

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻

平成 22 年度博士課程 入学

氏 名 林 健文

指導教員名 西山 真

論文題目

Studies on the biosynthesis of the C-P compound phosphonothrixin

produced by *Saccharothrix* sp. ST-888

(放線菌 *Saccharothrix* sp. ST-888 の生産する C-P 化合物 phosphonothrixin の
生合成に関する研究)

1959年、HoriguchiとKandatsuはProtozoaからaminoethylphosphonic acidを発見した。この化合物は、炭素とリンとが直接結合したC-P結合という新しい構造を持っており、天然有機化合物の中ではきわめて珍しいものであった。1959年以降、水生生物、地上動物、微生物からもC-P化合物が発見された。そのC-P構造は、生物の生産するリン酸エステルやカルボン酸基と似ていることから、抗菌、抗ガン、抗ウイルス、殺虫、除草、酵素阻害など種々の生物活性を示す。しかも、生物によって分解できないことから、新しい生物活性物質の供給源として注目されてきた。

これまで、C-P化合物の化学合成に関する多くの論文が報告されているが、その生合成研究については限られている。Bialaphos (除草剤)、fosfomycin (抗菌剤)、fosmidomycin (研究用酵素阻害試薬)、phosacetamycin (抗菌物質) は、これまでに生合成経路が判明した天然由来のC-P化合物の例である。それらの生合成の初発段階は共通であり、phosphoenolpyruvate (PEP) が PEP phosphomutase によって C-P 化合物である phosphonopyruvate (PnPy) に変換される。この PEP phosphomutase 反応は、C-P 結合を切断する PEP 生成反応に極端に偏っているため、C-P 化合物生合成において C-P 結合の固定化の

ために重要であり、bialaphos、fosfomycin、phosacetamycinの生合成経路ではPnPy decarboxylaseによるPnPyの脱炭酸反応が、fosmidomycinの生合成経路ではPnPyのカルボニル炭素にアセチル基を付加するcitrate synthase様の不可逆反応が担っている。

Phosphonothrixinは、1995年、Kureha Chemical Industryによって、放線菌*Saccharothrix* sp. ST-888株の培養液から単離され構造決定されたユニークなC-P化合物である。このC-P化合物は、イネ科の雑草や広葉性の雑草の発芽を抑制し、葉にchlorosisを誘発し除草活性を示すことが明らかにされている。これまでに、phosphonothrixinの立体化学を制御した化学合成の報告例はあるものの、その生合成と作用機序に関する報告例はない。本研究の目的は、phosphonothrixin生合成遺伝子クラスターをクローニングし、その機能を解析することで生合成経路と作用機序を明らかにすることである。

1. Phosphonothrixin 生合成遺伝子クラスターの同定

Phosphonothrixinの生産を確認した*Saccharothrix* sp. ST-888株のゲノムDNAを精製し、ドラフトシーケンス解析に供したところ、総コンティグ数 2,822、総コンティグ塩基数 8,605,814 bpのデータが得られた。次に、得られたドラフトシーケンスに対して、fosfomycin生産菌のPEP phosphomutase 遺伝子 (*fomI*) 配列をクエリーとして用いてBLAST検索を行ったところ、*fomI*と有為な相同性を示す一つのオープンリーディングフレーム (orf) を見いだした。そこで、放線菌で複製可能なコスミドベクターである pOJ446 を用いてST-888株のコスミドライブラリーを作製し、*fomI*ホモログを含むコスミドクローンのスクリーニングを行ったところ、3つの陽性コスミドクローン cos-1、cos-11とcos-12が得られた。次に、それぞれのコスミドを*Streptomyces albus* G153に導入し異種発現を試みた。各形質転換株の培養液を³¹P NMRで分析した結果、cos-11とcos-12のいずれのコスミドを導入した形質転換体においてもphosphonothrixinの生産を確認することができたことから、cos-11とcos-12がphosphonothrixinの生合成に必要な全ての遺伝子を含むと判断した。そこで次に、cos-12のシーケンスを詳細に解析したところ、cos-12にはPEP phosphomutase (orf24)を含む35個のorfが存在することが判明した。

