認識や反応機構が明らかにでき、1 位のヒドロキシ基の重要性の理解もより深まるのではないかと期待される。

第三章では Fur5 ホモログの *Streptomyces antibioticus* B-546 の共脱窒現象における寄与を

検証した。今回用いた実験系では Fur5 ホモログが共脱窒に関与しているのかどうかは判別できなかったが、今後培養条件など検討することでより明確な結果が得られると期待される。

第四章では Naphterpin のヒドロキシ基やプレニル基の転位に関与する酵素は同定できなかったが、Naphterpin の 6 位のメチル化を担う C-メチル基転移酵素 NphJ を同定した。酸化のアミノ基転移や還元的脱アミノ化はメロテルペノイド共通の機構として存在するものの、メチル化やプレニル化修飾のタイミングは各メロテルペノイドにより異なっており、これが構造多様性を生み出す原動力となっていることが考えられる。また、基質特異性の寛容さによって二次代謝産物が進化していくという仮説も存在し¹²⁰、メロテルペノイド生合成酵素はメチル基転移酵素をはじめとして基質特異性が寛容な酵素が多いため、こうした特徴もメロテルペノイドの構造多様性の一端を担っていると考えられる。

また第二章で Furaquinocin が呼吸鎖において電子メディエーターとして機能することを示したように、第四章では Naphterpin も呼吸鎖において電子メディエーターとして機能することを示した。放線菌では複合体 III と複合体 IV をシャトルする可溶性の Cytochrome *c* が存在せず、膜にアンカーされる形で QcrC として存在し、Cytochrome *bc₁* complex (複合体 III または quinol: cytochrome *c* oxidoreductase) と cytochrome *c aa3* oxidase (放線菌において複合体 IV に相当)と共に超複合体を形成することで電子伝達を円滑に行っていると考えられている (図 5-7)¹²¹。放線菌においては Cytochrome *bc₁* complex はメナキノン (MK) を利用した Q サイクル下流へと電子伝達を行うと考えられているが、Naphterpin 生産株の CL190 株や Furanonaphthoquinone 生産株の *Streptomyces cinnamonensis* をはじめとしてメロテルペノイド生合成クラスターの近傍には Cytochrome *bc₁* complex の Cytochrome *b* サブユニットのコピーをコードする遺伝子が存在している場合があり (図 5-8)、Cytochrome *b* サブユニットがクラスター由来の Naphterpin などのメロテルペノイドを Q サイクルで利用しているのではないかと推察される。一方で放線菌は低酸素濃度条件やストレス条件で発現する Cytochrome *bd* oxidase なども有しており、これは還元型キノンであるキノール (QH₂, 通常はメナキノンやユビキノンを) を直接利用して酸素から水への還元を触媒する¹²² ので、こういった呼吸鎖タンパク質に二次代謝由来のナフトキノン骨格を有するメロテルペノイドが利用されている可能性も考えられる。

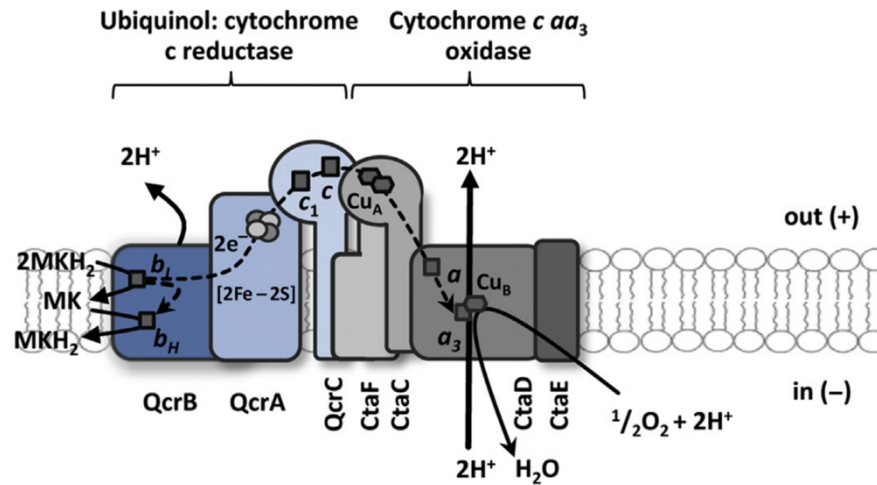


図 5-7 放線菌の呼吸鎖複合体 III および IV¹²¹

放線菌の呼吸鎖の末端の複合体。Ubiquinol: cytochrome *c* reductase と Cytochrome *c aa3* oxidase は直接相互作用して複合体になっていると考えられている。

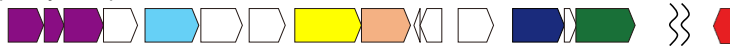
Streptomyces sp. CL190



Streptomyces tendae strain Tue1028



Streptomyces sp. Ru71



Streptomyces cinammonensis



Streptomyces sp. TLI_55

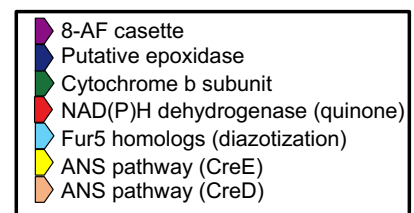


図 5-8 メロテルペノイド合成遺伝子と Cytochrome *b* サブユニットの保存性

緑色で示した Cytochrome *bc1* complex がメロテルペノイド合成遺伝子群 (8-AF の合成カセットや Fur5 ホモログ)の近傍に位置して保存されている。

本研究では放線菌のメロテルペノイド生合成研究を通じて、新規窒素代謝である酸化的アミノ基転移と還元的脱アミノ化の分子メカニズムを明らかにした。酸化的アミノ基転移と還元的脱アミノ化によって L-グルタミン酸由来のアミノ基と L-アスパラギン酸由来のアミノ基が、ジアゾ基形成を通じてハイブリッドな窒素ガスとして放出される共脱窒が起こる。この過程で L-グルタミン酸は NphE やそのホモログの作用で α -ケトグルタル酸に、L-アスパラギン酸は ANS 経路を通じてフマル酸へと変換される。 α -ケトグルタル酸、フマル酸ともに TCA 回路の中間体として知られている化合物である¹²³。そのため、メロテルペノイド生合成による共脱窒現象には、中央代謝系への炭素の供給という側面もあるのかもしれない。Glutamate dehydrogenase (GDH)も窒素代謝系と中央代謝系をつなぐ重要な酵素として知られているが、GDH の反応は可逆反応であり、ATP, GTP, ADP, L-ロイシンなど小分子の存在によって活性が調節される¹²⁴。一方、NphE ホモログによる酸化的アミノ基転移および ANS 経路は不可逆反応であるため、L-グルタミン酸から α -ケトグルタル酸への変換と L-アスパラギン酸からフマル酸への変換は不可逆であり、より迅速に中央代謝系中間体を供給し得る経路になっている。他にも培養によって蓄積したアンモニアをこの経路によって窒素ガスとして放出することで、pH の上昇を抑えている可能性も考えられる。以上のように二次代謝の結果として起こる脱窒現象は環境中においても窒素循環の一端を担っていると考えられ、生態系の窒素循環の新たな一ページを拓く研究になったのではないかと考えている。

