

審査の結果の要旨

氏名 野口 智弘

本論文は Furaquinocin や Naphterpin をはじめとした放線菌が生産するメロテルペノイドの生合成機構の解明を目指したものであり、序論、本論（4章からなる）、総括から構成されている。

先行研究では、メロテルペノイドに共通の生合成中間体として 2,5,7,8-Tetrahydroxynaphthalene-1,4-dione (Mompain) と 8-Amino-2,5,7-trihydroxynaphthalene-1,4-dione (8-Amino-flaviolin; 8-AF) が同定されていた。しかしながら、8-AF のアミノ基は最終産物のメロテルペノイドには存在せず、メロテルペノイド生合成におけるアミノ基の導入と除去を担う生体反応の詳細は不明のままであった。

序論では、ピリドキサルリン酸 (PLP) 依存性酵素の性質、酸素を用いる酵素による基質の活性化機構、N-N 結合を有する天然化合物の生合成について記述し、これまでの放線菌のメロテルペノイド生合成研究を概説することで本研究の目的を述べている。

第一章では、Naphterpin 生合成遺伝子クラスター中の 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 の機能を解明している。L-Glu をアミノ基供与体として用いた Mompain から 8-AF への変換反応条件において、NphE 添加と同時に水色に反応液が変化することを見出し、この水色の化合物が Mompain とピリドキサミンリン酸 (PMP) が縮合して生じるキノノイド中間体の PMP-mompain adduct であり、酸素依存的に分解されて 8-AF が生成することで、酸化的アミノ基転移が達成されることを、生化学、計算化学両面からの解析により明らかにしている。さらに AlphaFold v2.0 と MD 計算を組み合わせて PMP-mompain adduct 結合型の NphE ホモ二量体モデルを作成することで、PMP-mompain adduct の認識に関わる残基を特定するとともに、PMP-mompain adduct のアニオン性の高い 3 位の炭素から一電子移動が起こり得ることを示している。

第二章では、Furaquinocin 生合成経路を対象として、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全容を明らかにしている。ジアゾ化酵素 Fur5 が 8-AF のアミノ基を ATP と亜硝酸依存的にジアゾ基に変換することで 8-Diazoflaviolin を生じ、ジアゾ基の導入

によって酸化還元電位が高まることでキノン部分が還元されて 2,4,5,7,8-Pentahydroxynaphthalene-1-diazonium (PND) へと変換されること、次いで、NADPH による PND のヒドリド還元の結果、1,2,4,5,7-Pentahydroxynaphthalene (PHN) が生成することを明らかにしている。8-AF から PHN までの過程はアミノ基が水素原子に置換される還元的脱アミノ化であり、生体内で一般的に観測される酸化的脱アミノ化とは大きく様式が異なっている。この過程で 8-AF と亜硝酸由来のハイブリッドな窒素ガスが発生する共脱窒が起きていることも明らかにし、放線菌における共脱窒の分子基盤を初めて明らかにしている。その後、PHN は、*C*-メチル基転位酵素 Fur6、*O*-メチル基転位酵素 Fur4、プレニル化酵素 Fur7、環化酵素 Fur21 の作用により、還元状態のヒドロキノン型で Furaquinocin に変換されることを明らかにしている。さらに還元型で生合成された Furaquinocin が電子メディエーターとして機能し得ることも示し、呼吸鎖において電子伝達の役割の一端を担っている可能性を示唆した。

第三章ではメロテルペノイド生合成以外においても、Fur5 ホモログによるジアゾ化を起点とした共脱窒現象が観測されるかどうか調べるため、共脱窒を行うことが報告されていた *Streptomyces antibioticus* B-546 の Fur5 ホモログ遺伝子を破壊し、共脱窒への寄与を検証している。

第四章では Naphterpin の生合成研究を行っている。Naphterpin の 6 位のメチル化に関与する酵素 NphJ を同定し、Furaquinocin の 3 位のメチル化を担う Fur6 との基質認識機構の違いについて考察している。また、Naphterpin も電子メディエーターとして機能し得ることも示している。

総括では、PLP 依存性酵素の潜在的な酸素反応性と進化について触れ、NphE の酸素反応能の獲得について考察している。またメロテルペノイド生合成の全容について触れ、酸化的アミノ基転移と還元的脱アミノ化までの共通経路と、その後のメチル化、プレニル化、環化など修飾反応による構造多様化機構についても考察している。さらに呼吸鎖タンパク質の一部をコードする遺伝子がメロテルペノイド生合成遺伝子クラスター近傍に存在することを示し、呼吸鎖においてメロテルペノイドが電子メディエーターとして機能する可能性を考察している。

以上、本研究はメロテルペノイドの還元的生合成の全容を明らかにすると共に、還元的に生合成されるメロテルペノイドの電子メディエーターとしての役割についても解析している。さらに、この生合成過程で機能する共脱窒機構が広く放線菌に分布していることから、環境中の窒素循環における放線菌の役割の一端を担っていることも洞察しており、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（農学）の学位請求論文として合格と認められる。