

## 論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻  
平成 26 年度博士課程進学  
氏 名 松田 研一  
指導教員名 西山 真

### 論文題目

放線菌におけるアミノ基キャリアタンパク質を介して生合成される  
新規天然化合物の探索・発見とその特異な N-N 結合の形成機構に関する研究

アミノ基キャリアタンパク質(Amino group carrier protein; AmCP)は一部の好熱性細菌や、古細菌のリジン・アルギニン生合成で中心的な役割を担うユニークなキャリアタンパク質として私が所属する研究室で発見された。その後 AmCP は放線菌のゲノム中にも見出され、*Streptomyces* sp. SANK 60404 において AmCP (Vzb22)を介した機構によりグルタミン酸から新規アミノ酸(2*S*,6*R*)-diamino-(5*R*,7)-dihydroxy-heptanoic acid (DADH)が生合成されることが明らかとなった。ごく最近、当研究室において DADH を中間体として生合成される新規天然化合物 vazabotide A が発見され、AmCP は放線菌における二次代謝に関わることが示された(ref. 1)。しかしながら放線菌における AmCP の普遍性や AmCP を介して生合成される二次代謝産物の構造多様性は全く未知の状況である。本研究では放線菌における AmCP を介した生合成マシナリーを探索し、その生合成産物の構造多様性を明らかにすることを目的とした。さらにはその探索を通じて発見された新たな二次代謝産物の生合成マシナリーを明らかにすることを目的とした。

### 1. 放線菌における AmCP を介した生合成マシナリーの多様性の探索

当研究室では *Streptomyces* sp. SANK 60404 の他に、*Streptomyces griseus* も AmCP を有することを見出していた。しかし *S. griseus* の AmCP (SGR\_3477)は C 末端の保存配列に差異があり、従来とは異なるタイプの AmCP である可能性が予想された。そこで、放線菌におけるこれら 2 タイプの AmCP の分布を探索するために、Vzb22/SGR\_3477 の保存領域に対してそれぞれプライマーを設計し、これらを用いて 848 株の未同定放線菌のゲノムを鋳型として PCR スクリーニングを行った。その結果、全体の約 7 %にあたる 60 株のゲノムにて AmCP と相同性を示す配列の増幅が確認された。このうち一部の放線菌ゲノムのドラフトシーケンス解析を行った結果、Vzb22 タイプの AmCP 遺伝子を含むクラスターを 12 個見出した。これらクラスターの AmCP 遺伝子の近傍には DADH 生合成遺伝子群

が共通して見出されたが、それ以外の領域は非リボソーム型ペプチド合成酵素(NRPS)をコードする遺伝子が多く存在するという共通の特徴が見出されたものの、存在する NRPS に共通性は無く、それ以外の修飾遺伝子も多様であった。このことから Vzb22 タイプの AmCP 遺伝子を含むクラスター群により、DADH を共通の中間体として多様な化学構造を有する天然化合物群が生合成されることが示唆された(ref. 2)。一方で SGR\_3477 タイプの AmCP 遺伝子を含むクラスターは 9 個見出された。これら AmCP 遺伝子の近傍は Vzb22 タイプとは対照的に保存性が高く、16 個の *orf* からなるクラスターを形成していた。本クラスター中には DADH 生合成遺伝子ホモログの一部しか見出されないことから、DADH とは異なるアミノ酸誘導体の生合成が行われると予想された。以上の探索により、放線菌においては少なくとも 2 種のタイプの AmCP が存在し、一つは DADH の生合成を介して多様な天然化合物の生合成に関与する一方、もう一つは複数の放線菌に保存された新規なアミノ酸誘導体生合成に関与することが明らかとなった。

## 2. AmCP を介して生合成される新規天然化合物 s56-p1 の発見及びその生合成に関する研究

前節で示唆された Vzb22 タイプの AmCP 遺伝子を含むクラスターによって生合成される天然物の構造多様性を検証するため、*Streptomyces* sp. SoC090715LN-17 由来のクラスターに着目し、その生合成産物を探索した。

AmCP 遺伝子を含む約 70 kb の遺伝子領域をクローニングし、異種放線菌 *Streptomyces lividans* TK23 に導入したところ、形質転換体は新たな化合物 s56-p1 を生産した。本化合物