実験項

培地組成

【放線菌用培地】

TSB 培地 (pH7.3)

Oxoid tryptone soya broth powder 30 g/L

J 培地

Oxoid tryptone soya broth powder 30 g

Sucrose 200 g

Yeast extract 10 g

MgSO₄·7H₂O 終濃度 5 mM でオートクレーブ後に添加

NMMP 培地

(NH₄)₂SO₄ 2 g

Casamino acid 5 g

MgSO₄·7H₂O 0.6 g

PEG6000 50 g

Trace element* 1 mL/800

mL

オートクレーブ後に以下を培地 80 mL に対し添加

0.1 M NaH₂PO₄/K₂HPO₄ buffer (pH6.8) 15 mL

20% Glucose 2.5 mL

*Trace element

ZnCl₂ 40 mg

FeCl₃·6H₂O 200 mg

CuCl₂·2H₂O 10 mg

MnCl₂·4H₂O 10 mg

NaB₄O₇·10H₂O 10 mg

(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 10 mg/L

YEME 培地

Bacto yeast extract 3 g

Polypeptone 5 g

Malt extract	3 g
Glucose	10 g
Sucrose	340 g/L
オートクレーブ後に以下を混合	
20% Glycine	50 mL
2.5 M MgCl ₂	2 mL
R2YE 培地	
Sucrose	103 g
Glucose	10 g
Bacto yeast extract	5 g
Casamino acid	0.1 g
K ₂ SO ₄	0.25 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10.12 g
Trace element*	2 mL
Agar	22 g/800 mL
オートクレーブ後に以下を混合	
5.73% TES buffer (pH7.2)	100 mL
3.68% CaCl ₂ ·2H ₂ O	80 mL
0.5% KH ₂ PO ₄	10 mL
20% L-proline	15 mL
*Trace element	
ZnCl ₂	40 mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	10 mg
NaB ₄ O ₇ ·10H ₂ O	10 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	10 mg/L
SKII 培地	
Soluble starch	20 g
Yeast extract	5 g
Polypeptone	3 g
Meat extract	3 g
KH ₂ PO ₄	200 mg

MgSO₄ · 7H₂O 60 mg/L
NaOH で pH7.6 に調整

KG 培地

Glucose 25 g
Soybean meal 15 g
Dry yeast 2 g
CaCO₃ 4 g/L
HCl で pH6.2 に調整

【大腸菌用培地】

LB 培地

Bacto tryptone 10 g
Bacto yeast extract 5 g
NaCl 5 g/L

LB 寒天培地

LB 培地
Bacto agar 15 g/L

TB 培地

Bacto tryptone 12 g
Bacto yeast extract 24 g
Glycerol 5.04 g/L

オートクレーブ後に以下を混合

KH₂PO₄ 2.31 g
K₂HPO₄ 12.54 g/L

試薬組成

Protoplast buffer (P buffer)

Sucrose	10.3 g
K ₂ SO ₄	0.025 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.202 g
Trace element*	0.2 mL/80 mL

オートクレーブ後に以下を混合

5.73% TES buffer (pH7.2)	10 mL
3.68% CaCl ₂ ·2H ₂ O	10 mL
0.5% KH ₂ PO ₄	1 mL

*Trace element

ZnCl ₂	40 mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	10 mg
NaB ₄ O ₇ ·10H ₂ O	10 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	10 mg/L

Wash buffer (Lysis buffer)

50 mM Tris-HCl pH8.0
0.5 M NaCl
20% (w/v) Glycerol
20 mM Imidazole pH8.0

Elution buffer

50 mM Tris-HCl pH8.0
0.5 M NaCl
20% (w/v) Glycerol
250 mM Imidazole pH8.0

TE buffer

100 mM Tris-HCl pH8.0
10 mM EDTA pH8.0

STE buffer

25 mM Tris-HCl pH8.0

25 mM EDTA pH8.0

0.3 M Sucrose

本研究で使用した機器

LC-MS/MS	AB SCEIX Triple TOF-MS5600
LC-MS/MS カラム	Shiseido CAPCELL PAK C18IF 2.0 × 50 mm
HPLC カラム	Senshu Pak Pegasil ODS 4.6 × 250 mm
	Senshu Pak Pegasil ODS 20 × 250 mm
	Shiseido CAPCELL PAK C18 MGII 4.6 × 250 mm
UPLC カラム	Shiseido CAPCELL PAK C18IFS2 2.0 × 50 mm
	ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 × 50 mm
NMR	JEOL Super conducting Magnet 600 MHz
	¹ H NMR, 600 MHz, ¹³ C NMR, 150 MHz
吸光度計	Shimazu UV-2500PC
GC-MS	Shimazu GCMS-QP2020
GC-MS カラム	RESTEK RT-Msieve 5A
MS (PDA-QDa)	ACQUITY QDa detector (Waters, Tokyo, Japan)
PDA (PDA-QDa)	Waters ACQUITY UPLC PDA eλ Detector
PDA (for HPLC)	JASCO MD-2010 plus (Jasco, Tokyo, Japan)

本研究で使用した大腸菌用ベクター

plasmid	Description	reference or source
pT7blue	<i>E. coli</i> cloning vector; Amp ^r ; pUCori	Novagen
pBluescript II KS (+)	<i>E. coli</i> cloning vector; Amp ^r ; pUCori	Agilent Technologies
pHis8	<i>E. coli</i> expression vector; Kan ^r ; pBR322ori	74
pET26b(+)	<i>E. coli</i> expression vector; Kan ^r ; pBR322ori	Novagen
pSE101	<i>Streptomyces-E. coli</i> shuttle vector; Thiostrepton ^r , Amp ^r	94

本研究で使用した大腸菌

E. coli BL21(DE3)

F⁻, *ompT*, *hsdS_B* (*r_B*⁻, *m_B*⁻), *dcm*, *gal*, λ (DE3)

E. coli DH5 α

deoR, *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17* (*r_k*⁻, *m_k*⁺), *phoA*, *recA1*, *relA1*, *supE44*, *thi-1*, ϕ 80*dlacZ* Δ M15, F⁻, Δ (*lacZYA-argF*)U169, λ ⁻

E. coli Rosetta-gami2(DE3)

Δ (*ara-leu*)7697 Δ *lacX74* Δ *phoA* *PvuII* *phoR* *araD139* *ahpC* *galE* *galK* *rpsL* (DE3)

F'[*lac*⁺ *lacI^f* *pro*] *gor522::Tn10* *trxB* pRARE2 (Cam^R, Str^R, Tet^R)

