

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 31 年度博士課程進学 野口 智弘

指導教員 葛山 智久

論文題目 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

背景と目的

放線菌が生産するメロテルペノイドとして、*Streptomyces* sp. KO-3988 の生産する Furaquinocin、*Streptomyces* sp. CL190 の生産する Naphterpin をはじめとして Furanonaphthoquinone, Napyradiomycin, Merochlorin などが単離されており、これらは抗腫瘍、抗菌、抗酸化活性など多様な生物活性を示すことが報告されている。これらの天然有機化合物はいずれも、保存されたポリケタイド骨格と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るという特徴がある。

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、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、第三章では Fur5 ホモログの共脱窒への寄与の検証、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った。

先行研究として、これらメロテルペノイドに共通の生合成中間体として 8-Amino-flaviolin (8-AF) が同

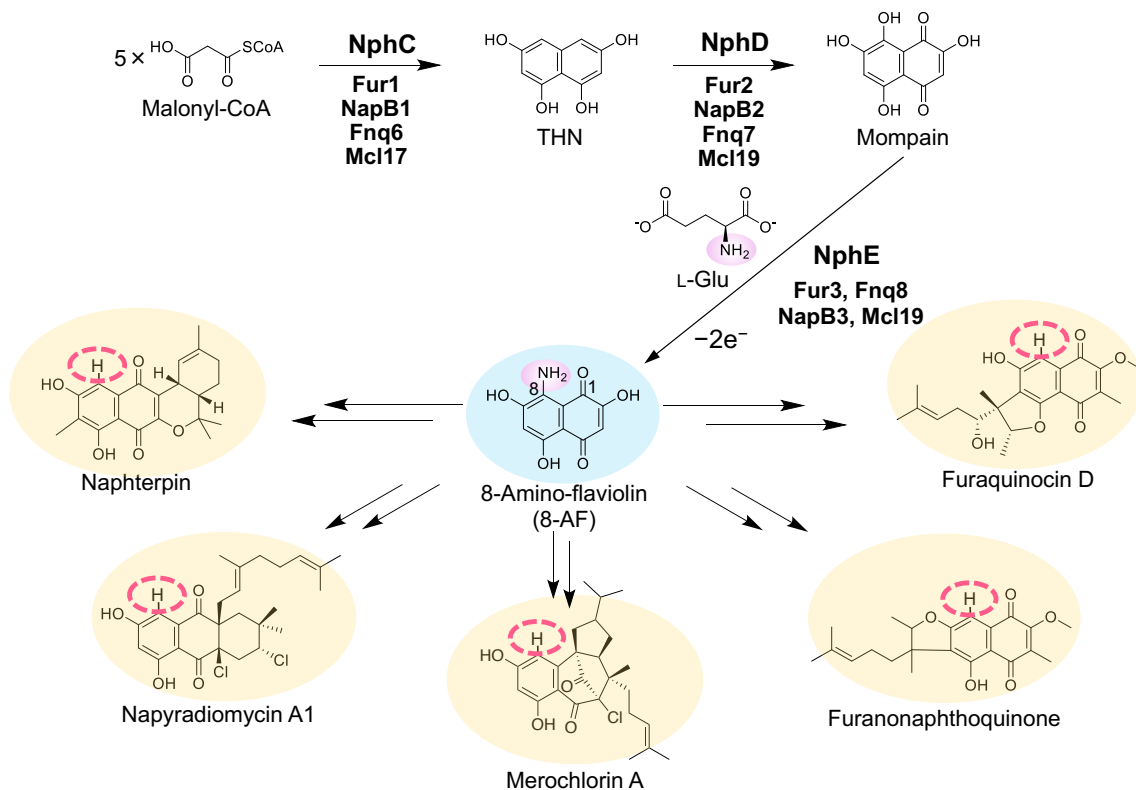


図 1 放線菌の生産するメロテルペノイド

定されていた。しかし、Furaquinocin などのいずれの最終産物にも 8 位のアミノ基が存在せず、アミノ基は水素原子に置換されている。さらにこの普遍的なアミノ基導入および除去反応はこれまでに知られている機構と大きく異なると予想されたため、反応機構や生理的意義を含め興味深い研究対象である (図 1)。