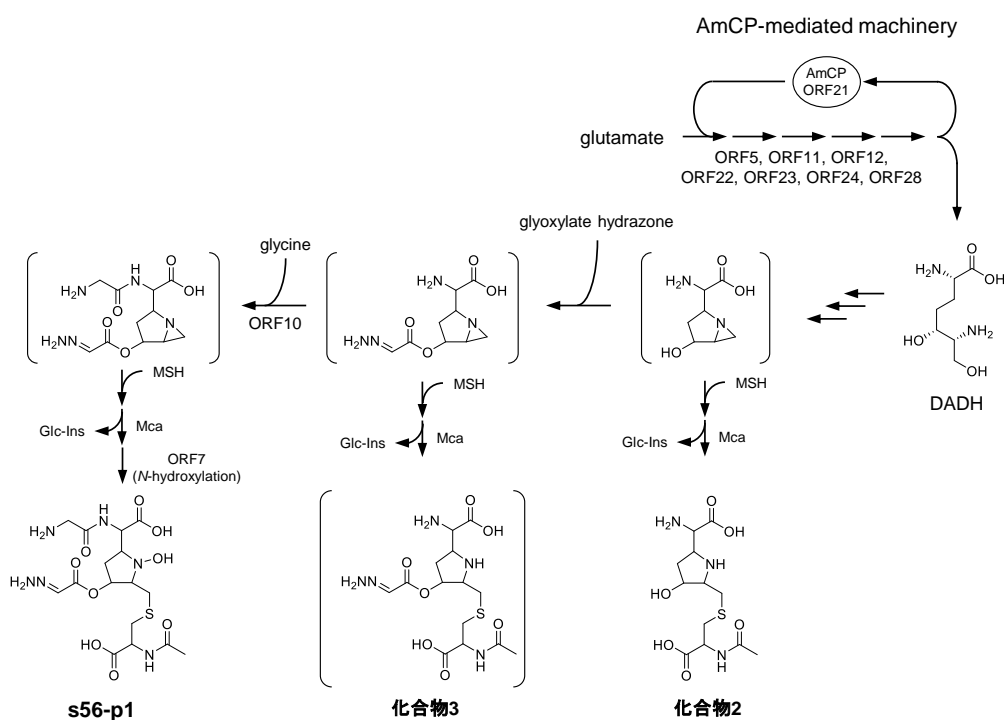


図 1 s56-p1 の予想生合成経路

物の各種 NMR スペクトル分析の結果、これはグリシンと DADH 由来アミノ酸からなる新規ジペプチド化合物であることが明らかとなった(図 1)。興味深いことに、本化合物の DADH 由来アミノ酸骨格はマイコチオール(MSH)に由来すると考えられる *N*-アセチルシステイン残基のほか、天然物としては前例のない glyoxylate hydrazone ユニットによって修飾されていた。これにより AmCP を介して生合成される二次代謝産物の構造多様性の一端が示されただけでなく、DADH 由来アミノ酸が母核となり、その修飾によって多様な化学構造を有する化合物が生み出されていることが明らかとなった。遺伝子破壊株の代謝物分析により、s56-p1 の特異なヒドラゾンユニットの生合成に *orf37-orf44* の領域が関与することが示唆された(ref. 2)。今後、本研究で見いだされた他の菌株の AmCP 遺伝子を含むクラスターの解析により、DADH 母核修飾による更なる化学構造多様性創出機構が明らかにされるものと期待される。

### 3. 新規天然化合物 s56-p1 の特異なヒドラゾンユニットの生合成機構に関する研究

AmCP を介して生合成される二次代謝産物の多様性創出の鍵となるアミノ酸母核の修飾機構の一端を明らかにするため、新規化合物 s56-p1 の特異なヒドラゾンユニットに注目し、その生合成機構の解明を目指した。これまでに N-N 結合を含む天然化合物は 200 種類以上単離されているが、N-N 結合形成機構は未だに解明されていない。このため s56-p1 のヒドラゾンユニットの生合成機構の解明により、未だに報告のない N-N 結合形成を触媒する新規酵素の発見が期待された。

*orf37-orf44* の破壊株においてヒドラゾン生成能の有無を解析したところ、*orf38* と *orf40* の破壊株でヒドラゾン生成能の消失が認められた。そこで組換え酵素を用いた *in vitro* での機能解析を行い、ORF38 が lysine の  $N^6$  位の水酸化活性を有することを明らかにした(図 2)。また ORF38 に加えて methionyl-tRNA 合成酵素と相同性を示す ORF40 を大腸菌で共発現させたところ、lysine と glycine が N-N 結合でつながった特異な新規ヒドラジン化合物(hydrazine 1)の生産が認められた。このことから ORF40 は  $N^6$ -OH lysine と glycine 間の N-N 結合を形成する反応を触媒するものと推測している。さらにグリシン酸化酵素 ORF39 が FAD 依存的に hydrazine 1 をヒドラジノ酢酸(HAA)に変換すること、次いでアシル基転移酵素 ORF43 が HAA にスクシニル基を転移することを、組換え酵素の機能解析により明らかにすることに成功した。