E. coli BW25141

Δ (*araD-araB*)567, Δ *lacZ4787* (::*rrnB-3*), Δ (*phoB-phoR*)580, λ ⁻, *galU95*, Δ *uidA3::pir*⁺, *recA1*, *endA9* (del-ins)::*FRT*, *rph-1*, Δ (*rhaD-rhaB*)568, *hsdR514*

【放線菌のプロトプラスト調製】

1. *Streptomyces albus* G153 もしくは *Streptomyces lividans* TK23 を TSB 培地に植菌し 30 °C で 2 日間培養する。
2. TSB 培地から *S. albus* は R2YE 培地 (0.5% Glycine 含む)、*S. lividans* は YEME 培地に 2% 植菌し、30 °C で 2 日間培養する。
3. 培養液 100 mL を 3000 rpm 10 分間遠心し上清を捨てて、菌体を 20 mL の 10.3%スクロース溶液に懸濁する。
4. 3000 rpm 10 分間遠心し上清を捨てて、菌体を 20 mL の 10.3%スクロース溶液に懸濁する。
5. 3000 rpm 10 分間遠心し上清を捨てて、菌体を 10 mL の P buffer に懸濁する。
6. Lysozyme 40 mg を 10 mL の P buffer に溶解し、0.45 μm のフィルターでろ過滅菌して菌体溶液に加え、30 °C で 30 分から 60 分静置する。
7. 顕微鏡でプロトプラスト化したことを確認し、綿栓を詰めた漏斗を通す。
8. ろ液を 3000 rpm 10 分間遠心し上清を捨てて 20 mL の P buffer に懸濁し、綿栓を詰めた漏斗で二回ろ過する。
9. 3000 rpm 10 分遠心し上清を捨てて 2 mL の P buffer に懸濁し、0.1 mL ずつ分注する。保存は-80 °C で行う。

【放線菌のプロトプラスト調製 (*Streptomyces antibioticus* B-546)】

1. *Streptomyces antibioticus* B-546 を J 培地に植菌し 30 °C で 3 日間培養する。
2. J 培地から 34%Sucrose 濃度の J 培地 (0.5% Glycine 含む)に 1%植菌し、30 °C で 7-10 日間培養する。
3. 培養液 50 mL (適宜水で薄めないと沈殿しない)を 3000 rpm 10 分間遠心し上清を捨てて、菌体を 20 mL の 10.3%スクロース溶液に懸濁する。
4. 3000 rpm 10 分間遠心し上清を捨てて、菌体を 10 mL の P buffer に懸濁する。
5. Lysozyme 80 mg を 10 mL の P buffer に溶解し、0.45 μm のフィルターでろ過滅菌して菌体溶液に加え、30 °C で 30 分から 60 分静置する。
6. 顕微鏡でプロトプラスト化したことを確認し、孢子フィルターを通す。
7. ろ液を 3000 rpm 10 分間遠心し上清を捨てて 5 mL の P buffer に懸濁する。
8. 3000 rpm 10 分遠心し上清を捨てて 1 mL の P buffer に懸濁し (菌体量による)、0.1 mL ずつ分注する。保存は-80 °C で行う。

【放線菌のプロトプラスト調製 (CL190 株)】

1. *Streptomyces* sp. CL190 を TSB 培地に植菌し 30 °C で 2 日間培養する。
2. TSB 培地から SK-II 培地 (1% Glycine 含む)に 1%植菌し、30 °C で 2 日間培養する。

3. 培養液 50 mL を 3000 rpm 10 分間遠心し上清を捨てて、菌体を 20 mL の 10.3%スクロース溶液に懸濁する。
4. 3000 rpm 10 分間遠心し上清を捨てて、菌体を 10 mL の P buffer に懸濁する。
5. Lysozyme 40 mg を 10 mL の P buffer に溶解し、0.45 μm のフィルターでろ過滅菌して菌体溶液に加え、30 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分から 60 分静置する。
6. 顕微鏡でプロトプラスト化したことを確認し、孢子フィルターを通す。
7. ろ液を 3000 rpm 5 分間遠心し上清を捨てて 5 mL の P buffer に懸濁する。この操作を再度繰り返す。
8. 3000 rpm 10 分遠心し上清を捨てて 1 mL の P buffer に懸濁し、0.1 mL ずつ分注する。保存は-80 $^{\circ}\text{C}$ で行う。

【放線菌の形質転換】

1. プロトプラストに DNA 溶液を 10 μL 加え懸濁し、PEG 溶液*を 500 μL 加えて 1 分間静置する。
*PEG 溶液: 1 g の PEG1000 を滅菌後、3 mL の P buffer に溶解する。
2. 上清を捨てて適量の P buffer に懸濁し R2YE 寒天培地に植菌して 30 $^{\circ}\text{C}$ で 16~20 時間培養する。
3. 適当な抗生物質 (Thiostrepton 終濃度 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ もしくは Apramycin 終濃度 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を重層し 30 $^{\circ}\text{C}$ で 2~5 日間培養する。
5. 生育したコロニーを適当な抗生物質を含む TSB 寒天培地に植継ぐ。

【放線菌の培養】

放線菌は、TSB 培地を大試験管に 10 mL 分注し、バネを入れて 30 $^{\circ}\text{C}$ で 2 日間前培養した。前培養から、500 mL のバツフル付き三角フラスコに分注された KG 培地や NMMP 培地や YEME 培地 100 mL に 2 mL 植菌し、27 $^{\circ}\text{C}$ で 2 日間または 5 日間または 7 日間本培養を行った。

【放線菌培養液からの抽出】

培養終了後、培養液の 2 倍量のアセトンを加え 2 時間静置した後、菌体をろ過して除き、エバポレーターを用いてアセトンを除去した。残った水層を酢酸エチルで抽出した後、酢酸エチル層を分液し、硫酸ナトリウムで脱水した。次にエバポレーターで酢酸エチルを乾固させて、残渣をメタノールに溶解し、0.45 μm のフィルターによりろ過してサンプルバイ

アル (17.5 mm × 50 mm)に移しメタノールを乾固させた。各サンプル質量を定量したのち、メタノールに溶解させ、適宜希釈して HPLC および LC-MS 分析に供した。

培養液上清からのみ抽出を行う場合は以下のようにした。まず、培養液を 5000 rpm, 10 分間遠心し培養液上清と菌体を分離した。得られた培養液上清を等量の酢酸エチルで抽出した後、酢酸エチル層を分液した。得られた酢酸エチル層を上記と同様にしてサンプルを調製し、HPLC および LC-MS 分析に供した。

【組換えタンパク質の発現】

目的のタンパク質をコードする遺伝子がクローニングされた大腸菌用発現ベクターで、*E. coli* BL21(DE3)または *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3)を形質転換し、LB 寒天培地 (適宜抗生物質を添加)に植菌して 37 °C で 16 時間培養した。得られた形質転換体を LB 培地 (適宜抗生物質を添加)に植菌し 37 °C で 8~16 時間、前培養を行った。

