

# 博士論文(要約)

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

長谷部 文人

# 博士論文

## 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

東京大学大学院 農学生命科学研究科  
応用生命工学専攻 平成 23 年度進学

長谷部 文人

指導教員  
生物生産工学研究センター 細胞機能工学部門 教授

西山 真

## 目次

目次	2
略語一覧	3
第 1 章 序論	5
1-1 アミノ酸	5
1-2 高度好熱菌 <i>Thermus thermophilus</i> のリジン生合成経路	8
1-3 キャリアタンパク質を利用した生合成	10
1-4 遺伝子情報と二次代謝産物	16
1-5 本研究の目的および本論文の構成	18
第 2 章 インターネット公表出来ないために削除	19
第 3 章 インターネット公表出来ないために削除	19
第 4 章 インターネット公表出来ないために削除	19
第 5 章 インターネット公表出来ないために削除	19
実験項	20
参考文献	30
謝辞	37

## 略語一覧

AAA	$\alpha$ -Aminoadipic acid
Amp	Ampicillin
Apr	Apramycin
APS	Ammonium persulfate
ATP	Adenosine triphosphate
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
CoA	Coenzyme A
Cm	Chloramphenicol
DAP	Diaminopimelic acid
DADH	インターネット公表出来ないために削除
DMSO	Dimethyl sulfoxide
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
MeOH	Methanol
Km	Kanamycin
PLP	Pyridoxal phosphate
SDS	Sodium dodecylsulfate
Sp	Spectinomycin
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylethylenediamine
TPP	Thiamin pyrophosphate
Tricine	<i>N</i> -[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycine
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethane
COSY	Correlate spectroscopy
ESI	Electrospray ionization
HMBC	$^1\text{H}$ -detected heteronuclear multiple bond correlation
HPLC	High performance liquid chromatography
HSQC	$^1\text{H}$ -detected heteronuclear single quantum coherence
LC	Liquid chromatography
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MS	Mass spectrometry
NMR	Nuclear magnetic resonance
NOESY	2-D nuclear Overhauser effect spectroscopy

PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	Polymerase chain reaction
TOF	Time of flight
A	Adenylation domain
ACP	Acyl carrier protein
AL	Acyl-CoA ligase
AT	Acyltransferase
C	Condensation domain
DH	Dehydrase
ER	Enoylreductase
KR	Ketoreductase
KS	Ketosynthase
MCS	Multiple cloning site
NRPS	Nonribosomal peptide synthetase
PCP	Peptidyl carrier protein
PKS	Polyketide synthase
PPTase	Phosphopantetheinyltransferase
RBS	Ribosomal binding site
SD	Shine-Dalgarno
ST	Strep · tag
TA	Transaminase
TE	Thioesterase domain
TK	Transketolase
TK-N	Transketolase N-terminal domain
TK-C	Transketolase C-terminal domain
<i>S. albus</i>	<i>Streptomyces albus</i> G153
SANK 60404	<i>Streptomyces</i> sp. SANK 60404
<i>S. griseus</i>	<i>Streptomyces griseus</i> IFO13350
<i>S. lividans</i>	<i>Streptomyces lividans</i> TK23
<i>S. sahachiroi</i>	<i>Streptomyces sahachiroi</i> NBRC13928



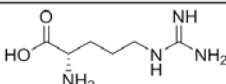
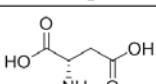
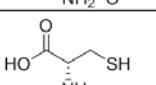
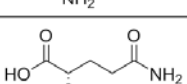
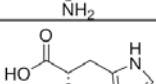
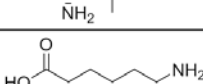
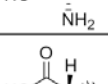
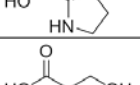
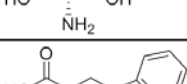
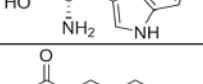
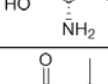
## 第1章 序論

### 1-1 アミノ酸

アミノ酸は同じ分子の中にアミノ基とカルボキシル基を持つ化合物であり、 $\alpha$ -アミノ酸はタンパク質の構成成分である以外にもヌクレオチド、補酵素、ヘム、ホルモン、神経伝達物質、グルタチオンなど重要な窒素化合物の原料でもある。 $\alpha$ -アミノ酸であるグルタミン酸、アスパラギン酸、グリシン、D-セリンや $\gamma$ -アミノ酸である $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)はそのままの形で神経伝達物質として使われる。微生物の生産する化合物では Alexander Fleming によって発見され、近代医学に化学療法という方向性をもたらす結果となったペニシリンも $\alpha$ -アミノ酸[ $\alpha$ -aminoadipic acid (AAA), Cys, Val]由来の化合物である。また、グルタミン酸ナトリウムはうま味の成分として、アスパラギン酸とフェニルアラニンからなるアスパルテームは人工甘味料として利用されており、ヒトの味覚にもアミノ酸は関与している。このようにアミノ酸は生命を維持するのに重要な構成成分であるだけでなく、ヒト等の生命が活動するのに有益な機能を有する化合物の構成成分にもなっている(1-3)。

アミノ酸が商品として最初に開発されたのはグルタミン酸ナトリウムであり、これは 1908 年に東京帝国大学の池田菊苗によって昆布のうま味成分として発見され、小麦グルテン等からの酸加水分解により 1960 年頃まで工業生産が行われていた。しかし、このタンパク質分解法は原料や設備の点で課題を抱えていた。そこで、この課題を解決できる新しい製法として化学合成法や発酵法が開発された。化学合成法によるグルタミン酸生産は確立され、利用されていた時期もあったが、原料に石油を用いることによる消費者の印象の悪化および発酵法に用いる原料の低コスト化から、次第に下火になっていった。一方、微生物発酵法は協和産業(当時)の鵜高重三がグルタミン酸を大量に生産する *Corynebacterium glutamicum* を発見したのを受け、木下祝朗らによって同菌を用いて工業レベルでグルタミン酸生産が開発された。現在では様々な製法を併用してアミノ酸は生産されているが、多くのアミノ酸は発酵法を用いて生産されている(表 1-1)(4,5)。

表 1-1 アミノ酸の生産方法および生産菌例一覧

	生産手法	生産菌
 <b>(G, Gly)</b>	化学合成	—
 <b>(A, Ala)</b>	化学合成、酵素反応法	<i>Pseudomonas dacunhae</i>
 <b>(R, Arg)</b>	直接発酵法	<i>C. glutamicum</i> ( <i>C. acetoacidophilum</i> ); <i>Brevibacterium flavum</i> ; <i>E. coli</i>
 <b>(D, Asp)</b>	酵素反応法	<i>E. coli</i>
 <b>(C, Cys)</b>	タンパク質分解法、酵素反応法	<i>E. coli</i>
 <b>(E, Glu)</b>	直接発酵法	<i>C. glutamicum</i>
 <b>(Q, Gln)</b>	直接発酵法	<i>C. glutamicum</i>
 <b>(H, His)</b>	直接発酵法	<i>Brevibacterium flavum</i>
 <b>(I, Ile)</b>	直接発酵法	<i>C. glutamicum</i> ; <i>E. coli</i> H-8461
 <b>(L, Leu)</b>	直接発酵法、タンパク質分解法	<i>Brevibacterium flavum</i> ; <i>E. coli</i>
 <b>(K, Lys)</b>	直接発酵法	<i>C. glutamicum</i>
 <b>(P, Pro)</b>	タンパク質分解法、直接発酵法	<i>Brevibacterium flavum</i> ; <i>E. coli</i>
 <b>(S, Ser)</b>	タンパク質分解法、直接発酵法	<i>Methylobacterium</i> sp.
 <b>(W, Trp)</b>	直接発酵法、酵素反応法	<i>E. coli</i> ; <i>C. glutamicum</i> ; <i>Bacillus</i> sp.
 <b>(Y, Tyr)</b>	タンパク質分解法、直接発酵法	<i>E. coli</i>
 <b>(V, Val)</b>	直接発酵法、酵素反応法	<i>E. coli</i> ; <i>C. glutamicum</i> ; <i>Brevibacterium flavum</i>

Ivanov, K., Stoimenova, A., Obreshkova, D. & Saso, L. BIOTECHNOLOGY IN THE PRODUCTION OF PHARMACEUTICAL INDUSTRY INGREDIENTS: AMINO ACIDS. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 27, 3620-3626 (2013).

このアミノ酸発酵の成功は、微生物が有する一連の代謝反応経路を、我々の目的に向かって最も合理的に活動させ、その結果得られる生産物を利用しようとする代謝制御発酵という重要な概念を生み出し、これが現在の代謝工学・生合成工学の基礎となっている。アミノ酸発酵の研究によって、アミノ酸の大量生産が実現されたとともに、アミノ酸生合成・生産における制御機構の存在が明らかとなった。グルタミン酸発酵についての研究から、その大量生産を可能にしている理由として、①グルタミン酸の細胞内での前駆体である **2-Oxoglutaric acid (2-OG)** をグルタミン酸ではなくスクシニル **CoA** へと変換する **Oxoglutarate dehydrogenase complex (ODHC)** が大量生産培地条件において翻訳後修飾を受けることにより活性が著しく低下すること(6)、②浸透圧の変化を感知して細胞外へのグルタミン酸の排出を調節するメカノセンシティブチャネルに変異が導入されることによって調節機構が常時排出へと偏ること(7)などが明らかとなった。また、リジン発酵についての研究から、① **Aspartate kinase (AK)** というリジン生合成における初発酵素がリジンとスレオニンによって協奏的にフィードバック阻害されること(8)、②リジンアナログである **(S)-2-Aminoethyl-Cysteine (AEC)** 耐性菌のスクリーニングから、その阻害が解除された株を用いて生産が可能になること(9,10)、③ **AK** の結晶構造解析によるその阻害機構の詳細(11)などが明らかになっている。