Mompain から 8-AF への変換過程におけるアミノ基導入は、アミノ基転移だけでなく二電子酸化も伴い、通常のアミノ基転移反応とは様式が異なるため、「酸化のアミノ基転移 (oxidative transamination)」と呼称することにした。一方で 8-AF からのアミノ基除去において観察される、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」は、アミノ基がカルボニル基やヒドロキシ基に置換される形で起こる通常のアミノ化とは様式が異なっているため、新規な機構で進行することが予想された。そこで本研究では、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規アミノ基導入および除去を含む生合成機構と、その生理的意義の解明を目的とした。

結果と考察

第一章 Mompain から 8-AF までの変換過程における酸化のアミノ化機構の解明

前任者によって Mompain から 8-AF への変換は、L-グルタミン酸をアミノ基供与体、Mompain を受容体としたアミノ基転移であり、PLP 依存性アミノ基転移酵素 NphE やそのホモログが反応を担うことが明らかにされていた。しかし Mompain から 8-AF への変換過程においては二電子酸化も必要であり、NphE の反応機構の詳細については不明なままであった。

今回、*E. coli* から調製した NphE の組換え酵素を用いて *in vitro* 反応を行い、分光光度計や酸素電極を用いることで、図 2 の様な詳細な反応機構を明らかにした。まず NphE 活性中心の Lys 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

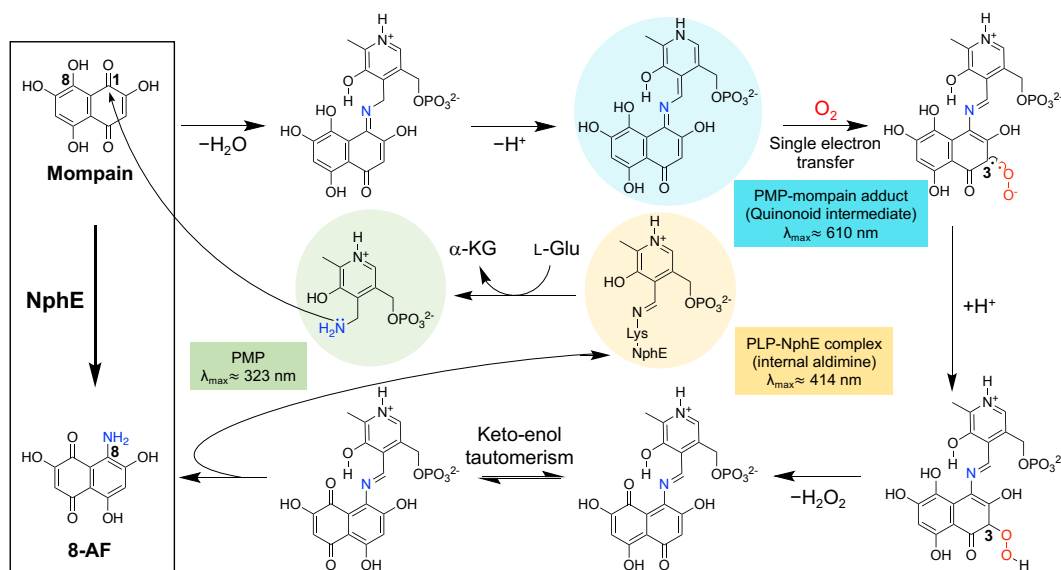


図 2 今回明らかにした NphE の反応機構

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、Lys による 8-AF の切り出しが起こり、NphE の internal aldimine が再生することで酵素反応サイクルが回転する。さらに NphE の AlphaFold v2.0 による予測構造と PMP-mompain adduct との複合体 MD 計算を行った結果からも、PMP-mompain adduct 認識に関わるアミノ酸残基や、mompain 部分の 3 位まで通じうる酸素の通り道が示され、この反応機構と矛盾しない結果が得られた。