次に坂口フラスコに調製した 100 mL の TB 培地 (適宜抗生物質を添加)に前培養から 2%植菌し、37 °C で 2 時間培養したのち、坂口フラスコを氷水中で 10 分間冷却してコールドショックを与え、終濃度 0.1 mM の IPTG を添加して 18 °C で 20 時間培養し、組換えタンパク質を発現した大腸菌を得た。

【組換えタンパク質の精製】

組換えタンパク質を発現させた大腸菌もしくは放線菌培養液を 5000 rpm 10 分間遠心し、上清を捨てた。菌体を Wash Buffer で再懸濁し、再度 5000 rpm 10 分間遠心し、上清を捨てた。得られた菌体を Lysis buffer に懸濁し、超音波により菌体を破碎した。菌体破碎液を 17000 rpm 20 分間遠心し上清と破碎した菌体を分離した。上清を Ni-NTA superflow (QIAGEN) を充てんしたカラムに通した。上清が全てカラムを通過した後、Wash buffer を 20 mL 流し非特異的に担体と結合したタンパク質を除いた。そして、Elution buffer を 10 mL 流して目的の組換えタンパク質を溶出した。

得られた目的組換えタンパク質は viva spin (10 kDa molecular weight cut off)を用いて濃縮した。濃縮後、Protein assay (Bio-Rad)を用いてタンパク質濃度の定量を行った。また、精製の各段階のサンプルを SDS-PAGE に供し精製度を確認した。

【結晶化用組換えタンパク質の精製】

結晶化に用いるタンパク質資料は Ni-アフィニティークロマトグラフィーにて生成した後、ゲル濾過クロマトグラフィーによって調製した。結晶化用タンパク質精製のための Wash Buffer (20 mM Tris-HCl pH8.0, 500 mM NaCl, 20mM Imidazole, 10% (w/v) Glycerol)と Elution

Buffer (20 mM Tris-HCl pH8.0, 500 mM NaCl, 500mM Imidazole, 10% (w/v) Glycerol)を用いた。ゲル濾過のカラムは Superdex 200 pg を用い、移動相 (20 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl) は 4°C, 流速 1 mL で流した。

【*Streptomyces antibioticus* B-546 からのゲノム調製】

まず培養液中の菌体を 3500 rpm, 10 分遠心して集菌した (適宜水を加えて沈殿しやすくする)。上清を捨てたのちに 0.3 M Sucrose 溶液で懸濁し、再度 3500 rpm, 10 分遠心した。この洗浄操作をもう一度繰り返した。上清を捨て、2 mL の STE buffer で懸濁した。そこに 8 mg/mL の Lysozyme (in STE buffer)を添加して転倒混和 (Lysozyme 終濃度 4 mg/mL)。37°C で 30 分間静置した (5 分おきに転倒混和)。0.4mL 10%SDS,50 μ L 20mg/mL proteinase K を添加して転倒混和し、50°C で 60 分間静置した (5 分毎に転倒混和)。5 mL の TE 飽和フェノールを添加して均一になるまで混和したのち、5 mL Chloroform を添加し均一になるまで混和した。8000 rpm, 20 分間遠心して上清を新しいチューブに移し、5 mL phenol/CHCl₃/isoamylalcohol (25:24:1)を加えて均一になるまで混和。この操作をもう一度繰り返した。上清に 10 mg/mL の RNase を 1 μ L 添加して 37°C で 30 分間静置した。5 mL phenol/CHCl₃/isoamylalcohol (25:24:1) を添加して均一になるまで混和し、Maxtract™ High Density に移し替えて遠心 (8000rpm,10min)。上清を新しいチューブに移して 0.4 mL 3M NaOAc, 2.4 mL 2-propanol, 1-2 時間静置 (場合によっては O/N)した。ゲノムを釣り上げて数回 70%エタノールで wash したのち、100%エタノールで wash し、よくエタノールを切った後 150 μ L の TE buffer に溶解させた。

【NMR analysis】

HPLC にて精製した化合物はエバポレーターで乾固し、サンプルバイアル (17.5 mm \times 50 mm)に移したのち質量を測定した。

NMR を測定する際には、サンプルを真空ポンプで 16 時間乾燥させ、含有する水を除去し、NMR 測定用の重水素溶媒に溶解させて NMR を測定した。

【HPLC による ATP 分解物の検出条件】

Column: Shiseido CAPCELL PAK C18 MGII 4.6 \times 250 mm

Solvent: A: H₂O+5 mM Dibutylammonium acetate, B: MeOH

Pump control: B20-90 (0-20 min), B90-20 (20-21min), B20 (21-36 min)

Flow rate: 1.0 mL/min

【*In vitro* 反応および放線菌培養液の LC-MS 解析条件】

Column: ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 × 50 mm

Solvent: A: H₂O+0.1% Formic acid, B: Acetonitrile+0.1% Formic acid

Pump control: B10-90% (0-4 min), B90% (4-5 min), B90-10% (5-5.1 min), B10% (5.1-10 min)

Oven control: 40°C const.

Flow rate: 0.4 mL/min

【*In vitro* 反応および放線菌培養液の PDa-QDa 解析条件】

Column: Shiseido CAPCELL PAK C18IF 2.0 × 50 mm

Solvent: A: H₂O+0.1% Formic acid, B: Acetonitrile+0.1% Formic acid

Pump control: B10-90% (0-4 min), B90% (4-5 min), B90-10% (5-5.1 min), B10% (5.1-10 min)

Oven control: 40°C const.

Flow rate: 0.4 mL/min

【放線菌培養液の UPLC 解析条件】

Column: Shiseido CAPCELL PAK C18IF 2.0 × 50 mm

Solvent: A: H₂O+0.1% Formic acid, B: Acetonitrile+0.1% Formic acid

Pump control: B10-90% (0-4 min), B90% (4-5 min), B90-10% (5-5.1 min), B10% (5.1-10 min)

Oven control: 40°C const.

Flow rate: 0.4 mL/min

【GC-MS による窒素検出条件条件】

Column: Msieve-5A, 30 m 0.32 mm ID, 30 μm [Restek]

Oven control: 40°C const.