また、近年の研究からこのリジン生合成経路が種によって異なり、多様な経路の存在が明らかとなった。

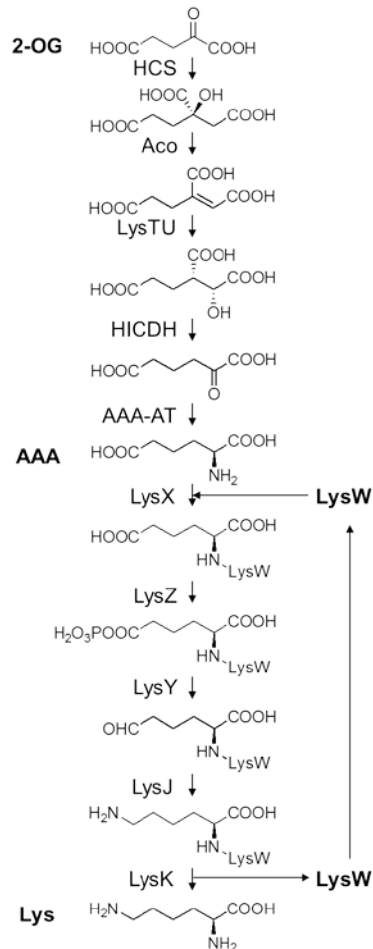


## 1-2 高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* のリジン生合成経路

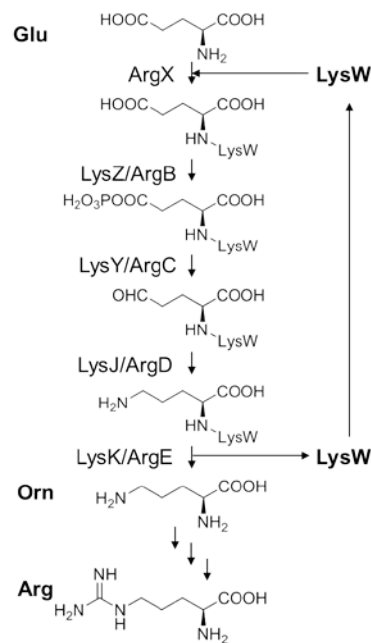
一般的にバクテリアや植物はアスパラギン酸を出発原料とし Diaminopimelic acid (DAP) を経由してリジンを生合成する(12,13)。また、カビや酵母は DAP を経ずに 2-OG から AAA、さらにはサッカロピンを経る AAA 経路でリジンを生合成する(14-16)。しかしながらこれまでの当研究室の研究により高度好熱菌 *T. thermophilus* はバクテリアでありながら DAP ではなく AAA を経由してリジンを生合成することが明らかになっている(17-21)。また、その新規 AAA 経路においても AAA までの前半の経路はカビや酵母の AAA 経路と同様であるものの、AAA からリジンへの変換はアルギニン生合成経路の酵素と相同性を有する酵素群(LysX、LysZ、LysY、LysJ、LysK)によって行われる(22-24)。このリジン生合成後半の変換では、僅か 54 アミノ酸残基からなる LysW が AAA のアミノ基の保護基として機能しながら反応が進行する(図 1-1)(25)。

LysW は C 末端に EDWGE という高度に保存されたモチーフを有し、表面が負に帯電したタンパク質である。LysX は ATP 依存的に AAA の  $\alpha$ -アミノ基と LysW の Glu54 の  $\gamma$ -カルボキシル基とでイソペプチド結合を形成し LysW-AAA を生成する。LysZ は AAA 側鎖の  $\delta$ -カルボキシル基をリン酸化し、LysY はこれを還元して LysW-AAA semialdehyde を生成する。LysJ はこれに対してアミノ基転移反応を行い、LysW-リジンへと変換する。最後に、LysK がイソペプチド結合を切断し、リジンと LysW が放出される。当生合成システムにおいて各酵素の触媒残基周辺領域は正電荷を帯びており、LysW と静電相互作用することにより効率的な反応が出来る。このように LysW を介した生合成システムにおいて LysW は上述した基質アミノ基の保護基として機能する以外に、効率の良い反応を起こすために各生合成酵素に基質を運ぶキャリアタンパク質として機能する。このリジン生合成に類似したシステムは様々な生物種に見出されつつあり、最近では同様なシステムが古細菌 *Sulfolobus* 属のリジン・アルギニン生合成にも関与していることが明らかとなっている(26)。*Sulfolobus* 属においては、そのゲノム上に LysX ホモログが 2 つ存在する。1 つ(ArgX)は Glu を認識し、もう片方(LysX)は AAA を認識して、ゲノム上に 1 つの LysW とそれぞれの基質とを結合させ、以降の酵素が bifunctional に働くことによって、アルギニン生合成における中間体であるオルニチンとリジンを生合成する。したがって、LysW を介するシステムは全く新しい物質変換システムを提示するとともに、生物さらには代謝の多様性創出の機構に関与することが予想された。

### *T. thermophilus*のリジン合成



### *Sulfolobus*属のアルギニン合成



### バクテリアのアルギニン合成

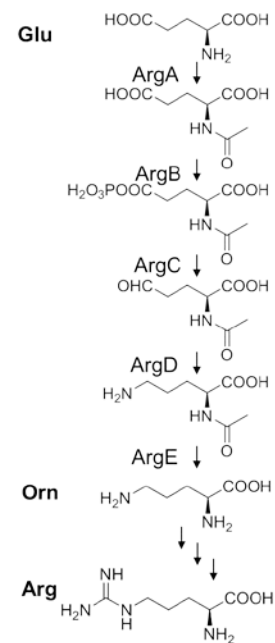


図 1-1 塩基性アミノ酸合成経路図

HCS; Homocitrate synthase, Aco; Homoaconitase, LysTU; Homoaconitase, HICDH; Homoisocitrate dehydrogenase, AAA-AT; α-aminodipate aminotransferase, バクテリアのアルギニン合成の中には、ArgE のかわりに ArgJ を有し、これがアセチル基をグルタミン酸に転移させる活性を有するものもある。

### 1-3 キャリアタンパク質を利用した生合成

LysW は化合物のアミノ基に結合し、生合成を効率よく進める新規なキャリアタンパク質である。一方、化合物のカルボキシル基に結合し、生合成を効率よく進めるキャリアタンパク質は、天然化合物の生合成に深く関わっており、脂肪酸合成酵素、ポリケタイド合成酵素、ペプチド合成酵素に見出され、化合物の多様性創出を担っている(27,28)。

脂肪酸合成は Fatty acid synthase (FAS)が、ポリケタイド合成は Polyketide Synthase (PKS)が担い、両者はホモログの関係にある。FAS、PKS は複数のドメインが反応に関わり、代表例として Acyl carrier protein (ACP)、Acyltransferase (AT)、Ketosynthase (KS)、Ketoreductase (KR)、Dehydrase (DH)、Enoylreductase (ER)、Thioesterase (TE)ドメインなどが知られている(29)。キャリアタンパク質として用いられている ACP ドメインは表面が負電荷を帯びており、翻訳後に Ser 残基が Phosphopantetheinyltransferase (PPTase) によって phosphopantetheinyl 化されてホロ型になる(図 1-2) (30)。AT ドメインは acyl-CoA からアシル基を、ACP の phosphopantetheinyl 基へとチオエステル結合を形成するように転移する(図 1-3)。

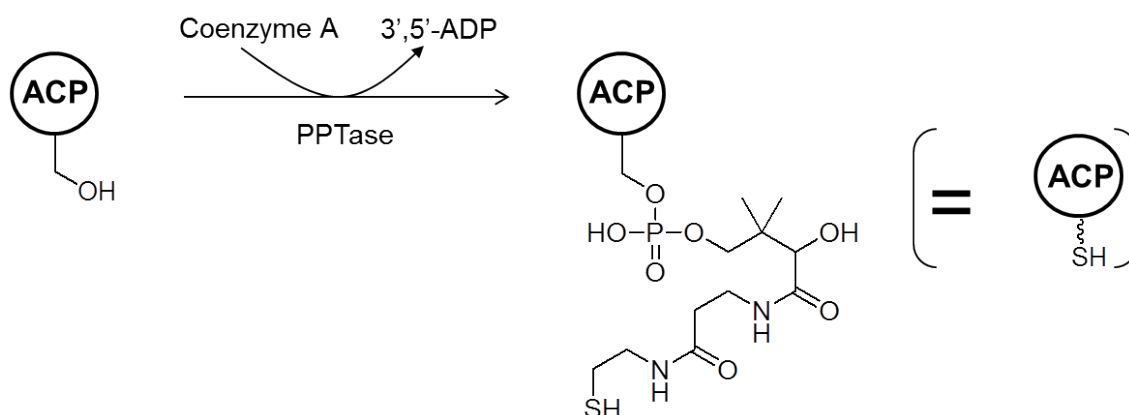


図 1-2 ACP の PPTase による phosphopantetheinyl 化

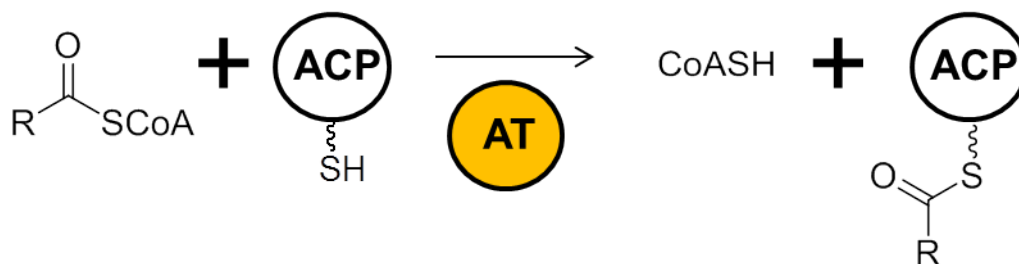


図 1-3 AT ドメインによる反応

KS ドメインは、malonyl-S-ACP, methylmalonyl-S-ACP, ethylmalonyl-S-ACP などの脱炭酸を誘導する反応(図 1-4-a)、ACP に保持されているアシル基を自身のシステイン残基へと転移する反応(図 1-4-b)、自身のシステイン残基に保持したアシル基を転移する反応を行う(図 1-4-c)。