2. Phosphonothrixin 生合成遺伝子クラスター最小単位の決定

次いでphosphonothrixin生合成遺伝子クラスターの最小単位を決定するため、λREDとCre-loxPを利用してcos-12中の複数の遺伝子を欠失したコスミドを作製した。orf1からorf24を含むコスミド(orf1-24と省略し、以後同様に記載する)、orf1-26、orf1-27、orf13-34、orf20-34、orf21-34、orf22-34の7種類のコスミドをそれぞれ*S. albus* G153に導入し、得られた各形質転換体の培養産物をLC-MSと³¹P NMRを用いて分析した。その結果、orf13-34、orf20-34、orf21-34を含むコスミドを保持する形質転換体においてはphosphonothrixinの生産が確認できた一方で、orf1-24、orf1-26、orf1-27、orf22-34を含むコスミドを保持する形質転換体においてはphosphonothrixinは検出されなかった。また、cos-12から、orf25-26、orf27、orf28、orf29、orf30、orf31、orf32、orf33の各遺伝子を欠失したコスミドを保持する形質転換体においてもphosphonothrixinの生産性が失われている。

た。さらに、orf22、orf23、orf34 を単独で破壊した場合には、生産量は大きく減少するものの phosphonothrixin の生産は確認できた。以上の結果を統合し、orf21 から orf33 を phosphonothrixin 生合成遺伝子クラスターと考えた (図 1)。

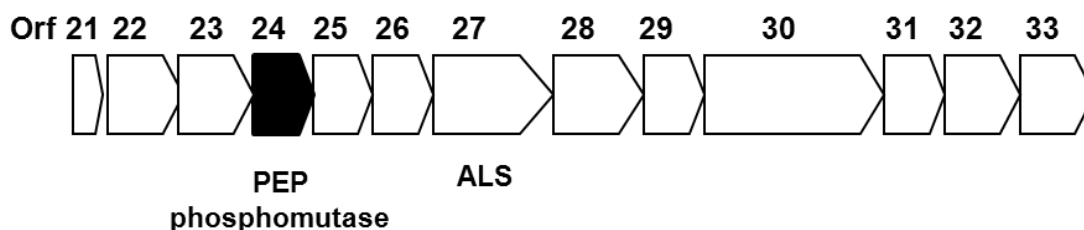


図 1. Phosphonothrixin 生合成遺伝子クラスター

3. Phosphonothrixin 生合成酵素遺伝子 orf30 の機能解析

遺伝子破壊した各種コスミドを保持する形質転換株の解析により、ORF30 は phosphonothrixin 生産に必須であることが明らかになった。興味深いことに、この ORF30 には non-ribosomal protein synthetase (NRPS) の adenylation domain と D-3-phosphoglycerate dehydrogenase と高い相同性を示す二つのドメインが存在しており、多機能酵素であることが推定された。さらに、*S. albus*/orf30del 株 (cos-12 から orf30 のみを破壊したコスミドを保持する *S. albus*) の培養産物を ^{31}P NMR で解析したところ、phosphonothrixin とその一連の中間体の生産性が失われたことから、orf30 がコードするタンパク質は PnPy を基質として、phosphonothrixin 生合成の第二段階目の反応を担う酵素であると推定した。この推定を検証するため、ORF30 の組換え酵素を精製して、酵素活性の検出を試みた。その結果、組換え ORF30 が NADH を還元剤として用いて PnPy を還元し 2-hydroxy-3-phosphonopropanoic acid (HPPA) を生成することが判明した。また、ORF30 が、PEP phosphomutase と ORF30 とのカップリング反応により、PEP を HPPA に変換することができることを証明した。以上の結果は、ORF30 が phosphonothrixin 生合成の第二段階目の反応を担う生合成酵素であること、phosphonothrixin 生合成の第二段階目の反応は既知の天然 C-P 化合物生合成経路のそれらとは異なる新規反応によって進行することを強く示唆している。さらには、ORF30 が ATP 存在下 L-threonine をアデニル化する活性も検出できたことから、ORF30 は確かに多機能酵素であることを示すことができた。

4. Phosphonothrixin の抗菌アッセイ試験

Phosphonothrixin はイネ科植物の発芽抑制試験のスクリーニングによって同定された化合物であり、これまで *Escherichia coli* や *Bacillus subtilis* などに対して抗菌活性は示さないと報告されていた。したがって、phosphonothrixin の標的酵素は植物に特有の代謝酵素と考えられてきた。しかしながら、ORF27 がコードすると推定した acetolactate synthase (ALS) の反応産物である (S)-2-ethyl-2-hydroxy-3-oxobutanoic acid の構造が、phosphonothrixin の構造と立体化学も含めて類似していること、ST-888 株のゲノム上には ORF27 以外にもう一