引用文献

1. Matsuda, Y., Awakawa, T., Mori, T. & Abe, I. Unusual chemistries in fungal meroterpenoid biosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology* vol. 31 1–7 (2016).
2. Murray, L. A. M., McKinnie, S. M. K., Moore, B. S. & George, J. H. Meroterpenoid natural products from Streptomyces bacteria – the evolution of chemoenzymatic syntheses. *Nat. Prod. Rep.* **37**, 1334–1366 (2020).
3. Kuzuyama, T. Biosynthetic studies on terpenoids produced by Streptomyces. *Journal of Antibiotics* vol. 70 811–818 (2017).
4. Komiyama, K. *et al.* Novel antibiotics, furaquinocins A and B. Taxonomy, fermentation, isolation and physico-chemical and biological characteristics. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **43**, 247–52 (1990).
5. Ishibashi, M., Funayama, S., Anraku, Y., Komiyama, K. & Omura, S. Novel antibiotics, furaquinocins C, D, E, F, G and H. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **44**, 390–5 (1991).
6. Shin-ya, K. *et al.* Isolation and Structural Elucidation of An Antioxidative Agent, Naphterpin. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **43**, 444–447 (1990).
7. Sedmera, P., Pospíšil, S. & Novák, J. New Furanonaphthoquinone from Streptomyces cinnamomensis. *J. Nat. Prod.* **54**, 870–872 (1991).
8. Shiomi, K. *et al.* Structures of new antibiotics napyradiomycins. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **39**, 494–501 (1986).
9. Kaysser, L. *et al.* Merochlorins A-D, cyclic meroterpenoid antibiotics biosynthesized in divergent pathways with vanadium-dependent chloroperoxidases. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 11988–11991 (2012).
10. Kawasaki, T. *et al.* Biosynthesis of a natural polyketide-isoprenoid hybrid compound, furaquinocin A: Identification and heterologous expression of the gene cluster. *J. Bacteriol.* **188**, 1236–1244 (2006).
11. Kuzuyama, T., Noel, J. P. & Richard, S. B. Structural basis for the promiscuous biosynthetic prenylation of aromatic natural products. *Nature* **435**, 983–7 (2005).
12. Haaqen, Y. *et al.* A gene cluster for prenylated naphthoquinone and prenylated phenazine biosynthesis in Streptomyces cinnamomensis DSM 1042. *ChemBioChem* **7**, 2016–2027 (2006).
13. Winter, J. M. *et al.* Molecular basis for chloronium-mediated meroterpene cyclization: Cloning, sequencing, and heterologous expression of the napyradiomycin biosynthetic gene cluster. *J. Biol. Chem.* **282**, 16362–16368 (2007).
14. Isogai, S., Nishiyama, M. & Kuzuyama, T. Identification of 8-amino-2,5,7-trihydroxynaphthalene-1,4-dione, a novel intermediate in the biosynthesis of Streptomyces meroterpenoids. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **22**, 5823–5826 (2012).

15. Singh, N., Maniscalco, S. J. & Fisher, H. F. The real-time resolution of proton-related transient-state steps in an enzymatic reaction. The early steps in the oxidative deamination reaction of bovine liver glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **268**, 21–28 (1993).
16. Ozeir, M. *et al.* Coq6 is responsible for the C4-deamination reaction in coenzyme Q biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **290**, 24140–51 (2015).
17. Du, Y. L. & Ryan, K. S. Pyridoxal phosphate-dependent reactions in the biosynthesis of natural products. *Natural Product Reports* vol. 36 430–457 (2019).
18. Liang, J., Han, Q., Tan, Y., Ding, H. & Li, J. Current advances on structure-function relationships of pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzymes. *Frontiers in Molecular Biosciences* vol. 6 4 (2019).
19. Percudani, R. & Peracchi, A. A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes. *EMBO Reports* vol. 4 850–854 (2003).
20. Hoffarth, E. R., Rothchild, K. W. & Ryan, K. S. Emergence of oxygen- and pyridoxal phosphate-dependent reactions. *FEBS Journal* vol. 287 1403–1428 (2020).
21. Toney, M. D. Aspartate aminotransferase: An old dog teaches new tricks. *Archives of Biochemistry and Biophysics* vol. 544 119–127 (2014).
22. Goldberg, J. M. & Kirsch, J. F. The reaction catalyzed by *Escherichia coli* aspartate aminotransferase has multiple partially rate-determining steps, while that catalyzed by the Y225F mutant is dominated by ketimine hydrolysis. *Biochemistry* **35**, 5280–5291 (1996).
23. Casasnovas, R., Salvà, A., Frau, J., Donoso, J. & Muñoz, F. Theoretical study on the distribution of atomic charges in the Schiff bases of 3-hydroxypyridine-4-aldehyde and alanine. The effect of the protonation state of the pyridine and imine nitrogen atoms. *Chem. Phys.* **355**, 149–156 (2009).
24. Casasnovas, R. *et al.* C-H activation in pyridoxal-5'-phosphate Schiff bases: The role of the imine nitrogen. A combined experimental and computational study. *J. Phys. Chem. B* **116**, 10665–10675 (2012).
25. Richard, J. P., Amyes, T. L., Crujeiras, J. & Rios, A. Pyridoxal 5'-phosphate: electrophilic catalyst extraordinaire. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 475–483 (2009).
26. Richard, J. P., Amyes, T. L., Crujeiras, J. & Rios, A. The PLP cofactor: Lessons from studies on model reactions. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1814**, 1419–1425 (2011).
27. Major, D. T. & Gao, J. A combined quantum mechanical and molecular mechanical study of the reaction mechanism and α -amino acidity in alanine racemase. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 16345–16357 (2006).
28. Rabeh, W. M. & Cook, P. F. Structure and Mechanism of O-Acetylserine Sulfhydrylase. *J. Biol. Chem.* **279**, 26803–26806 (2004).

29. Griswold, W. R. & Toney, M. D. Role of the pyridine nitrogen in pyridoxal 5'-phosphate catalysis: Activity of three classes of PLP enzymes reconstituted with deazapyridoxal 5'-phosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 14823–14830 (2011).
30. Fetzner, S. & Steiner, R. A. Cofactor-independent oxidases and oxygenases. *Applied Microbiology and Biotechnology* vol. 86 791–804 (2010).
31. Klinman, J. P. How do enzymes activate oxygen without inactivating themselves? *Acc. Chem. Res.* **40**, 325–333 (2007).
32. Tang, M. C., Zou, Y., Watanabe, K., Walsh, C. T. & Tang, Y. Oxidative Cyclization in Natural Product Biosynthesis. *Chemical Reviews* vol. 117 5226–5333 (2017).
33. Belcher, J. *et al.* Structure and Biochemical Properties of the Alkene Producing Cytochrome P450 OleTJE (CYP152L1) from the *Jeotgalicoccus* sp. 8456 Bacterium. *J. Biol. Chem.* **289**, 6535–6550 (2014).
34. Mattevi, A. To be or not to be an oxidase: challenging the oxygen reactivity of flavoenzymes. *Trends in Biochemical Sciences* vol. 31 276–283 (2006).
35. Chaiyen, P., Fraaije, M. W. & Mattevi, A. The enigmatic reaction of flavins with oxygen. *Trends in Biochemical Sciences* vol. 37 373–380 (2012).
36. Thierbach, S. *et al.* Substrate-assisted O₂ activation in a cofactor-independent dioxygenase. *Chem. Biol.* **21**, 217–225 (2014).
37. Hernández-Ortega, A. *et al.* Catalytic Mechanism of Cofactor-Free Dioxygenases and How They Circumvent Spin-Forbidden Oxygenation of Their Substrates. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 7474–7487 (2015).
38. Chen, L., Deng, Z. & Zhao, C. Nitrogen-Nitrogen Bond Formation Reactions Involved in Natural Product Biosynthesis. *ACS Chemical Biology* vol. 16 559–570 (2021).
39. Katsuyama, Y. & Matsuda, K. Recent advance in the biosynthesis of nitrogen–nitrogen bond–containing natural products. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **59**, 62–68 (2020).
40. McGuire, J. N., Wilson, S. R. & Rinehart, K. L. Cremeomycin, a Novel Cytotoxic Antibiotic from *Streptomyces cremeus*. Structure Elucidation and Biological Activity. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **48**, 516–519 (1995).
41. Takeda, K., Okuno, S., Ohashi, Y. & Furu, T. A NEW ANTIBIOTIC, KINAMYCIN. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2**, 888–901 (1982).
42. Hata, T. & Umezawa, I. Studies on the antitumor activity of an alazopeptin isolated from a new strain of streptomyces. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **26**, 181–183 (1973).
43. Fujimori, D. G. *et al.* Cloning and characterization of the biosynthetic gene cluster for kutznerides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 16498–503 (2007).
44. Rosen, B. R., Werner, E. W., O'Brien, A. G. & Baran, P. S. Total synthesis of dixiamycin B by electrochemical oxidation. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 5571–5574 (2014).