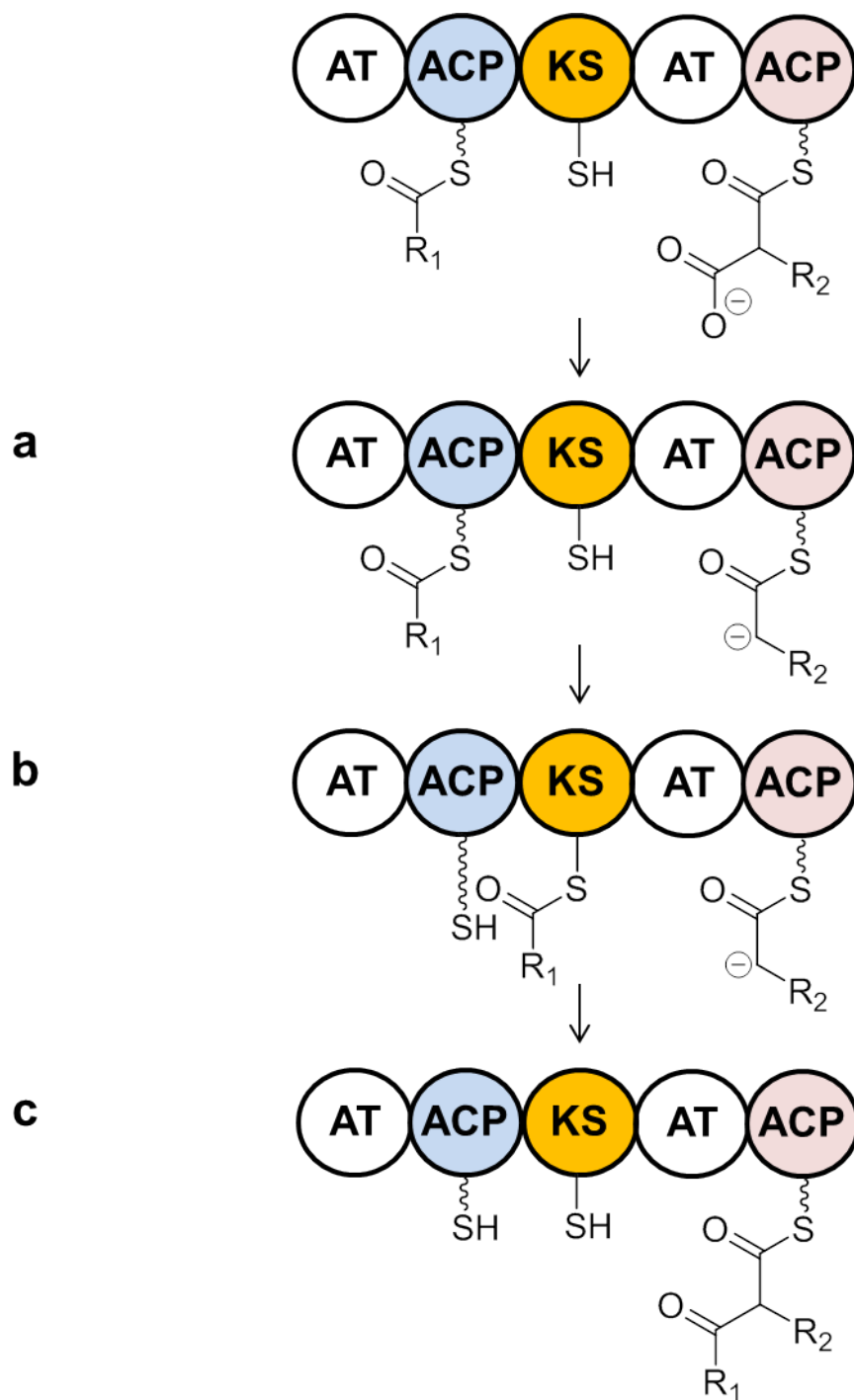


図 1-4 KS ドメインによる反応

KR ドメインは ACP に保持されたケトンの還元により水酸基を生じ、DH ドメインはこの水酸基の脱水により二重結合を生じ、ER ドメインはその二重結合を還元して単結合を生じる。TE ドメインは、反応の最後を担い ACP から脂肪酸やポリケタイドを切り離す活性を有する(図 1-5)。PKS は I 型、II 型、III 型の分類が存在する。複数のドメインが一つのタンパク質上に連結して存在している PKS を I 型、この複数のドメインが個々のサブユニットに別れて存在している PKS を II 型と分類されている。III 型は ACP を用いない PKS で、KS ドメインのみから構成される。生合成は N 末端にあるドメインから開始され、C 末端の終結反応を担うドメインに来るまで順番に反応が進行する。PKS による化合物の多様性は、AT ドメインが認識する基質の多様性、反応に関与する各ドメインの数、種類および順序によって創出される。

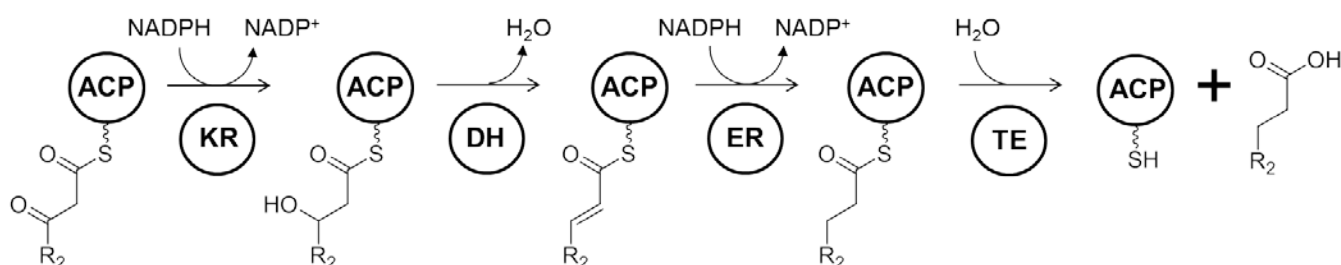


図 1-5 KR, DH, ER, TE ドメインによる反応

キャリアタンパク質を用いるペプチドの生合成は、Nonribosomal peptide synthetase (NRPS)が担う。これはその名の通りリボソームを経由しないでペプチドをアミノ酸から合成する酵素であり、複数の触媒ドメインを持つモジュールを、1 つないし複数持つタンパク質サブユニットからなる。NRPS のペプチドの生合成は N 末端にあるモジュールから開始され、その後 C 末端にある終結モジュールにくるまで順番にペプチド結合の鎖が伸び続ける。NRPS のモジュールに存在するドメインでペプチド鎖の伸長に関与するものには Condensation (C)、Adenylation (A)、peptidyl carrier protein (PCP)ドメインがある。キャリアタンパク質として用いられている PCP ドメインは表面電荷に偏りがなく、ACP ドメインと同様に翻訳後に Ser 残基が PPTase によって phosphopantetheinyl 化されてホロ型になる(図 1-6-a)。A ドメインはアミノ酸を認識し、ATP を用いてアミノアシル-AMP にすることで活性化させる(図 1-6-b)。このアミノ酸の認識残基は、Phe を認識・活性化する gramicidin S synthetase の A ドメインの X 線結晶構造解析・バイオインフォマティクス・変異解析等によって明らかになっている(31-37)。これまでの研究により、A ドメインが認識する各基質 (アミノ酸)は、基質認識残基を調べることによってある程度推定することが出来る。

アミノアシル-AMP からこのホロ型の PCP にアミノ酸が転移し、PCP がアミノ酸を保持する(図 1-6-c)。C ドメインは、ペプチド結合を形成する縮合反応を触媒する。この反応は、C ドメインの N 末端側に存在するペプチジル-S-PCP のペプチド鎖と C 末端側にあるアミノアシル-S-PCP のアミノ基とでペプチド結合を形成する(図 1-6-d)。ペプチド鎖の合成反応の開始モジュールにはこの C ドメインを欠く傾向がある。

以上のドメインを持つモジュールがペプチド鎖を伸長していき、一般には最後に **thioesterase** ドメイン(TE)を含む **C-A-PCP-TE** というモジュールが反応に関与する。この TE ドメインは、完全長になったペプチドを PCP から切り離す活性を有する。切り離す際は、加水分解か環化反応を行う(38) (図 1-7)。

基本的な NRPS には以上の 4 つのドメインが含まれる。これら以外にも基質を異性化する **epimerase** ドメインや、環化を起こす C ドメインも知られている。NRPS による化合物の多様性は A ドメインが認識する基質の多様性、反応に関与する各ドメインの数、種類および順序によって創出される。

このように ACP や PCP は各酵素反応において重要なドメインであり、キャリアタンパク質として様々なドメインと関与することによって化合物の多様性の創出に寄与している。1-2 で紹介したリジン生合成に用いられている LysW は LysX、LysZ、LysY、LysJ、LysK との反応しか知られていないが、ACP や PCP のようにこれら以外の酵素と反応する例も存在するかもしれない。また、NRPS はアミノ酸をその骨格形成に利用することから、二次代謝産物の生合成に関与する LysW が存在する可能性も考えられる。

LysW は FAS、PKS、NRPS に用いられている ACP や PCP と同様にキャリアタンパク質として化合物の変換を担っているが、これらを比較すると、基質との結合様式や翻訳後修飾、タンパク質の大きさなどが異なっており、既知のキャリアタンパク質とは全く異なる新規なキャリアタンパク質であることが再認識できる(表 1-2)。

