論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻 平成 23 年度博士課程 進学 氏 名 長谷部 文人 指導教員名 西山 真

論文題目

放線菌におけるアミノ基保護キャリアタンパク質を介する 二次代謝産物の生合成機構に関する研究

第1章 序論

アミノ酸はタンパク質の構成成分であり生物にとって必須な栄養素である。また、うま味調味料、飼料添加物、サプリメント、人工甘味料、化成品、化粧品など我々の身の回りにおいて様々な用途で活用されている。さらにペニシリンなど生理活性物質の生合成にも利用されており、医薬品を含む天然化合物の創出においても重要な構成成分となっている。現在多くのアミノ酸は微生物発酵法を用いて生産されており、微生物の代謝・制御・物質輸送についての知見はアミノ酸生産分野のみならず人類の生活環境の発展に重要であると考えられる。ゲノム解析技術の発達により様々な微生物のゲノム情報は明らかとなっているが、機能未知な遺伝子は存在し、依然として微生物には謎が潜んでいる。この機能未知な遺伝子の中には新規アミノ酸の生合成に関わる遺伝子が存在している可能性も考えられる。近年、スクリーニングにより新規に発見される天然化合物の種類が減少しつつあるが、新規なアミノ酸を発見することが出来ればこれを中間体として創出される新規な天然化合物群も見出せることが期待される。

当研究室において高度好熱菌 Thermus thermophilus がアミノ基保護キャリアタンパク質(LysW)を用いる全く新しい機構でリジンを生合成系することが見出されている(図 1)。一方、放線菌は一般的な細菌と同様に LysW を介さない経路でリジンを生合成することが知られているが、多くの放線菌において、lysW ホモログがゲノムに存在することが明らかになりつつある。このことは LysW ホモログがリジン生合成以外の代謝に関わることを示唆している。本論文で、私は放線菌 Streptomyces sp. SANK 60404 の LysW ホモログに注目し、それが関わる二次代謝産物の同定および生合成機構の解明を目指して研究を行った。

図 1: T. thermophilus における LysW を介するリジンの生合成経路

第2章 Streptomyces sp. SANK 60404 におけるアミノ基保護

キャリアタンパク質を介した非天然アミノ酸 X の生合成機構 Streptomyces sp. SANK 60404(以下 SANK 60404)のゲノム上には、アミノ 基保護キャリアタンパク質を介するリジン生合成酵素のホモログ遺伝子群 ("IysW", "IysX", "IysZ", "IysY", "IysK")が存在し、その近傍には non-ribosomal peptide synthetase (NRPS)をコードすると推測される遺伝子が見出された。私はこのホモログ遺伝子群が NRPS に利用される新規の非天然型アミノ酸 X の生合成に関与すると予想し、研究を行った。

T. thermophilus のリジン生合成では、まずキャリアタンパク質 LysW に AAA がロードされる。そして側鎖が修飾を受け、リジン側鎖が完成した後に LysW が切り離されリジンが遊離する(図 1)。そこで、"LysW"が関わる生合成において、"LysW"に何のアミノ酸がロードされるか、そして"LysW"から切り離される前の中間体(新規アミノ酸 X)の構造が如何なるものかを明らかにするために、"*IysZ*"破壊株と"*IysK*"破壊株を作製し、"LysW"の C 末端に共有結合したまま蓄積した生合成中間体の構造を決定することにした。C 末端領域の MS/MS 解析を容易にするために Q44R に改変し、N 末端に Strep・tag を付加した"LysW"(Q44R)をこれらの破壊株に大量発現させた。これらを精製した後に、トリプシンによって生じた C 末端断片について MALDI-TOF-MS/MS 分析を行った。その結果、"*IysZ*"破壊株由来の"LysW"には C 末端にグルタミン酸が付加していた。この結果から、"LysK"がグルタミン酸を"LysW"の C 末端に付加することが示された。一方、"*IysK*"破壊株由来の"LysW"の C 末端には、既存のアミノ酸とは異なる分子量を有するアミノ酸 X が付加されていることが