第二章 8-AF から MMF への変換過程における還元的脱アミノ化機構の解析

Furaquinocin D は 21 個の遺伝子 (*fur1-21*) によって生成され、その生成中間体として 8-AF の他に、ゲラニル基転移酵素 (Fur7) の基質である生成中間体、2-Methoxy-3-methylflaviolin (MMF) も同定されている。MMF には既にアミノ基が存在しないことから、8-AF から MMF への変換過程で還元的脱アミノ化が起こると考えられ、*fur4, 5, 6, 16* の関与が遺伝子破壊実験から示唆されていた。修士課程においては各種酵素について *E. coli* BL21(DE3) を宿主に用いて発現させ、*in vitro* 反応解析を行った。なお Fur5 の組換え酵素は不溶性であったため、Naphterpin 生合成クラスター中の Fur5 ホモログである NphH を代わりに用いていた。その結果、Fur16, 17 が L-アスパラギン酸から亜硝酸への変換を担うことを明らかにした。また Fur6 が 8-AF の 3 位の炭素をメチル化して 3-Methyl-8-amino-flaviolin (3-MAF) へと変換し、NphH が 3-MAF を ATP と亜硝酸依存的にジアゾ化し 3-Methylflaviolin (3-MF) へと変換することを見出した。また Fur4 と SAM 依存的な 3-MF から MMF への変換反応の検出も行った。

しかし、修士課程での実験においては、本来の Furaquinocin 生合成経路中の Fur5 の代わりに Naphterpin 生合成クラスター中の Fur5 ホモログである NphH を用いていたため反応効率が低く、Fur4,6 によるメチル化も反応効率が低かった。博士課程の研究において、放線菌から可溶性 Fur5 の取得に成功し、改めて各酵素反応を精査した結果、Furaquinocin は図 3 で示した新規な窒素代謝が関与する経路で生成されることを明らかにした。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。8-Diazoflaviolin はジアゾ基を有しているため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