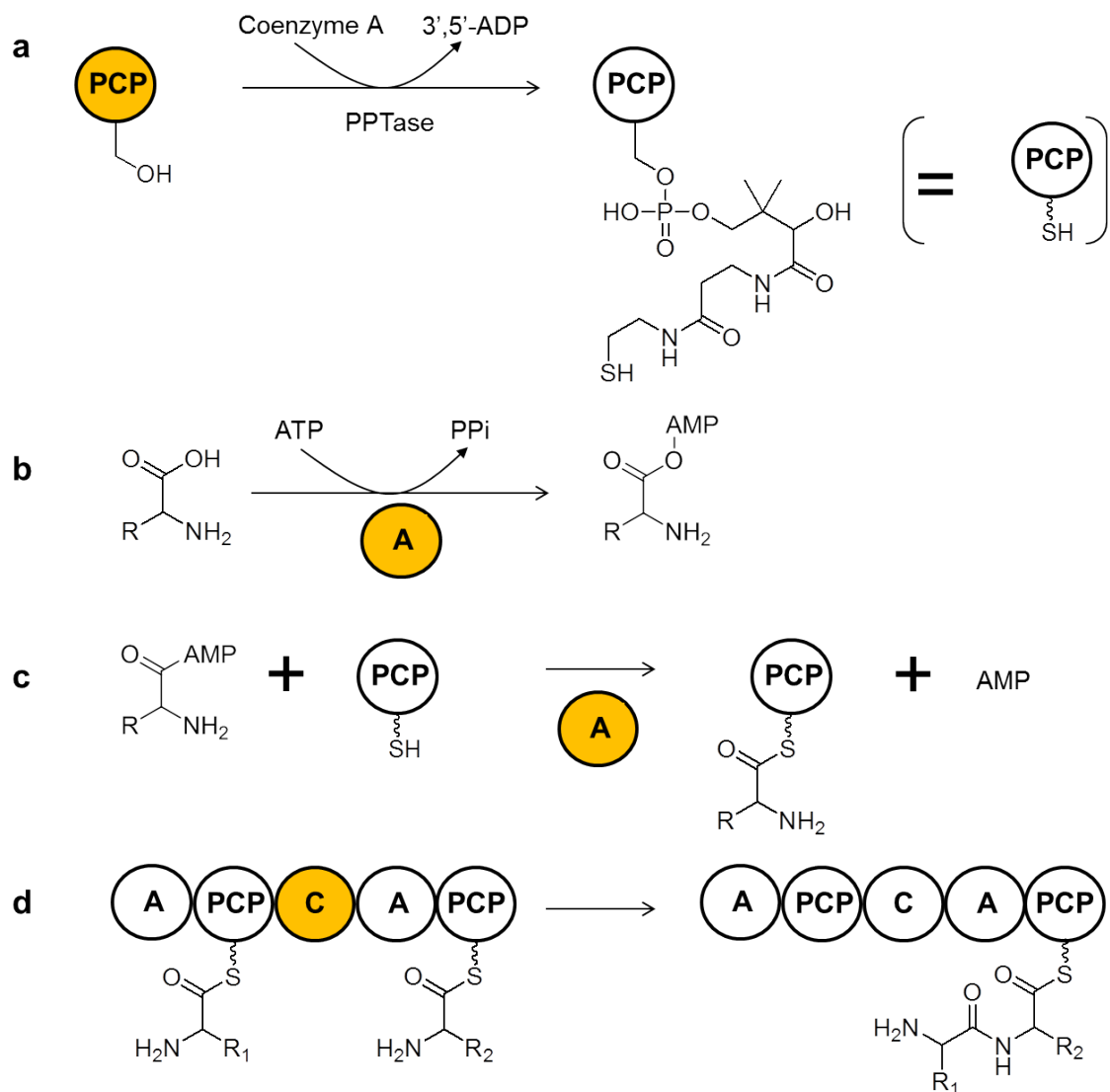


図 1-6 NRPS の各ドメインの機能(PCP、A、C)

a: PCP は翻訳後に Ser 残基が PPTase によって phosphopantetheinyl 化される(ホロ化)。

b: A ドメインはアミノ酸を認識し、ATP を用いてアミノアシル-AMP を生成する。

c: アミノアシル-AMP からホロ型の PCP にアミノ酸が転移する。

d: C ドメインは N 末端側に存在するペプチジル-S-PCP のペプチド鎖と C 末端側にあるアミノアシル-S-PCP のアミノ基とでペプチド結合を形成する

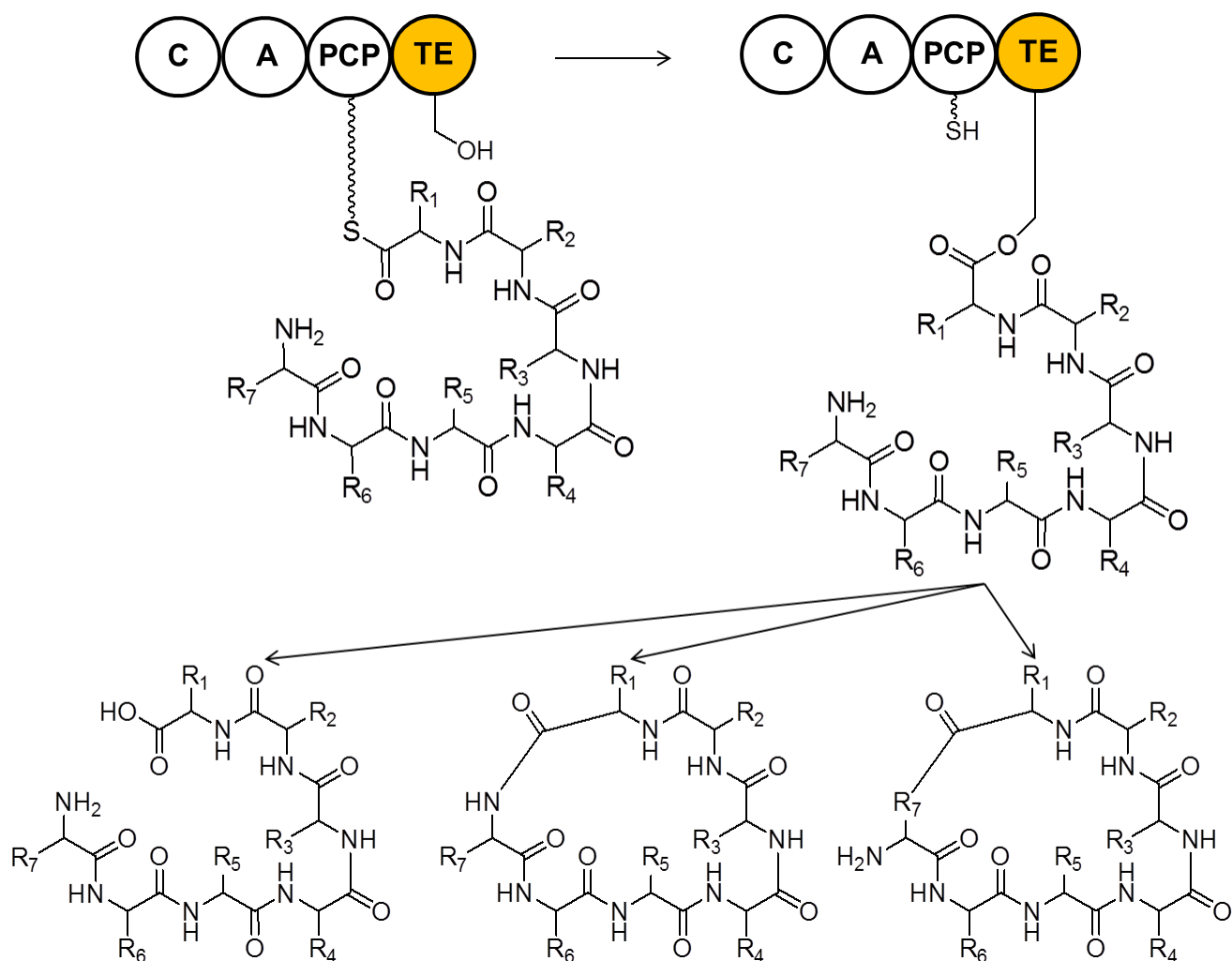


図 1-7 NRPS の TE ドメインによる反応例

表 1-2 キャリアタンパク質の比較

	キャリア タンパク質	大きさ	翻訳後修飾	結合様式	産物	表面電荷
脂肪酸生合成	ACP	8～10 kDa	必須	チオエステル結合	脂肪酸	負
PKS	ACP	8～10 kDa	必須	チオエステル結合	ポリケタイド	負
NRPS	PCP	8～10 kDa	必須	チオエステル結合	ペプチド	中性
リジン生合成	LysW	6～7 kDa	不要	イソペプチド結合	アミノ酸	負



#### 1-4 遺伝子情報と二次代謝産物

放線菌は、土壤中に豊富に存在するグラム陽性の細菌であり、様々な二次代謝産物の生産に関与している。微生物由来の生理活性物質のうち 70%近くが放線菌由来の化合物で占められている。これまで数多くの放線菌の二次代謝産物が生理活性に基づくスクリーニングにより発見され、構造決定されてきた。そして、PCR 技術の開発やシーケンス解析技術の飛躍的な進歩により構造のみが明らかであった化合物の生合成遺伝子の同定も進みつつある。前項まで紹介した PKS や NRPS を用いて生合成されると推測される天然化合物についても生合成遺伝子の解析が精力的に行われている(表 1-3)(39)。