45. Thiemann, J. E. & Beretta, G. Alanosine, a new antiviral and antitumor antibiotic from streptomycetes. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **19**, 155–160 (1966).
46. Coronelli, C., Pasqualucci, C. R., Tamoni, G. & Gallo, G. G. Isolation and structure of alanosine, a new antibiotic. *Farmaco. Sci.* **21**, 269–277 (1966).
47. Vavra, J. J., Deboer, C., Dietz, A., Hanka, L. J. & Sokolski, W. T. Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic. *Antibiot. Annu.* **7**, 230–235 (1959).
48. Ōmura, S., Tomoda, H., Xu, Q. M., Takahashi, Y. & Iwai, Y. Triacsins, new inhibitor of acetyl-CoA synthetase produced by Streptomyces sp. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **39**, 1211–1218 (1986).
49. Hartman, E. J., Omura, S. & Laposata, M. Triacsin C: A differential inhibitor of arachidonoyl-CoA synthetase and nonspecific long chain acyl-CoA synthetase. *Prostaglandins* **37**, 655–671 (1989).
50. Twigg, F. F. *et al.* Identifying the Biosynthetic Gene Cluster for Triacsins with an N-Hydroxytriazene Moiety. *ChemBioChem* **20**, 1145–1149 (2019).
51. Cho, J. Y., Kwon, H. C., Williams, P. G., Jensen, P. R. & Fenical, W. Azamerone, a terpenoid phthalazinone from a marine-derived bacterium related to the genus Streptomyces (actinomycetales). *Org. Lett.* **8**, 2471–2474 (2006).
52. Nelson, J. A., Carpenter, J. W., Rose, L. M. & Adamson, D. J. Mechanisms of Action of 6-Thioguanine, 6-Mercaptopurine, and 8-Azaguanine. *Cancer Res.* **35**, (1975).
53. Guo, Y. Y. *et al.* Molecular mechanism of azoxy bond formation for azoxymycins biosynthesis. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
54. Matsuda, K. *et al.* Discovery of Unprecedented Hydrazine-Forming Machinery in Bacteria. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 9083–9086 (2018).
55. Del Rio Flores, A. *et al.* Biosynthesis of triacsin featuring an N-hydroxytriazene pharmacophore. *Nat. Chem. Biol.* **17**, 1305–1313 (2021).
56. Zhao, G. *et al.* The Biosynthetic Gene Cluster of Pyrazomycin—A C-Nucleoside Antibiotic with a Rare Pyrazole Moiety. *ChemBioChem* **21**, 644–649 (2020).
57. He, H. Y., Henderson, A. C., Du, Y. L. & Ryan, K. S. Two-Enzyme Pathway Links l-Arginine to Nitric Oxide in N-Nitroso Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 4026–4033 (2019).
58. Ng, tai L., Rohac, R., Mitchell, A. J., Boal, A. K. & Balskus, emily P. An N-nitrosating metalloenzyme constructs the pharmacophore of streptozotocin. *Nature* **566**, 94–99 (2019).
59. Sugai, Y., Katsuyama, Y. & Ohnishi, Y. A nitrous acid biosynthetic pathway for diazo group formation in bacteria. *Nat. Chem. Biol.* **12**, 1–5 (2015).
60. Du, Y. L., He, H. Y., Higgins, M. A. & Ryan, K. S. A heme-dependent enzyme forms the nitrogen-nitrogen bond in piperazate. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 836–838 (2017).

61. Zhao, G. *et al.* Nitric oxide as a source for bacterial triazole biosynthesis. *Nat. Commun.* **11**, 1–10 (2020).
62. Katsuyama, Y. & Matsuda, K. Recent advance in the biosynthesis of nitrogen–nitrogen bond–containing natural products. *Current Opinion in Chemical Biology* vol. 59 62–68 (2020).
63. Wang, K. K. A. *et al.* Glutamic acid is a carrier for hydrazine during the biosyntheses of fosfazinomycin and kinamycin. *Nat. Commun.* **9**, 3687 (2018).
64. Winter, J. M., Jansma, A. L., Handel, T. M. & Moore, B. S. Formation of the pyridazine natural product azamerone by biosynthetic rearrangement of an aryl diazoketone. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **48**, 767–770 (2009).
65. Kawai, S. *et al.* Complete Biosynthetic Pathway of Alazopeptin, a Tripeptide Consisting of Two Molecules of 6-Diazo-5-oxo-l-norleucine and One Molecule of Alanine. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **60**, 10319–10325 (2021).
66. Waldman, A. J. & Balskus, E. P. Discovery of a Diazo-Forming Enzyme in Cremeomycin Biosynthesis. *J. Org. Chem.* **83**, 7539–7546 (2018).
67. Raman, M. C. C. *et al.* The external aldimine form of serine palmitoyltransferase: Structural, kinetic and spectroscopic analysis of the wild-type enzyme and HSAN1 mutant mimics. *J. Biol. Chem.* **284**, 17328–17339 (2009).
68. Bertoldi, M., Cellini, B., Maras, B. & Voltattorni, C. B. A quinonoid is an intermediate of oxidative deamination reaction catalyzed by Dopa decarboxylase. *FEBS Lett.* **579**, 5175–5180 (2005).
69. Jhee, K. H. *et al.* Mutation of an active site residue of tryptophan synthase (β -Serine 377) alters cofactor chemistry. *J. Biol. Chem.* **273**, 11417–11422 (1998).
70. Runge, E. & Gross, E. K. U. Density-Functional Theory for Time-Dependent Systems. *Phys. Rev. Lett.* **52**, 997 (1984).
71. Yabana, K. & Bertsch, G. F. PHYSICAL REVIEW B 15 AUGUST 1996-I VOLUME. **54**, 54 (1996).
72. Cerqueira, N. M. F. S. A., Fernandes, P. A. & Ramos, M. J. Computational mechanistic studies addressed to the transimination reaction present in all pyridoxal 5'-phosphate-requiring enzymes. *J. Chem. Theory Comput.* **7**, 1356–1368 (2011).
73. Granovsky, A. A. Firefly version 7.1.G. <http://classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html> (2012).
74. Jez, J. M., Ferrer, J. L., Bowman, M. E., Dixon, R. A. & Noel, J. P. Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase. *Biochemistry* **39**, 890–902 (2000).
75. Jumper, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nat.*

2021 5967873 **596**, 583–589 (2021).