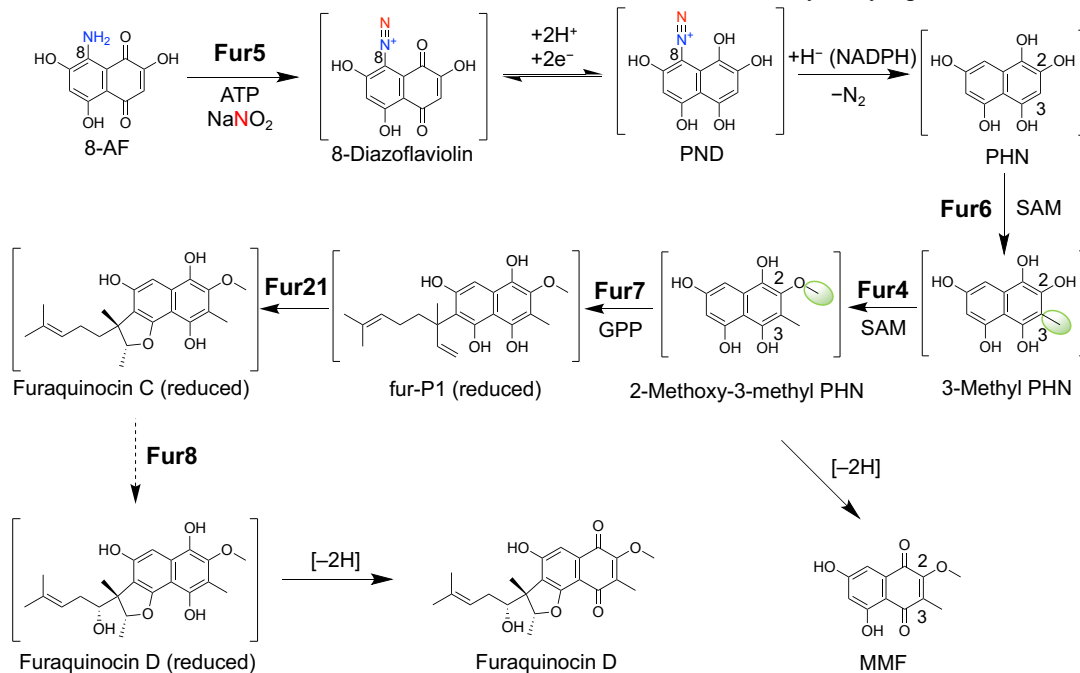


図 3 Fur5 によるジアゾ化を起点とした Furaquinocin の還元的生合成経路

(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。

さらにこうして生成する還元型のFuraquinocinが細胞膜における電子伝達系に関与する可能性を考え、Alcohol dehydrogenaseと呼吸鎖タンパク質Cytochrome Cを用いた還元アッセイを行った。その結果、確かにFuraquinocinが電子メディエーターとして働き、呼吸鎖タンパク質であるCytochrome Cを効率的に還元しうることを示すことができた。

第三章 *Streptomyces antibioticus* B-546におけるFur5ホモログと共脱窒

Streptomyces antibioticus B-546は有機体の窒素原子と亜硝酸由来の窒素原子からなるハイブリッドな窒素ガス(N₂)を生じる共脱窒を行う放線菌である。しかしながら、その共脱窒の実体については不明なままであった。そこで、*S. antibioticus* B-546のゲノム配列を解読したところ、亜硝酸合成酵素カセットFur16,17ホモログとジアゾ化酵素Fur5ホモログが遺伝子クラスターを形成していることを見出した。本菌の共脱窒の様式は、第二章のFur5によるジアゾ化を起点とした還元的脱アミノ化の様式と似ていると考え、Fur5ホモログを破壊して共脱窒への寄与を検証した。

第四章 Naphterpin 生合成に関する研究

8-AF以降のNaphterpinの生合成はこれまでに明らかになっておらず、ヒドロキシ基やプレニル基の転位反応が起こることが予想される。Napyradiomycin生合成においては、電子密度の高い炭素が一時的にプレニル化されたのち、NapH3によって電子密度の低い炭素へとプレニル基が転位される。修士課程の研究におけるCL190株ゲノム中の*naphH3*ホモログの破壊はNaphterpin生産に影響を与えなかったことから、Naphterpinの生合成においては別のプレニル化戦略が存在することが示唆された。しかし、転位反応に関与すると推測されたエポキダーゼホモログ*nphO*を含めた候補遺伝子の破壊はNaphterpin生産に影響を与えなかった。このことから生合成遺伝子クラスター外の未知の酵素がNaphterpinのプレニル基転位に関与していることが示唆された。またFuraquinocinの3位のメチル化酵素*fur6*のホモログである*nphJ*の破壊から*nphJ*がNaphterpinの6位のメチル化に関与していることも明らかにした。さらに、NaphterpinもFuraquinocinと同様に電子メディエーターとして機能することも示した。

総括と今後の展望

本研究では放線菌のメロテルペノイド生合成の全容を明らかにし、酸化的アミノ化を触媒する新規二機能性PLP依存性酵素NphEや、ジアゾ化とそれに続く脱窒素を介した反応機構により新規な窒素代謝に関与するジアゾ化酵素Fur5を見出した。さらにFuraquinocinやNaphterpin生合成を例として、還元的にメロテルペノイドが生合成され、電子メディエーターとして呼吸鎖で機能しうることを示した。今後は新規酵素の構造解析や計算化学による解析によってさらに詳細な反応機構が明らかにされ、天然有機化合物の構造多様性創出システムのさらなる解明や二次代謝の生態系における意義の解明に貢献できると予想される。