表 1-3 生合成遺伝子の同定が行われた化合物例

対象遺伝子	抗生物質	菌株
dNDP-glucose synthase	Spectinomycin	<i>S. spectabilis</i> ATCC27741
	Bluensomycin	<i>S. bluenensis</i> ATCC27420
dNDP-glucose 4,6-dehydratase	Landomycin	<i>S. cyanogenus</i> S136
	Avilamycin	<i>S. viridochromogenes</i> Tü57
	Urdamycin	<i>S. fradiae</i> Tü2717
	Novobiocin	<i>S. spheroides</i> NCIB 11891
	Coumermycin	<i>S. rishiriensis</i> DSM 40489
	C-1027 (enediyne)	<i>S. globisporus</i> C-1027
	Aclarubicin	<i>S. galilaeus</i> ATCC 31615
	Nystatin	<i>S. noursei</i> ATCC 11455
	Rubradirin	<i>S. achromogenes</i> var. <i>rubradiris</i> NRRL 3061
	Granaticin	<i>S. violaceoruber</i> Tü22
dNDP-4-keto-6-deoxyhexose 2,3-dehydratase	Simocyclinone	<i>S. antibioticus</i> Tü6040
1-Cyclohexenylcarbonyl CoA reductase (ChcA)	Ansatrienin	<i>S. collinus</i> Tü1892
3-Amino-5-hydroxybenzoate (AHBA) synthase	Geldanamycin	<i>S. hygroscopicus</i> NRRL3602
NRPS	Complestatin	<i>S. lavendulae</i>
	Friulimicin	<i>Actinoplanes friuliensis</i>
I型PKS	Nystatin	<i>S. noursei</i> ATCC 11455
	Niddamycin	<i>S. caelestis</i> NRRL28221
	Geldanamycin	<i>S. hygroscopicus</i> NRRL3602
II型PKS	Griseorhodin A	<i>S. spec</i> JP95
	Pradimicin	<i>Actinomadura hibisca</i>
Glycosyltransferases	$\beta$ -Rhodomycin	<i>S. violaceus</i> SC-7
	Elloramycin	<i>S. olivaceus</i> Tü2353
Cytochrome P450 oxygenases	Complestatin	<i>S. lavendulae</i>
Halogenases	Chloramphenicol	<i>S. venezuelae</i> ISP5230
Carbamoyl transferase	Geldanamycin	<i>S. hygroscopicus</i> NRRL3602
Isopenicillin N-synthase	Penicillins and cephalosporins	<i>S. lipmanii</i> NRRL 3584
Coumarate ligase	Simocyclinone	<i>S. antibioticus</i> Tü6040

しかしその一方で、近年スクリーニングによって発見される新規天然化合物の種類が減少しつつあり、その医薬資源としての役割の低下が懸念される(40)。この問題に対して、放線菌の遺伝子情報の解析から 1 つの菌が 30 もの二次代謝産物を生合成し得る潜在能力を有することが明らかとなり、その情報をもとに潜在的に生合成され得る新規天然化合物の取得を試みるゲノムマイニングが行われている。その成功例の 1 つとしては、グラム陽性細菌に対して抗菌活性を有する 51 員環マクロライドである Stambomycin が知られている。これは *Streptomyces ambofaciens* の有する機能未知な PKS 遺伝子を対象とし、近傍に存在する転写調節遺伝子を強制発現させることによって、その転写レベルを上

昇させ、培養抽出物を解析することによって同定されている(41)。また、遺伝子情報と MS 情報とを組み合わせることにより、ペプチド系天然化合物の効率的なゲノムマイニングが可能であることが最近報告されている(42)。

ゲノム解析は以前と比べて格段に早く安価で行えるようになり、遺伝子情報は現在加速度的に蓄積しつつある。今後遺伝子情報に基づいた研究が増えていくことによって、従来行われてきたような遺伝学では解明することの出来ないような未知の生命システム、有用な反応を行う酵素や、活性を指標に用いたスクリーニングでは見出せなかった新規天然化合物の発見などが期待される。特に、天然化合物の骨格形成に関与する化合物を新たに発見することが出来れば、それを中間体として創出される新規天然化合物群を見出せることが期待される。

1-2 で紹介したアミノ基保護キャリアタンパク質(LysW)はアミノ基に結合するという点で初めて見出されたキャリアタンパク質である。したがって LysW を介した生合成システムは概念として全く新規なものといえる。そうした理由で LysW ホモログを対象とした研究はまだ広範に行われておらず、このシステムがこういった化合物の生合成にまで広がっているかは未だ明らかになっていない。そういった状況の中、遺伝子情報を用いて LysW ホモログを探索すると、多数の放線菌にこのホモログが見出されることが分かった。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やアルギニンを生合成することが知られていることから、そのホモログを介して新規な非天然アミノ酸の生合成が行われていることが予想された。さらにこれらの遺伝子の近傍に NRPS や PKS などをも有する放線菌も存在することから、ある種の天然化合物の骨格の形成にその非天然アミノ酸が利用されていることが期待された。

### 1-5 本研究の目的および本論文の構成

本研究では、*T. thermophilus*に見出されたアミノ基保護キャリアタンパク質のホモログが放線菌で未開拓の生合成システムを構成し、そのシステムを介して新たな二次代謝産物生合成を担うことを明らかにすることを目的としている。本研究によって、非天然アミノ酸およびこれを中間体として生合成されるペプチドなどの新規低分子化合物の発見につながることを期待される。

本論文では、*Streptomyces* sp. SANK 60404 を対象とし、本菌が有するアミノ基保護キャリアタンパク質ホモログを介した二次代謝産物の生合成について研究を行ったものである。

第2章では、[インターネット公表出来ないため削除]

第3章では、[インターネット公表出来ないため削除]

第4章では、[インターネット公表出来ないため削除]

第5章で、本研究を結論した。

第 2 章	インターネット公表出来ないために削除
第 3 章	インターネット公表出来ないために削除
第 4 章	インターネット公表出来ないために削除
第 5 章	インターネット公表出来ないために削除

## 実験項

### 1. 培地

#### LB 培地

Bacto Tryptone	1.0 %
Bacto Yeast Extract	0.5 %
NaCl	1.0 %
(Agar)	1.5 %

#### TSB 培地

Tryptone Soya Broth	3.0 %
(Agar)	1.5 %

#### K 培地

Soluble Starch	2.5 %
Soybean Meal	1.5 %
Dry Yeast	0.2 %
CaCO <sub>3</sub>	0.4 %
pH	adjust to 6.2

#### 2xYT 培地

Bacto Tryptone	1.0 %
Bacto Yeast Extract	1.6 %
NaCl	0.5 %

#### ※Trace element Solution

ZnCl <sub>2</sub>	40 mg
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	20 mg
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	20 mg
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	20 mg
NaB <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10H <sub>2</sub> O	20 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O	10 mg
H <sub>2</sub> O	fill up to 1 L

### R2YE

Sucrose	103 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25 g
Glucose	10 g
MgCl <sub>2</sub>	10.12 g
Casamino Acid	0.1 g
*Trace element Solution	2 ml
Bacto Yeast Extract	5 g
TES	5.73 g
(Agar)	22 g
H <sub>2</sub> O	850 ml

オートクレーブ後に以下の成分を添加する

0.5 % KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 ml
5 M CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	4 ml
20 % Proline	15 ml
1N NaOH	7 ml

### YEME

Difco yeast extract	3 g
Difco Bacto-peptone	5 g
Oxoid malt extract	3 g
Glucose	10 g
Sucrose	340 g
H <sub>2</sub> O	fill up to 1 L

オートクレーブ後に以下の成分を添加する

2.5 M MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	2 ml
20% Glycine	25 ml

## 2. 試薬類・菌株

遺伝子操作に用いた酵素類はタカラバイオや東洋紡、Bio-Rad、その他の試薬類は和光純薬、Sigma-Aldrich、関東化学、ナカライテスクから購入したものを利用した。また遺伝子操作に用いたオリゴヌクレオチドはオペロンバイオテクノロジーから購入した。

大腸菌の遺伝子操作は“Molecular Cloning (Third Edition)”に従った(89)。また、放線菌の遺伝子操作は“Practical Streptomyces Genetics”に従った(90)。遺伝子操作には *E. coli* DH5a [ $F^-$   $\phi$ 80d *lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR* *recA1* *endA1* *hsdR17*( $r_K^-$   $m_K^+$ ) *phoA* *supE44*  $\lambda$ - *thi-1* *gyrA96* *relA1*]および *Streptomyces lividans* TK23 を用いた。

大腸菌でのタンパク質生産には、*E. coli* BL21 (DE3) [ $F^-$  *ompT* *hsdS*( $r_B^-$   $m_B^-$ ) *gal dcm* $^+$   $\lambda$ (DE3)] (Novagen)および[インターネット公表出来ないため削除]、*E. coli* BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL [ $F^-$  *ompT* *hsdS*( $r_B^-$   $m_B^-$ ) *gal dcm* $^+$   $\lambda$ (DE3) *Tet* $^r$  *endA* *Hte* [*argU* *ileY* *leuW* *Cam* $^r$ ]] (Stratagene) を宿主として用いた。コスミドの異種発現には *Streptomyces albus* G153 を用いた。

### 【DNA 操作】

#### TEB

1 M Tris-HCl (pH 8.0)	1 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	200 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	98.8 ml

#### TESLR

Tris-HCl (pH 8.0)	25 mM
EDTA (pH 8.0)	25 mM
Sucrose	0.3 M
Lysozyme	2 mg/ml

#### Acid phenol/chloroform

Phenol	5 g
Chloroform	5 ml
H <sub>2</sub> O	1 ml

#### NaOH.3/SDS

NaOH	0.3 N
SDS	2 %

### 【プロトプラスト法】

#### P Buffer

Sucrose	10.3 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.025 g
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.202 g
*Trace element Solution	0.2 ml
H <sub>2</sub> O	fill up to 80 ml
オートクレーブ後以下の成分を添加する	
5.73 % TES (pH 7.2)	10 ml
3.68 % CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	10 ml
0.5 % KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 ml