つの ALS 遺伝子を見つけることができることから、ORF27 は phosphonothrixin に対する自己耐性遺伝子であり、phosphonothrixin の標的酵素は ALS であるという仮説を立てた。ALS は、通常、微生物と植物において、valine、leucine、isoleucine 生合成の初発段階に機能することから、上記の仮説が正しければ、phosphonothrixin は抗菌活性を示すと考えられる。そこで、*E. coli* $\Delta tolC$ 株と *B. subtilis* 168 株に対して、最小培地を用いて ST-888 株培養上清の抗菌アッセイ試験を行った。その結果、phosphonothrixin を含む ST-888 株培養上清は両菌株に対して抗菌活性を示した。さらには、*B. subtilis* 168 株に対する抗菌活性は valine、leucine、isoleucine の添加で抑制された。以上の結果から、phosphonothrixin の標的酵素は分枝鎖アミノ酸生合成経路の初発反応を担う酵素 ALS であることが示唆された。

5. 総括

本研究では、相同検索、遺伝子破壊、異種発現、 ^{31}P NMR 解析により phosphonothrixin 生合成遺伝子クラスターを初めて同定することに成功した。また、大腸菌で phosphonothrixin 生合成遺伝子を発現させ、精製した組換え酵素を用いて酵素反応を検出し、phosphonothrixin 生合成経路の第一段階目の PEP phosphomutase 反応に続く第二段階目の PnPy dehydrogenase 反応を明らかにするとともに、各 orf の相同性検索の結果から、phosphonothrixin の生合成経路を図 2 のように提案した。さらには、phosphonothrixin が、おそらくは ALS を阻害することで抗菌活性を示すことを見出した。本研究で得た知見は phosphonothrixin 生合成経路の全容解明につながるものと期待される。

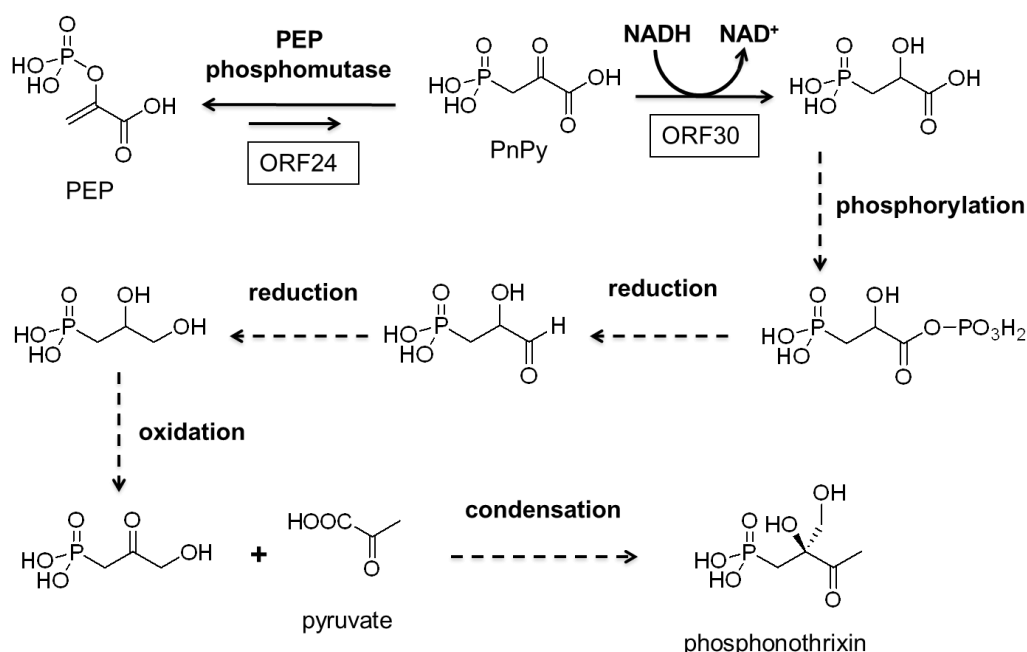


図 2. Phosphonothrixin の推定生合成経路