明らかとなった。Xの組成式はMS分析から $C_7H_{16}N_2O_4$ と推測された。

Xの組成式がグルタミン酸($C_5H_9NO_4$)より C_2H_7N 分増加していることから、炭素鎖長を伸ばす反応とアミノ基転移反応を担う酵素が X の生合成に関与していると考えた。"IysW"の周辺領域を探索した結果、炭素鎖伸長反応を担う候補として Transketolase ホモログ("TK-N", "TK-C")を、アミノ基転移反応を担う候補として Transaminase ホモログ("TA")をコードする遺伝子を見出した。そこで X の生合成に必要と考えられる組換え酵素("LysW", "LysX", "LysZ", "LysY", "TK-N", "TK-C", "TA")を大腸菌を用いて調製し、必要と考えられる補酵素・基質と共に反応を行ったところ、X が付加した"LysW"の生成を確認した。これらの結果から、X の生合成経路が図 X のようであることが考えられた。

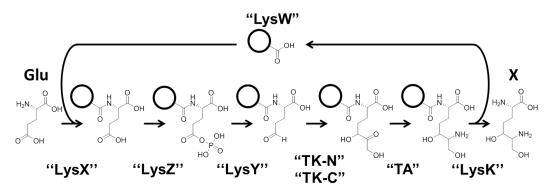


図 2: 非天然アミノ酸 X の推定生合成経路図

第3章 新規アミノ酸 X の大腸菌での異種生産系の確立と構造決定

第2章において SANK 60404 がリジン生合成ホモログクラスターを用いて X を生合成していること、およびこれに必要な酵素群を明らかにした。この X の構造を決定するために大腸菌内でこれらの酵素を共発現させることにより X の大量生産を試みた。大腸菌に内在する ArgD が反応中間体をオルニチンへと変換してしまうことが示唆されたために、argD 破壊株を作製し、これを宿主として X の生合成に必要な酵素群を共発現する株を取得した。培養上清を LC-MS で分析したところ、X と同じ分子量を示す化合物の生産が確認出来た。後述するように大腸菌において生産されたこの化合物が SANK 60404 の "lysk"破壊株での添加実験よりある天然化合物へ変換されたことから、これが生合成中間体であることが明らかになったため、X の分取・精製を行い、NMR により構造を決定した。さらに NMR データ、化学修飾及び新モッシャー法を 用いて 絶対 立体配置を 決定し、X が 新規 アミノ酸 (2S,6S)diamino-(5R,7)dihydroxy-heptanoic acid であることを明らかにした。

第4章 新規アミノ酸 X を中間体とする天然化合物の探索と構造決定

上述したように SANK 60404 の"*lysW*"遺伝子近傍には NRPS が含まれていることから、SANK 60404 においては、新規アミノ酸 X を用いて生合成されるペプチド系の天然化合物が存在することが考えられた。これを探索するために、X の添加・非添加条件で野生株および"*lysK*"破壊株を培養し、その培養上清を LC-MS で分析した。その結果、"*lysK*"破壊株に X を添加した場合に生産が回復する天然化合物を見出した。この化合物の分取・精製を行い、構造を決定した。NMR データから、この化合物がバリンとピペリジン環構造を有するアミノ酸からなるジペプチドであることを明らかにした(図 3)。

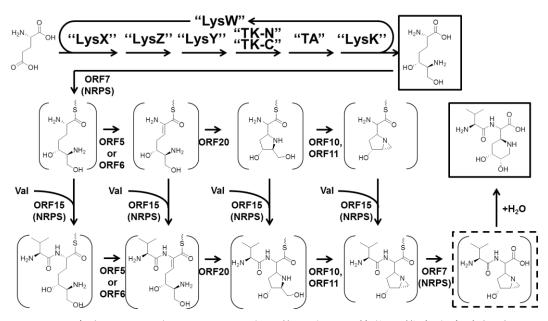


図 3: 新規アミノ酸 X とこれを中間体とする天然物の推定生合成経路 黒枠:構造決定を行った化合物 黒破線: MS でのみ検出されている化合物の推定構造

総括

本研究では、放線菌がアミノ基保護キャリアタンパク質を介して新規アミノ酸(2S,6S)diamino-(5R,7)dihydroxy-heptanoic acid を生合成していること、およびこの新規アミノ酸を中間体として新規天然化合物を生合成することを明らかにした。また、アミノ基保護キャリアタンパク質が一次代謝に加えて二次代謝にも関与し、天然化合物の構造多様性を創出する機構の 1 つとして生物に組み込まれていることを示すことが出来た。本研究は、新規天然化合物の生合成機構を解明する一助になると同時に、未だ単離例が極めて少ないアザビシクロ環含有天然化合物のリソースの拡充に寄与するものと考えている。