### 【コロニーハイブリダイゼーション】

#### Sol I

HCl	0.25 M
-----	--------

#### Sol II

NaOH	0.5 M
NaCl	1.5 M

#### Sol III

NaCl	1.5 M
Tris-HCl (pH7.5)	0.5 M

#### 20 x SSC

Trisodium Citrate Dihydrate	0.3 M
NaCl	3 M

#### Primary wash buffer

Urea	360 g
SDS	4 g
20 x SSC	5 ml
H <sub>2</sub> O	fill up to 1 L

#### Secondary wash buffer

20 x SSC	10 %
----------	------



### 【タンパク質精製】

#### Buffer A

Tris-HCl (pH 8.0)	20 mM
NaCl	150 mM

#### Buffer B

Tris-HCl (pH 8.0)	20 mM
NaCl	150 mM
Imidazole (pH 8.0)	20 mM

#### Buffer C

Tris-HCl (pH 8.0)	20 mM
NaCl	150 mM
Imidazole (pH 8.0)	500 mM

#### Buffer D

Tris-HCl (pH 8.0)	100 mM
NaCl	150 mM

#### Buffer E

Tris-HCl (pH 8.0)	100 mM
NaCl	150 mM
<i>d</i> -Desthiobiotin	2.5 mM

### 【SDS-PAGE】

#### B 液

Tris-HCl (pH 8.8)	1.5 M
SDS	0.4 %

#### C 液

Tris-HCl (pH 6.8)	0.75 M
SDS	0.4 %

分離ゲル(15 %) / 2 枚

40 % アクリルアミド	4.5 ml
B 液	3 ml
H <sub>2</sub> O	4.5 ml
10% APS	108 µl
TEMED	10.8 µl

濃縮ゲル / 2 枚

40 % アクリルアミド	675 µl
C 液	750 µl
H <sub>2</sub> O	4.225 ml
10 % APS	54 µl
TEMED	9 µl

泳動 Buffer

Tris	3.03 g
Glycine	14.4 g
SDS	1.0 g
H <sub>2</sub> O	fill up to 1 L

**【Tricine-SDS-PAGE】**

Gel Buffer

Tris-HCl (pH 8.45)	3 M
SDS	0.3 %

Tricine-SDS-PAGE 分離ゲル(12%/15%)

40 % アクリルアミド	2.1 ml/ 2.625 ml
Gel Buffer	2.33 ml
Glycerol	0.77 ml
H <sub>2</sub> O	1.8 ml/ 1.275 ml
10 % APS	50 µl
TEMED	5 µl

Tricine-SDS-PAGE 濃縮ゲル

40 % アクリルアミド	0.25 ml
Gel Buffer	0.62 ml
H <sub>2</sub> O	1.63 ml
10 % APS	25 µl
TEMED	5 µl

Anode Buffer(陽極側)

Tris-HCl (pH 8.9)	0.2 M
-------------------	-------

Cathode Buffer(陰極側)

Tris	0.1 M
Tricine	0.1 M
SDS	0.1 %

2 x SDS PAGE Sample Buffer

C 液	2.5 ml
Bromophenol Blue	2 mg
10 % SDS	2 ml
β-mercaptoethanol	0.5 ml
Glycerol	2 ml
H <sub>2</sub> O	fill up to 10 ml

### 3. 実験操作

#### 【PCR】

PCR の DNA polymerase には、iProof™ High Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad)か Expand High Fidelity PCR System (Roche)を使用し、変異体の作製時には Quik-Change site-directed mutagenesis kit (Stratagene)の付属する polymerase を使用し、。反応溶液の組成はそれぞれのプロトコールに従った。ただしコロニーPCR時のみ、Promega の GoTaq Green Master Mix を使用した。

#### 【放線菌の培養】

試験管を用いて培養する時は 10 ml の培地とバネ状の撈拌子を入れて振とう培養した。バッフル付き 500 ml 三角フラスコを使う際は、一本につき 100 ml の培地を入れて用いた。

#### 【salting out 法による放線菌からの DNA の抽出】

菌体培養液 20 ml を遠心(3,500 rpm、4°C、10 min)して、上清を捨てた。20 ml の TEB に菌体を懸濁した。遠心(3,500 rpm、4°C、10 min)して、上清を捨てた。10 ml の TEB に菌体を懸濁し、10 ml の TEB + Lysozyme (終濃度 10 mg/ml)を加えて、30 分間室温でインキュベートした。10 % SDS を 1 ml 加えて室温で 5 分間インキュベートした。70°C で 5 分間インキュベートした。氷上で 5 分間インキュベートした。5 M Potassium Acetate を 2.5 ml 加えて、氷上で 15 分間インキュベートした。フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール=25 : 24 : 1 を 10 ml 加え、よく混合した後、遠心(7,000 rpm、20°C、20 min)して、水相を取得した。水相にフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール=25 : 24 : 1 を 10 ml 加えて同様の操作を行い、再び水相を取得した。等量のイソプロパノールと、10 分の 1 量の 3 M Sodium Acetate を加えて、よく混合し、遠心(7,000 rpm、4°C、20 min)して上清を捨てた。70%エタノールを 5 ml 加えて inversion し、遠心(13,000 rpm、4°C、20 min)して上清を捨てた。デシケーターで減圧して、エタノールを揮発させ、50 µl の TEB + RNase(5 µg/ml)に溶解した。

#### 【放線菌からのプラスミド抽出】

培養した菌体(5 ml 以下)を集菌し、500  $\mu$ l TESLR で懸濁し 37 °C で 30 分インキュベートした。NaOH.3/SDS を 250  $\mu$ l 加え素早くボルテックスにより混合し、70 °C で 15 分インキュベートした。37 °C 以下まで冷やしたのち、80  $\mu$ l の Acid phenol/chloroform を加え、ボルテックスにより混同した後に、遠心(15,000 rpm、4 °C、10 min)した。上清を別のチューブに移し、3 M Sodium Acetate を 50  $\mu$ l 加え、450  $\mu$ l の isopropanol を加え混合し遠心(15,000 rpm、4 °C、10 min)して上清を捨てた。70%エタノールを 1 ml 加えて inversion し、遠心(15,000 rpm、4 °C、10 min)して上清を捨てた。デシケーターで減圧して、エタノールを揮発させ、50  $\mu$ l の TEB + RNase(5  $\mu$ g/ml)に溶解した。

#### 【コロニーハイブリダイゼーション】

コロニーが形成されたプレートを、クリーンベンチで蓋を開けた状態で 1 時間置いた。プレートにメンブレン(Amersham Biosciences の Hybond-N<sup>+</sup>)を静かに乗せて 1 分間置き、コロニーを転写した。メンブレンは Sol II を染み込ませたろ紙上に置き、7 分間静置した。さらに、Sol III を染み込ませたろ紙上に置き、5 分間静置した。Sol III での処理をもう一度繰り返した。メンブレンを、80 °C で一時間ベーキングした。ベーキング後のメンブレンを水に漬け、水を染み込ませたキムワイプでメンブレンを擦り、菌体を落とした。メンブレンをタッパーに入れ、Hybridization buffer を加えて閉じ、42 °C で一時間プリハイブリダイゼーションを行った。プローブを加えて、42 °C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。プローブは以下の通りに作製した。10 ng/ $\mu$ l の DNA 溶液を沸騰水中で 5 分間処理した後、氷上に 5 分間置いた。DNA 溶液と等量の Labelling reagent と Glutaraldehyde solution を加えて、37 °C で 10 分間インキュベートした。

ハイブリダイゼーション後のメンブレンは、Primary wash buffer 中、42 °C で 20 分間振とうした。これを 2 回繰り返した。次に、Secondary wash buffer 中、室温で 5 分間振とうした。これを 2 回繰り返した。メンブレンを、Detection reagent I と Detection reagent II を等量ずつ混合した溶液に 1 分間付けた後、FUJIFILM の LAS-1000 を使用してディテクションを行った。

#### 【プロトプラスト法による放線菌の形質転換】

40 ml の放線菌の培養液を遠心(3,500 rpm、4 °C、10 min)して、上清を捨て、15 ml の 10.3 %sucrose に懸濁した。懸濁液を遠心(3,500 rpm、4 °C、10 min)して上清を捨て、10 ml の P Buffer に懸濁した。ここに 10 ml の Lysozyme(終濃度 4 mg/ml)を加えた P Buffer を加え、穏やかに混合した。30 °C で 30 分間インキュベートして、顕微鏡でプロトプラスト化したことを確認した。この時、プ

ロトプラスト化が不十分であればさらに 30 分間インキュベートした。インキュベート後の溶液は、綿栓でろ過した。ろ液を遠心(3,500 rpm、4 °C、10 min)して上清を捨て、再び綿栓でろ過した。これをもう 1 回繰り返した。ろ液を遠心(3,500 rpm、4 °C、10 min)してプロトプラスト化した菌体を回収し、1 ml の P Buffer に懸濁した。

オートクレーブした 1.0 g の PEG1450 に P Buffer を 3.75 ml 加え 25 %PEG 溶液を作製した。プロトプラスト溶液に 5 µl のプラスミドまたはコスミド溶液を添加し、素早く 25 %PEG 溶液を 500 µl 加えた。室温で 1 分間静置した後、さらに P Buffer を 800 µl 加えて、300 µl ずつ R2YE プレートに塗り広げた。プレートは 30 °C で 14 時間培養した後、1 ml の滅菌水に溶解した抗生物質を重層して、さらに 30 °C で培養を続けた。培養後、コロニーを形成した形質転換体を取得した。

