

論文の内容の要旨

論文題目 バクテリアにおける補酵素類生合成に関与する新規経路の解析

氏名 倉都 将宏

背景及び目的

急速な技術革新を伴い発展してきたゲノム解析の技術や手法により、これまでに数多くの生物のゲノム情報が明らかとなってきた。ゲノムサイズが数 Mbps 程度の細菌の場合、現在も目覚ましい発展を続けている次世代シーケンシング技術を用いれば、アノテーション等のバイオインフォマティクス解析も含め 1~2 ヶ月程度で安価に全ゲノムの解読が可能である。一方、代謝経路に関しては、微生物の中では特に、モデル生物として古くから位置付けられてきた大腸菌において数多くの知見が蓄積されている。関連酵素や遺伝子、それらの制御を含む代謝経路に関する膨大な情報は、代表的なデータベースである KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) や ECOCYC (<http://ecocyc.org/>) より必要に応じて容易に取り出すことが可能である。

しかし近年、モデル微生物で確立されきた代謝経路とはやや異なる経路が存在することが明らかになりつつある。イソペンテニルニリン酸生合成に関わる MEP (2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate) 経路、*Thermus thermophilus* において見出された AAA (α -Amino adipic acid) からのリジン新規生合成経路、*Streptomyces coelicolor* において見出されたフタロシン (FL) を介したメナキノン (MK) 新規生合成経路等は、その代表的な例と言える。また、補酵素の生合成においては、ピリドキサールのピリジン環が、大腸菌では 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) と 3-amino-1-deoxyacetone-1-phosphate から 7 段階で生合成されるのに対し、枯草菌では、ribulose-phosphate、glyceraldehyde-phosphate、アンモニアから 1 つの酵素反応で生合成されること、また NAD の生合成では、従来真核生物にしか存在しないと考えられていた tryptophan-kynurenine 経路がキサントモナス目やフラボバクテリウム目の真正細菌に存在すること等、補酵素生合成の多様性が明らかになりつつある。最近ではセリンの生合成に関して、3-phosphoserine の脱リン酸にこれまでとは全くタイプの異なる酵素が関与していることも明らかとなり、一次代謝経路にも従来は知られていなかった多様性が存在することが予想される。このような事例は、新規生合成経路が他にも数多く存在する可能性を期待させるのに十分であった。

本研究では、多くの栄養要求性を示す一方で、近年のゲノム解析によりゲノムサイズが数 Mbp 程度と比較的大きいことがわかった *Lactobacillus* 属に着目し、新規一次代謝経路 (アミノ酸、核酸系物質、ビタミン) の探索を行った。併せて、既に *S. coelicolor* においてその

概略が明らかとなっていた MK 新規生合成経路について、*T. thermophilus*、*Acidothermus cellulolyticus*、*Helicobacter pylori* の各オルソログに着目し、初発反応として FL が生成すると予想されていたものの未だ証明されていなかった MqnA、及び FL から de-hypoxanthine futalosine (DHFL) の生成を担うとされる MqnB の解析も行った。

本研究においては、上述の探索、解析を通して、生理学的な新たな知見を獲得すると共に、応用面においても病原菌等に対する阻害剤の開発に貢献し得る新たな経路や知見を見出すことを目的とした。

乳酸菌における新規一次代謝経路の探索

第 1 章では、*Lactobacillus* 属 4 株、*Lactobacillus fermentum*、*Lactobacillus reuteri*、*Lactobacillus gasseri*、*Lactobacillus brevis* を対象とし、それらが新規一次代謝経路を有している可能性を期待して、網羅的な栄養要求性評価、及びゲノムデータベースの精査を行い、比較解析を行った。

多くの場合、期待に反しゲノム情報と栄養要求性の結果は一致したが、中でもアミノ酸では *L. fermentum* におけるグルタミン酸やセリン・システイン生合成に関して、核酸系物質では *L. fermentum* における GMP 生合成や *L. gasseri* における UTP から CTP、dTTP に至る生合成に関して、ビタミンでは *L. fermentum* におけるビタミン B6・葉酸 (*p*-アミノ安息香酸 (PABA))、*L. reuteri* における葉酸 (PABA)、*L. gasseri* におけるチアミン・リボフラビン・葉酸の各生合成に関しては、ゲノム情報ではそれらの生合成に必要な遺伝子が不足していたのにも関わらず、それらの要求性を示されなかったことから、それらが新規経路で生合成されている可能性を見出すことができた。