データベース検索の結果、HAA 生合成経路をコードする *orf38*, *orf39*, *orf40* からなる遺伝子カセットは放線菌のみならず低 GC グラム陽性細菌やグラム陰性細菌のゲノムにも幅広く分布しており、*Streptomyces* sp. SoC090715LN-17 において *orf37-orf44* として遺伝子クラスターを構成する *orf37*, *orf41-orf44* とは独立してコードされている場合も多く見られた。またそれらの近傍には *nmps* などの二次代謝関連遺伝子が多く見られることから、今回発見した N-N 結合形成機構は s56-p1 のみならず、他の多くの天然化合物の N-N 結合の形成に関与し、窒素含有化合物の構造(機能)多様性に大きく寄与していると考えられる。

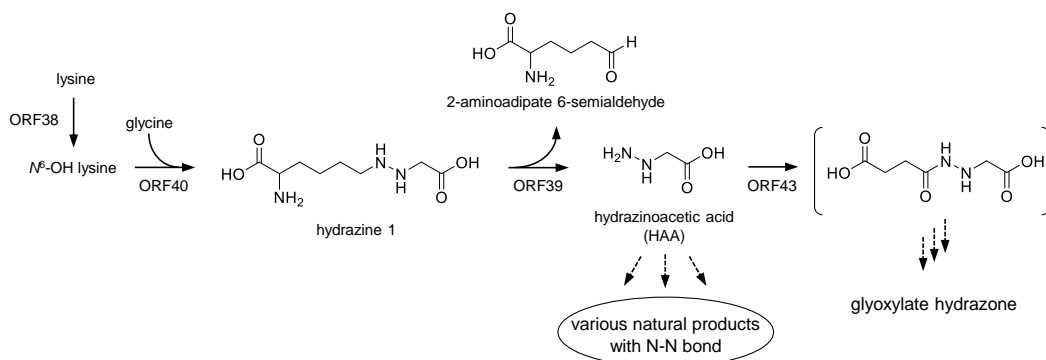


図 2 HAA を介した s56-p1 のヒドラゾンユニットの生合成経路

### 総括

本研究では、放線菌における AmCP を介した生合成マシナリーの普遍性を明らかにするとともに、新規天然化合物 s56-p1 を発見し、AmCP が二次代謝産物の構造多様性を生み出すマシナリーとして機能することを明らかにした。また、s56-p1 の構造から、DADH 由来骨格そのものが構造多様化の母核であることを明らかにした。さらに DADH 由来骨格の特異な修飾構造であるヒドラゾンユニットの生合成機構の解析により、その前駆体と考えられる HAA の生合成経路を明らかにした。また放線菌に限らず他の細菌においても HAA 生合成遺伝子クラスターが保存されていることから、HAA は細菌の天然化合物の構造多様性拡張に寄与する化合物であると推測されると同時に HAA を介して生合成される新規な N-N 結合を有する化合物が未知の機能分子として生物に利用されている可能性が示唆される。本研究で得られた成果は AmCP を指標とした新規生合成経路の探索の最初の成功例として意義深く、今後の探索研究に新たな道筋を方向付けるものと考えている。

### References

- 1) Hasebe, F., Matsuda, K., Shiraishi, T., Futamura, Y., Nakano, T., Tomita, T., Ishigami, K., Taka, H., Mineki, R., Fujimura, T., Osada, H., Kuzuyama, T., and Nishiyama, M. (2016) Amino-group carrier-protein-mediated secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces*. *Nat. Chem. Biol.* **12**, 967–972
- 2) Matsuda, K., Hasebe, F., Shiwa, Y., Kanasaki, Y., Tomita, T., Yoshikawa, H., Shin-ya, K., Kuzuyama, T., and Nishiyama, M. (2016) Genome mining of amino group carrier protein-mediated machinery: discovery and biosynthetic characterization of a natural product with unique hydrazone unit. *ACS Chem. Biol.* in press