#### 4. 機器類

##### NMR

JEOL Superconducting Magnet 600 MHz

##### ジャーファメンター

5 L fermentor (Labo-controller MDL-8C;  
B. E. Marubishi, Tokyo, Japan)

## 参考文献

1. Leuchtenberger, W., Huthmacher, K. & Drauz, K. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* **69**, 1-8 (2005).
2. Kakegawa, W. et al. D-Serine regulates cerebellar LTD and motor coordination through the delta 2 glutamate receptor. *Nature Neuroscience* **14**, 603-U93 (2011).
3. Baldwin, J.E. & Abraham, E. The biosynthesis of penicillins and cephalosporins. *Nat Prod Rep* **5**, 129-45 (1988).
4. Ivanov, K., Stoimenova, A., Obreshkova, D. & Saso, L. BIOTECHNOLOGY IN THE PRODUCTION OF PHARMACEUTICAL INDUSTRY INGREDIENTS: AMINO ACIDS. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **27**, 3620-3626 (2013).
5. 中森茂: “アミノ酸発酵技術の系統化調査”, *国立科学博物館の系統化調査報告* **11**, 55-91 (2008)
6. Niebisch, A., Kabus, A., Schultz, C., Weil, B. & Bott, M. Corynebacterial protein kinase G controls 2-oxoglutarate dehydrogenase activity via the phosphorylation status of the OdhI protein. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 12300-12307 (2006).
7. Nakamura, J., Hirano, S., Ito, H. & Wachi, M. Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutarnic acid productionv. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 4491-4498 (2007).
8. Shiio, I. & Miyajima, R. CONCERTED INHIBITION AND ITS REVERSAL BY END PRODUCTS OF ASPARTATE KINASE IN *BREVIBACTERIUM FLAVUM*. *Journal of Biochemistry* **65**, 849-& (1969).
9. Sano, K. & Shiio, I. MICROBIAL PRODUCTION OF L-LYSINE .3. PRODUCTION BY MUTANTS RESISTANT TO S-(2-AMINOETHYL)-L-CYSTEINE. *Journal of General and Applied Microbiology* **16**, 373-& (1970).
10. Shiio, I., Miyajima, R. & Sano, K. GENETICALLY DESENSITIZED ASPARTATE KINASE TO CONCERTED FEEDBACK INHIBITION IN *BREVIBACTERIUM-FLAVUM*. *Journal of Biochemistry* **68**, 701-710 (1970).
11. Yoshida, A., Tomita, T., Kuzuyama, T. & Nishiyama, M. Mechanism of Concerted Inhibition of alpha(2)beta(2)-type Hetero-oligomeric Aspartate Kinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 27477-27486 (2010).
12. Scapin, G. & Blanchard, J.S. Enzymology of bacterial lysine biosynthesis. *Advances in Enzymology* **72**, 279- (1998).

13. Chatterjee, S.P., Singh, B.K. & Gilvarg, C. BIOSYNTHESIS OF LYSINE IN PLANTS - THE PUTATIVE ROLE OF MESO-DIAMINOPIMELATE DEHYDROGENASE. *Plant Molecular Biology* **26**, 285-290 (1994).
14. Vogel, H.J. DISTRIBUTION OF LYSINE PATHWAYS AMONG FUNGI - EVOLUTIONARY IMPLICATIONS. *American Naturalist* **98**, 435-446 (1964).
15. Bhattacharjee, J.K. ALPHA-AMINOADIPATE PATHWAY FOR THE BIOSYNTHESIS OF LYSINE IN LOWER EUKARYOTES. *Crc Critical Reviews in Microbiology* **12**, 131-151 (1985).
16. Broquist HP. Lysine biosynthesis (yeast). *Methods Enzymol* **17**, 112-129 (1971)
17. Miyazaki, T., Miyazaki, J., Yamane, H. & Nishiyama, M. alpha-Aminoadipate aminotransferase from an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus*. *Microbiology-Sgm* **150**, 2327-2334 (2004).
18. Miyazaki, J., Kobashi, N., Nishiyama, M. & Yamane, H. Characterization of homoisocitrate dehydrogenase involved in lysine biosynthesis of an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus* HB27, and evolutionary implication of beta-decarboxylating dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 1864-1871 (2003).
19. Miyazaki, J., Kobashi, N., Nishiyama, M. & Yamane, H. Functional and evolutionary relationship between arginine biosynthesis and prokaryotic lysine biosynthesis through alpha-aminoadipate. *Journal of Bacteriology* **183**, 5067-5073 (2001).
20. Miyazaki, J., Kobashi, N., Fujii, T., Nishiyama, M. & Yamane, H. Characterization of a lysK gene as an argE homolog in *Thermus thermophilus* HB27. *Febs Letters* **512**, 269-274 (2002).
21. Wulandari, A.P. et al. Characterization of bacterial homocitrate synthase involved in lysine biosynthesis. *Febs Letters* **522**, 35-40 (2002).
22. Kobashi, N., Nishiyama, M. & Tanokura, M. Aspartate kinase-independent lysine synthesis in an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus*: Lysine is synthesized via alpha-aminoadipic acid not via diaminopimelic acid. *Journal of Bacteriology* **181**, 1713-1718 (1999).
23. Kosuge, T. & Hoshino, T. Lysine is synthesized through the alpha-aminoadipate pathway in *Thermus thermophilus*. *Fems Microbiology Letters* **169**, 361-367 (1998).
24. Nishida, H. et al. A prokaryotic gene cluster involved in synthesis of lysine through the amino adipate pathway: A key to the evolution of amino acid biosynthesis. *Genome Research* **9**, 1175-1183 (1999).
25. A. Horie *et al.*, Discovery of proteinaceous N-modification in lysine biosynthesis of *Thermus thermophilus*. *Nature Chemical Biology* **5**, 673-679 (2009).



26. Ouchi, T. et al. Lysine and arginine biosyntheses mediated by a common carrier protein in *Sulfolobus*. *Nature Chemical Biology* **9**, 277-283 (2013).
27. Chan, D.I. & Vogel, H.J. Current understanding of fatty acid biosynthesis and the acyl carrier protein. *Biochemical Journal* **430**, 1-19 (2010).
28. Lai, J.R., Koglin, A. & Walsh, C.T. Carrier protein structure and recognition in polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis. *Biochemistry* **45**, 14869-14879 (2006).
29. Hertweck, C. The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angew Chem Int Ed Engl* **48**, 4688-716 (2009).
30. Lambalot, R.H. et al. A new enzyme superfamily - The phosphopantetheinyl transferases. *Chemistry & Biology* **3**, 923-936 (1996).
31. Stachelhaus, T., Mootz, H.D. & Marahiel, M.A. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry & Biology* **6**, 493-505 (1999).
32. Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M.A. & Brick, P. Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *Embo Journal* **16**, 4174-4183 (1997).
33. Krätzschmar, J., Krause, M. & Marahiel, M.A. Gramicidin S biosynthesis operon containing the structural genes *grsA* and *grsB* has an open reading frame encoding a protein homologous to fatty acid thioesterases. *J Bacteriol* **171**, 5422-9 (1989).
34. Turgay, K., Krause, M. & Marahiel, M.A. Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Mol Microbiol* **6**, 529-46 (1992).
35. Konz, D. & Marahiel, M.A. How do peptide synthetases generate structural diversity? *Chemistry & Biology* **6**, R39-R48 (1999).
36. Marahiel, M.A., Stachelhaus, T. & Mootz, H.D. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chemical Reviews* **97**, 2651-2673 (1997).
37. vonDohren, H., Keller, U., Vater, J. & Zocher, R. Multifunctional peptide synthetases. *Chemical Reviews* **97**, 2675-2705 (1997).
38. Trauger, J.W., Kohli, R.M., Mootz, H.D., Marahiel, M.A. & Walsh, C.T. Peptide cyclization catalysed by the thioesterase domain of tyrocidine synthetase. *Nature* **407**, 215-218 (2000).
39. Weber, T., Welzel, K., Pelzer, S., Vente, A. & Wohlleben, W. Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes. *Journal of Biotechnology* **106**, 221-232 (2003).
40. Newman, D.J. & Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products* **70**, 461-477 (2007).

41. Laureti, L. et al. Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambofaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 6258-6263 (2011).
42. Kersten, R.D. et al. A mass spectrometry-guided genome mining approach for natural product peptidogenomics. *Nature Chemical Biology* **7**, 794-802 (2011).
43. Fujita, Y., Murakami, R., Muramatsu, Y., Miyakoshi, S. & Takatsu, T. A-94964, novel inhibitor of bacterial translocase I, produced by *Streptomyces* sp. SANK 60404. II. Physico-chemical properties and structure elucidation. *J Antibiot* (Tokyo) **61**, 545-9 (2008).
44. Murakami, R. et al. A-94964, a novel inhibitor of bacterial translocase I, produced by *Streptomyces* sp. SANK 60404. I. Taxonomy, isolation and biological activity. *J Antibiot* (Tokyo) **61**, 537-44 (2008).
45. Ishikawa, J. & Hotta, K. FramePlot: a new implementation of the frame analysis for predicting protein-coding regions in bacterial DNA with a high G + C content. *FEMS Microbiol Lett* **174**, 251-3 (1999).
46. Bierman, M. et al. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* **116**, 43-9 (1992).
47. Jez, J.M., Ferrer, J.L., Bowman, M.E., Dixon, R.A. & Noel, J.P. Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase. *Biochemistry* **39**, 890-902 (2000).
48. Herai, S. et al. Hyper-inducible expression system for streptomycetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 14031-5 (2004).
49. Fukatsu, H. et al. High-level expression of a novel amine-synthesizing enzyme, N-substituted formamide deformylase, in *Streptomyces* with a strong protein expression system. *Protein Expr Purif* **40**, 212-9 (2005).
50. Magalhaes, M.L. & Blanchard, J.S. The kinetic mechanism of AAC3-IV aminoglycoside acetyltransferase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **44**, 16275-83 (2005).
51. Asztalos, P. et al. Strain and near attack conformers in enzymic thiamin catalysis: X-ray crystallographic snapshots of bacterial transketolase in covalent complex with donor Ketoses xylulose 5-phosphate and fructose 6-phosphate, and in noncovalent complex with acceptor aldose ribose 5-phosphate. *Biochemistry* **46**, 12037-12052 (2007).
52. Schenk, G., Duggleby, R.G. & Nixon, P.F. Properties and functions of the thiamin diphosphate dependent enzyme transketolase. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **30**, 1297-1318 (1998).
53. Schneider, G. & Lindqvist, Y. Crystallography and mutagenesis of transketolase: mechanistic implications for enzymatic thiamin catalysis. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1385**, 387-398 (1998).