76. Liang, J., Han, Q., Tan, Y., Ding, H. & Li, J. Current advances on structure-function relationships of pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzymes. *Frontiers in Molecular Biosciences* vol. 6 (2019).

77. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. C. *et al.* Gaussian 16 Rev. B.01. (2016).

78. D.A. Case, H.M. Aktulga, K. Belfon, I.Y. Ben-Shalom, S.R. Brozell, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, G.A. Cisneros, V.W.D. Cruzeiro, T.A. Darden, R.E. Duke, G. Giambasu, M.K. Gilson, H. Gohlke, A.W. Goetz, R. Harris, S. Izadi, S.A. Izmailov, C. Jin, K. Ka, and P. A. K. Amber 2021. (2021).

79. Wang, J., Wang, W., Kollman, P. A. & Case, D. A. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *J. Mol. Graph. Model.* **25**, 247–260 (2006).

80. Maier, J. A. *et al.* ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* **11**, 3696–3713 (2015).

81. Mobley, D. L., Bayly, C. I., Cooper, M. D., Shirts, M. R. & Dill, K. A. Correction to Small Molecule Hydration Free Energies in Explicit Solvent: An Extensive Test of Fixed-Charge Atomistic Simulations. *J. Chem. Theory Comput.* **11**, 1347 (2015).

82. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. & Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926–935 (1983).

83. Bussi, G., Donadio, D. & Parrinello, M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* **126**, 014101 (2007).

84. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Van Gunsteren, W. F., Dinola, A. & Haak, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **81**, 3684–3690 (1984).

85. Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C. & Fraaije, J. G. E. M. LINCS: A Linear Constraint Solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.* **18**, 1463–1472 (1997).

86. Hess, B. P-LINCS: A parallel linear constraint solver for molecular simulation. *J. Chem. Theory Comput.* **4**, 116–122 (2008).

87. Darden, T., York, D. & Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **98**, 10089–10092 (1993).

88. Essmann, U. *et al.* A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* **103**, 8577–8593 (1995).

89. Hess, B., Kutzner, C., Van Der Spoel, D. & Lindahl, E. GRGMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J. Chem. Theory Comput.* **4**, 435–447 (2008).

90. Hirayama, A., Miyanaga, A., Kudo, F. & Eguchi, T. Mechanism-Based Trapping of

the Quinonoid Intermediate by Using the K276R Mutant of PLP-Dependent 3-Aminobenzoate Synthase PctV in the Biosynthesis of Pactamycin. *ChemBioChem* **16**, 2484–2490 (2015).

91. Bunik, V. I., Schloss, J. V., Pinto, J. T., Dudareva, N. & Cooper, A. J. L. A Survey of Oxidative Paracatalytic Reactions Catalyzed by Enzymes that Generate Carbanionic Intermediates: Implications for ROS Production, Cancer Etiology, and Neurodegenerative Diseases. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **77** **1**, 307–360 (2010).

92. Kumano, T., Tomita, T., Nishiyama, M. & Kuzuyama, T. Functional characterization of the promiscuous prenyltransferase responsible for furaquinocin biosynthesis: Identification of a physiological polyketide substrate and its prenylated reaction products. *J. Biol. Chem.* **285**, 39663–39671 (2010).

93. Meurer, G. & Hutchinson, R. Functional analysis of putative beta-ketoacyl:acyl carrier protein synthase and acyltransferase active site motifs in a type II polyketide synthase of *Streptomyces glaucescens*. *J. Bacteriol.* **177**, 477–481 (1995).

94. Dairi, T., Aisaka, K., Katsumata, R. & Hasegawa, M. A Self-defense Gene Homologous to Tetracycline Effluxing Gene Essential for Antibiotic Production in *Streptomyces aureofaciens*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 1835–1841 (1995).

95. Khalid, A. *et al.* Development of a Terpenoid-Production Platform in *Streptomyces reveromyceticus* SN-593. *ACS Synth. Biol.* **6**, 2339–2349 (2017).

96. Liscombe, D. K., Louie, G. V. & Noel, J. P. Architectures, mechanisms and molecular evolution of natural product methyltransferases. *Nat. Prod. Rep.* **29**, 1238–1250 (2012).

97. Anand, A. *et al.* Polyketide Quinones Are Alternate Intermediate Electron Carriers during Mycobacterial Respiration in Oxygen-Deficient Niches. *Mol. Cell* **60**, 637–650 (2015).

98. Scherbak, N., Strid, Å. & Eriksson, L. A. Non-enzymatic oxidation of NADH by quinones. *Chem. Phys. Lett.* **414**, 243–247 (2005).

99. Huynh, M. T., Anson, C. W., Cavell, A. C., Stahl, S. S. & Hammes-Schiffer, S. Quinone 1 e⁻ and 2 e⁻/2 H⁺ Reduction Potentials: Identification and Analysis of Deviations from Systematic Scaling Relationships. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 15903–15910 (2016).

100. 内木光. キノン類の酸化還元電位と化学構造との関係. https://www.jstage.jst.go.jp/article/fiber1944/16/3/16_3_251/_pdf/-char/ja (1960).

101. Patton, G. C. *et al.* Cofactor mobility determines reaction outcome in the IMPDH and GMMP (2- \pm) 8 barrel enzymes. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 950–958 (2011).

102. Chen, S. C. *et al.* Structure and mechanism of an antibiotics-synthesizing 3-hydroxykynurenine C-methyltransferase. *Sci. Rep.* **5**, 1–10 (2015).

103. Sun, Q., Huang, M. & Wei, Y. Diversity of the reaction mechanisms of SAM-dependent enzymes. *Acta Pharm. Sin. B* **11**, 632–650 (2021).

