

審査の結果の要旨

氏名 松田 研一

キャリアタンパク質は生合成中間体を運搬する小タンパク質であり、多くの生体物質の生合成に関与している。中でも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である。AmCP は放線菌のゲノム中にも見出され、*Streptomyces* sp. SANK 60404 においては 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。また、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明らかにされた。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及び、それによって生合成される化合物の構造多様性を明らかにすることを目指して探索を行い、さらに見出された新規化合物の生合成機構の解析を行ったものである。論文は背景と目的を述べた序論、結果を述べた3つの章、及び総括と展望を記した章からなる。

第二章では、AmCP 遺伝子を有する放線菌株の探索について述べている。*Streptomyces* sp. SANK 60404 由来の AmCP である vzb22 遺伝子に一致する Vzb プライマー、及び AmCP に相同性を示す *Streptomyces griseus* 由来の sgr_3477 遺伝子の保存領域に一致する SGR プライマーをそれぞれ設計し、これらを2種類のプライマーを用いて848株の未同定放線菌ゲノムを鋳型としてPCRスクリーニングを行った。さらに選抜された菌株のドラフトゲノムシーケンス解析により、各株の AmCP 遺伝子の周辺領域を解析した。その結果、Vzb プライマーによって選抜された AmCP 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ことが示唆された。また、SGR プライマーで選抜された AmCP は一定の割合の放線菌に保存されており、DADH とは異なるアミノ酸誘導体を生合成する新規な AmCP マシナリーであることが明らかとなった。以上の探索により、AmCP が天然化合物の構造を多様化する仕組みとして放線菌に広く分布していることが明らかになった。

第三章では、第二章で見出された AmCP 遺伝子を含む機能未知クラスターに着目し、

その生産物の探索を行った。*Streptomyces* sp. SoC090715LN-17 由来の AmCP 遺伝子を含む約 70 kb の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。これを形質転換体培養液から単離し構造解析を行ったところ、s56-p1 は DADH 由来アミノ酸骨格を有する新規ジペプチドであることが明らかとなった。さらにその DADH 由来骨格には天然物としては前例のないヒドラゾンユニットが結合していた。以上の結果から、AmCP によって生合成される天然化合物の構造多様性の一端が示された。さらに遺伝子破壊株の代謝物の分析を通じて、s56-p1 の予想生合成経路を提唱した。

第四章では s56-p1 の DADH 由来アミノ酸骨格の特異な修飾機構である glyoxylate hydrazone ユニットの生合成機構の解析を行った。s56-p1 生合成遺伝子クラスター中の *orf37-orf50* の領域を導入した形質転換体の異種発現とヒドラジン検出(DAB)アッセイにより、N-N 結合形成に関与する遺伝子の探索を行った。各遺伝子破壊株の DAB アッセイの結果、*orf38*, *orf40* が N-N 結合形成に必須であることが明らかとなった。ORF38, ORF40 はそれぞれ lysine N^{δ} monooxygenase, methionyl-tRNA synthetase と相同性を有していた。ORF38 の組み換え酵素の機能解析により、これが実際にリジン N^{δ} 位の水酸化活性を有することが確かめられた。次に ORF40 の機能に関する知見を得るため、*orf40* を *orf38* とともに大腸菌に導入し、代謝物を LC-MS にて分析した。その結果、これら 2 つの遺伝子を発現した大腸菌は未知化合物 A を生産することが明らかとなった。同化合物を単離精製し構造決定を行ったところ、化合物 A はリジンの ϵ -アミノ基とグリシンのアミノ基が N-N 結合でつながった新規化合物であり、hydrazine A と命名した。これにより ORF40 が N^{δ} -OH リジンとグリシン間の N-N 結合形成に関わる新規酵素であることが明らかになった。またグリシン酸化酵素と相同性を示す ORF39 の組み換え酵素の機能解析により、これが FAD 依存的に hydrazine A をヒドラジノ酢酸(HAA)と 2-aminoadipate 6-semialdehyde (AASA)に変換する新規オキシダーゼであることが明らかになった。さらに ORF43 が HAA にスクシニル基を転移する活性を有することを *in vivo*, *in vitro* の実験から明らかにした。また、周辺にコードされた遺伝子がコードする酵素の機能予想から、ORF43 以降の glyoxylate hydrazone ユニットの推定生合成経路を提唱した。*orf38*, *orf39*, *orf40* からなる HAA 生合成経路は放線菌だけでなく、多様な細菌のゲノム上にコードされていたことから、多くの細菌が生体内で N-N 結合を形成するという今までに知られていなかった現象が示唆されるとともに、遺伝子情報に基づいた天然化合物の多様性を拡張する新たな可能性が拓かれた。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。