54. Cook, P.D. & Holden, H.M. GDP-perosamine synthase: structural analysis and production of a novel trideoxysugar. *Biochemistry* **47**, 2833-40 (2008).
55. Burgie, E.S., Thoden, J.B. & Holden, H.M. Molecular architecture of DesV from *Streptomyces venezuelae*: A PLP-dependent transaminase involved in the biosynthesis of the unusual sugar desosamine. *Protein Science* **16**, 887-896 (2007).
56. Larkin, A., Olivier, N.B. & Imperiali, B. Structural Analysis of WbpE from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: A Nucleotide Sugar Aminotransferase Involved in O-Antigen Assembly. *Biochemistry* **49**, 7227-7237 (2010).
57. Thoden, J.B., Schaeffer, C., Messner, P. & Holden, H.M. Structural Analysis of QdtB, an Aminotransferase Required for the Biosynthesis of dTDP-3-acetamido-3,6-dideoxy- $\alpha$ -D-glucose. *Biochemistry* **48**, 1553-1561 (2009).
58. Zhao, Q.F. et al. Characterization of the azinomycin B biosynthetic gene cluster revealing a different iterative type I polyketide synthase for naphthoate biosynthesis. *Chemistry & Biology* **15**, 693-705 (2008).
59. Rege, S.D., Adamczyk, M. & Reddy, R.E. Synthesis of galactosylhydroxylysine and its analogs. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **220**, U65-U65 (2000).
60. Ohtani, I., Kusumi, T., Kashman, Y. & Kakisawa, H. HIGH-FIELD FT NMR APPLICATION OF MOSHER METHOD - THE ABSOLUTE-CONFIGURATIONS OF MARINE TERPENOID. *Journal of the American Chemical Society* **113**, 4092-4096 (1991).
61. Minch, M.J. Orientational dependence of vicinal proton-proton NMR coupling constants: The Karplus relationship, Concepts in Magnetic Resonance Volume 6, Issue 1. in *Concepts in Magnetic Resonance* **6** 41-56 (1994).
62. Kwon, H.C. et al. Nitropyrrolins A-E, cytotoxic farnesyl- $\alpha$ -nitropyrroles from a marine-derived bacterium within the actinomycete family Streptomycetaceae. *J Nat Prod* **73**, 2047-52 (2010).
63. van Echten-Deckert, G. & Herget, T. Sphingolipid metabolism in neural cells. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1758**, 1978-1994 (2006).
64. Hannun, Y.A. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* **274**, 1855-1859 (1996).
65. Olivera, A. & Spiegel, S. SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE AS 2ND MESSENGER IN CELL-PROLIFERATION INDUCED BY PDGF AND FCS MITOGENS. *Nature* **365**, 557-560 (1993).
66. Cuvillier, O. et al. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* **381**, 800-803 (1996).
67. Spiegel, S. & Milstien, S. Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 25851-25854 (2002).

68. Fujita, T. et al. FUNGAL METABOLITES .11. A POTENT IMMUNOSUPPRESSIVE ACTIVITY FOUND IN ISARIA-SINCLAIRII METABOLITE. *Journal of Antibiotics* **47**, 208-215 (1994).
69. Adachi, K. et al. DESIGN, SYNTHESIS, AND STRUCTURE-ACTIVITY-RELATIONSHIPS OF 2-SUBSTITUTED-2-AMINO-1,3-PROPANEDIOLS - DISCOVERY OF A NOVEL IMMUNOSUPPRESSANT, FTY720. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **5**, 853-856 (1995).
70. Fujita, T. et al. 2-SUBSTITUTED 2-AMINOETHANOL - MINIMUM ESSENTIAL STRUCTURE FOR IMMUNOSUPPRESSIVE ACTIVITY OF ISP-I (MYRIOCIN). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **5**, 1857-1860 (1995).
71. Kappos, L. et al. A Placebo-Controlled Trial of Oral Fingolimod in Relapsing Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine* **362**, 387-401 (2010).
72. Cohen, J.A. et al. Oral Fingolimod or Intramuscular Interferon for Relapsing Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine* **362**, 402-415 (2010).
73. Mandala, S. et al. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* **296**, 346-349 (2002).
74. Matloubian, M. et al. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* **427**, 355-360 (2004).
75. Miyake, Y., Kozutsumi, Y., Nakamura, S., Fujita, T. & Kawasaki, T. SERINE PALMITOYLTRANSFERASE IS THE PRIMARY TARGET OF A SPHINGOSINE-LIKE IMMUNOSUPPRESSANT, ISP-1/MYRIOCIN. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **211**, 396-403 (1995).
76. Argoudelis, A.D. et al. Antibiotics produced by *Streptomyces ficellus*. I. Ficellomycin. *J Antibiot* (Tokyo) **29**, 1001-6 (1976).
77. Foulke-Abel, J., Agbo, H., Zhang, H., Mori, S. & Watanabe, C.M.H. Mode of action and biosynthesis of the azabicyclic-containing natural products azinomycin and ficellomycin. *Natural Product Reports* **28**, 693-704 (2011).
78. Kuo, M.S., Yurek, D.A. & Mizesak, S.A. Structure elucidation of ficellomycin. *J Antibiot* (Tokyo) **42**, 357-60 (1989).
79. Reusser, F. Ficellomycin and feldamycin; inhibitors of bacterial semiconservative DNA replication. *Biochemistry* **16**, 3406-12 (1977).
80. Alcaro, S. & Coleman, R.S. A molecular model for DNA cross-linking by the antitumor agent azinomycin B. *Journal of Medicinal Chemistry* **43**, 2783-2788 (2000).
81. Rajski, S.R. & Williams, R.M. DNA cross-linking agents as antitumor drugs. *Chemical Reviews* **98**, 2723-2795 (1998).

82. Ansari, M.Z., Yadav, G., Gokhale, R.S. & Mohanty, D. NRPS-PKS: a knowledge-based resource for analysis of NRPS/PKS megasynthases. *Nucleic Acids Res* **32**, W405-13 (2004).
83. Challis, G.L., Ravel, J. & Townsend, C.A. Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chemistry & Biology* **7**, 211-224 (2000).
84. Cheng, Y.Q., Tang, G.L. & Shen, B. Identification and localization of the gene cluster encoding biosynthesis of the antitumor macrolactam leinamycin in *Streptomyces atroolivaceus* S-140. *J Bacteriol* **184**, 7013-24 (2002).
85. Yin, X.H., McPhail, K.L., Kim, K.J. & Zabriskie, T.M. Formation of the nonproteinogenic amino acid 2S,3R-capreomycinidine by VioD from the viomycin biosynthesis pathway. *Chembiochem* **5**, 1278-1281 (2004).
86. Wang, S. et al. Essential role of an unknown gene aziU3 in the production of antitumor antibiotic azinomycin B verified by utilizing optimized genetic manipulation systems for *Streptomyces sahachiroi*. *Fems Microbiology Letters* **337**, 147-154 (2012).
87. Iyer, L.M., Abhiman, S., Burroughs, A.M. & Aravind, L. Amidoligases with ATP-grasp, glutamine synthetase-like and acetyltransferase-like domains: synthesis of novel metabolites and peptide modifications of proteins. *Molecular Biosystems* **5**, 1636-1660 (2009).
88. Leyh, T.S., Taylor, J.C. & Markham, G.D. THE SULFATE ACTIVATION LOCUS OF *ESCHERICHIA-COLI-K12* - CLONING, GENETIC, AND ENZYMATIC CHARACTERIZATION. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 2409-2416 (1988).
89. Sambrook, J., and Russell, D. W. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2001).
90. Kieser, T., J. Bibb., M., J. Buttner, M., F. Chater, K., and A. Hopwood, D. (eds). *Practical Streptomyces Genetics*. John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom (2000).

## 謝辞

本研究を行うにあたり、大変多くの方にご指導・ご助言を頂きました。厚く御礼を申し上げます。

素晴らしい研究環境、研究テーマを与えて下さり、6年間研究の全般に渡るご指導・ご鞭撻をして下さいました東京大学生物生産工学研究センター 細胞機能工学研究室の西山 真 教授に、心より感謝申し上げます。同研究室の葛山 智久 准教授には、放線菌の取り扱い、化合物の精製方法・分析方法において貴重なご助言を頂きました。深く感謝申し上げます。また、学部 4 年生の頃から一つ一つの実験を丁寧に教えてくださり、数多くのご助言・ご指導を下さった同研究室の富田 武郎 助教に深く感謝申し上げます。そして、同研究室の皆様にもご助言・ご指導をいただきました。この場を借りて感謝いたします。

東京大学生物生産工学研究センター微生物機能代謝工学研究室の古園 さおり 特任准教授には、研究について多くのご助言をしていただきました。深く感謝申し上げます。また、同研究室の吉田 彩子 特任助教には、細胞機能工学研究室の先輩として研究生活全般に渡り多くのご指導をいただきました。深く感謝申し上げます。

第一三共株式会社から放線菌 *Streptomyces* sp. SANK 60404 株を分与していただきました。厚く御礼を申し上げます。

筑波大学大学院生命環境科学研究科生物機能科学専攻の小林 達彦 教授には放線菌用の発現誘導ベクターである pSH19 を分与していただきました。厚く御礼を申し上げます。

高分解能の分析手法による中間体の構造決定には、順天堂大学大学院医学研究科研究基盤センター 生体分子研究部門の藤村 務 准教授、ならびに同研究科アトピー疾患研究センター 分子生物学研究部門の西山 千春 准教授を始め、多くの方々にご協力を仰ぎました。測定方法からデータの解析に至るまで、細部に渡って快くご指導くださいましたことを深く感謝申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科 有機化学研究室の石神 健 准教授には新規アミノ酸 DADH の化学修飾および新モッシャー法を用いた絶対立体配置の決定法を詳しく解説していただきました。快くご指導くださいましたことを深く感謝申し上げます。

最後に、常に暖かく見守って下さった家族に感謝いたします。

ありがとうございました。

平成 25 年 12 月 25 日