104. Yu, F. *et al.* Crystal structure and enantioselectivity of terpene cyclization in SAM-dependent methyltransferase TleD. *Biochem. J.* **473**, 4385–4397 (2016).
105. Awakawa, T. Enzymatic reactions in teleocidin B biosynthesis. *J. Nat. Med.* **75**, 467–474 (2021).
106. Jiang, C. *et al.* Formation of the Δ 18,19 Double Bond and Bis(spiroacetal) in Salinomycin Is Atypically Catalyzed by SlnM, a Methyltransferase-like Enzyme. *Angew. Chemie* **127**, 9225–9228 (2015).
107. Ohashi, M. *et al.* SAM-dependent enzyme-catalysed pericyclic reactions in natural product biosynthesis. *Nat. 2017 5497673* **549**, 502–506 (2017).
108. Cai, Y. *et al.* Structural basis for stereoselective dehydration and hydrogen-bonding catalysis by the SAM-dependent pericyclase LepI. *Nat. Chem. 2019 119* **11**, 812–820 (2019).
109. Fage, C. D. *et al.* The structure of SpnF, a standalone enzyme that catalyzes [4 + 2] cycloaddition. *Nat. Chem. Biol. 2015 114* **11**, 256–258 (2015).
110. Kumon, Y. *et al.* Codenitrification and denitrification are dual metabolic pathways through which dinitrogen evolves from nitrate in *Streptomyces antibioticus*. *J. Bacteriol.* **184**, 2963–2968 (2002).
111. Shoun, H., Fushinobu, S., Jiang, L., Kim, S. W. & Wakagi, T. Fungal denitrification and nitric oxide reductase cytochrome P450nor. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* vol. 367 1186–1194 (2012).
112. Fernández-Martínez, L. T. *et al.* New Insights into Chloramphenicol Biosynthesis in *Streptomyces venezuelae* ATCC 10712. doi:10.1128/AAC.04272-14.
113. Hamano, Y., Maruyama, C. & Kimoto, H. Construction of a Knockout Mutant of the Streptothricin-Resistance Gene in *Streptomyces albulus* by Electroporation. *Actinomycetologica* **20**, 35–41 (2006).
114. Miles, Z. D. *et al.* A unifying paradigm for naphthoquinone-based meroterpenoid (bio)synthesis. *Nat. Chem.* **9**, 1235–1242 (2017).
115. Abell, L. M. & Schloss, J. V. Oxygenase Side Reactions of Acetolactate Synthase and Other Carbanion-Forming Enzymes. *Biochemistry* **30**, 7883–7887 (1991).
116. Healy, M. J. & Christen, P. Mechanistic probes for enzymic reactions. Oxidation-reduction indicators as oxidants of intermediary carbanions (studies with aldolase, aspartate aminotransferase, pyruvate decarboxylase, and 6-phosphogluconate dehydrogenase). *Biochemistry* **12**, 35–41 (1973).
117. Funabashi, M. *et al.* A metabolic pathway for bile acid dehydroxylation by the gut microbiome. *Nat. 2020 5827813* **582**, 566–570 (2020).
118. Wang, X., Rinaldi, R., Wang, J. X. & Rinaldi, R. A Route for Lignin and Bio-Oil Conversion: Dehydroxylation of Phenols into Arenes by Catalytic Tandem Reactions. *Angew.*

Chemie Int. Ed. **52**, 11499–11503 (2013).

119. Sone, Y. *et al.* Bacterial enzymes catalyzing the synthesis of 1,8-dihydroxynaphthalene, a key precursor of dihydroxynaphthalene melanin, from *Sorangium cellulosum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **84**, (2018).
120. Chevette, M. G. *et al.* Evolutionary dynamics of natural product biosynthesis in bacteria. *Nat. Prod. Rep.* **37**, 566–599 (2020).
121. Sawers, R. G., Falke, D. & Fischer, M. Oxygen and Nitrate Respiration in *Streptomyces coelicolor* A3(2). doi:10.1016/bs.ampbs.2016.02.004.
122. Borisov, V. B., Gennis, R. B., Hemp, J. & Verkhovsky, M. I. The cytochrome bd respiratory oxygen reductases. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1807**, 1398–1413 (2011).
123. Martínez-Reyes, I. & Chandel, N. S. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat. Commun.* 2020 111 **11**, 1–11 (2020).
124. Smith, H. Q., Li, C., Stanley, C. A. & Smith, T. J. Glutamate Dehydrogenase, a Complex Enzyme at a Crucial Metabolic Branch Point. *Neurochem. Res.* **44**, 117–132 (2019).

謝辞

本研究を行うにあたり多くの方々より、ご指導、ご鞭撻を賜りました。ここに感謝の意を述べさせていただきます。

研究に関する懇切丁寧な指導および助言を賜ったことのみならず、研究者という生き方を学ばせていただきました東京大学大学院農学生命科学研究科分子育種学研究室葛山智久教授に心から厚く御礼申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科細胞機能工学研究室西山真教授には、同研究室在籍時に研究に関しての多くの有益なご助言、ご指導を賜りました。心より厚く御礼申し上げます。同研究室古園さおり准教授にはゼミ等で研究に関する助言をいただきましたことを深く感謝いたします。同研究室吉田彩子助教には研究生活全般について多くのことを学ばせていただきました。

東京大学大学院農学生命科学研究科微生物代謝工学研究室富田武郎特任准教授には、タンパク質の結晶化に関して細やかなご指導いただきました。

東京大学大学院農学生命科学研究科微生物膜輸送工学研究室川崎寿特任教授には研究室のイベントで温かい言葉をかけていただきましたことを深く感謝いたします。

東京大学大学院農学生命科学研究科生物情報工学研究室寺田透准教授にはMD計算をはじめとしてバイオインフォマティクスの手技について多く学ばせていただきましたことを厚く御礼申し上げます。同研究室森脇由隆助教には共同研究において多くの示唆的なご意見をいただきました。同研究室趙凡氏には共同研究において多くの計算を実行していただきました。

ソーク研究所のJoseph Noel教授には留学時に快く受け入れてくださったことを厚く御礼申し上げます。同研究所Marianne Bowman博士およびGordon Louie博士には留学時の実験指導を丁寧にしていただきました。

また、留学時の生活面を支えてくださったホストファミリーのMaylen Sevilla氏およびその親族に深く感謝いたします。

北海道大学大利徹教授にはフラキノシン生合成遺伝子クラスターを快く御分与いただきました。厚く御礼申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科尾仲宏康特任教授には主催される輪読会に参加させていただき、幅広く多くの知見を得ることができました。同大勝山陽平准教授、浅水俊平特任講師をはじめ同会の参加者の皆様のおかげで大変有意義な時間を過ごすことができました。

た。

チューリッヒ工科大学の白石太郎博士には充実した研究生生活のための助言を多くいただきました。

産業総合技術研究所工藤慧博士には多くの実験を直接指導していただき、研究者としての心構えを学ばせていただきました。

分子育種学研究室、細胞機能工学研究室および微生物機能代謝工学研究室の先輩、同期の皆様には常日頃多くの面で支えていただきました。厚く御礼申し上げます。

研究室外での生活に彩りを与えてくれた高校の同期およびサークルの友人に深く感謝いたします。

最後になりましたが、私の研究生生活を金銭面、健康面、精神面で支えてくれた家族に心より感謝いたします。