新規葉酸 (PABA) 生合成経路の解析

第 2 章では、第 1 章で見出された中で最も新規生合成経路を有している可能性が高いことが予想された現象、即ち *L. fermentum* と *L. reuteri* で認められた、葉酸生合成経路の中でコリスミ酸から *p*-アミノ安息香酸 (PABA) を生合成する遺伝子が存在しないにも関わらず、葉酸の要求性を示さなかった現象について詳細に検証した。*in vitro* での検討においては、*L. fermentum* における FolP オルソログである LAF1336 は、FolP と同様に、PABA を基質として葉酸生合成経路中間体である 7,8-dihydropteroate を生成することが LC-MS にて確認され、*in vivo* 検討においては、生育不良を示した *folP* 欠損大腸菌が LAF1336 の発現により相補される（野生型と同程度に生育が回復する）ことが明らかになったことで、少なくとも *L. fermentum* においては PABA が新規経路で生合成される可能性が示された。

Nitrosomonas eutropha もまた、葉酸非要求性にも関わらず、葉酸生合成経路の中でコリスミ酸から PABA を生合成するのに必要なオルソログを有していないことが知られていたた

め、大腸菌の PABA 生合成に関与する *pabA*、*pabB*、*pabC* 欠損株 (Δ *pabABC* 株) を宿主に用い、*L. fermentum*、*N. eutropha* をゲノム DNA 供与体としてショットガンクローニングを行った。その結果、*N. eutropha* から pyrroloquinoline quinone (PQQ) synthase と弱い相同性を持ち、機能未知とアノテーションされている候補遺伝子 (*NE1434*) を取得することができた。本遺伝子が PABA の生合成に関与していることは、トレーサー実験において、*NE1434* を発現する Δ *pabABC* 株を [U- $^{13}\text{C}_6$]glucose を単一炭素源として生育させた際に、 ^{13}C ラベルされた PABA が *de novo* 合成されることで確かめられた。また、*Chlamydia trachomatis* においても、葉酸生合成経路のうち PABA 生合成遺伝子が存在しないため、その新規経路を持つことが予想されたが、*NE1434* オルソログに当たる *CT610* が他の葉酸生合成遺伝子と染色体上でクラスターを成していること、更には *CT610* の発現により Δ *pabABC* 株の PABA 要求性が相補されたことから、*NE1434* や *CT610* が PABA の生合成に関与する可能性が強く示唆された。*NE1434* の基質については、本研究において様々なアプローチ（精製した組換え酵素を用いた酵素反応、シキミ酸経路上の化合物を利用するかどうかの遺伝学的検証、*NE1434* による PABA 生合成を不能にする変異の探索）で検討を行ったが、それを明らかにすることはできなかった。

不思議なことに、*L. fermentum* のゲノムデータベースには本遺伝子のオルソログは存在しなかった。この事実は、*L. fermentum* においては、既知経路や *N. eutropha* とは異なる第 3 の経路で PABA が生合成されている可能性を示唆する。本研究においては、*L. fermentum* の PABA 生合成関連遺伝子についてショットガンクローニングで候補遺伝子を取得することができなかった。このことから、生合成関連遺伝子が 1 つではないこと、更には複数の遺伝子座に跨って存在している可能性が考えられる。今後、BAC やコスミド等のライブラリーを作製することで、候補遺伝子の取得が期待される。

本研究において、*N. eutropha* や *C. trachomatis* と *L. fermentum* や *L. reuteri* で PABA 生合成経路が異なるのかどうかを明確に示すことはできなかったが、その経路に多様性が存在する可能性が示され、少なくとも *N. eutropha* や *C. trachomatis* においては従来知られていた経路とは異なる経路で PABA が生合成されることが明らかとなった。*NE1434* オルソログの分布を PQQ 生合成遺伝子を持たない原核生物を対象に調べると、アンモニア酸化菌や窒素固定菌のグループと偏性細胞内寄生性細菌のグループが、それぞれそのオルソログを有していた。これまでに動物細胞では *NE1434* オルソログは見つかっていないため、本成果が病原菌に高い特異性を示す抗生物質のためのターゲットに発展する可能性が期待される。

新規 MK 生合成経路における MqnA 及び MqnB の解析

第 3 章では、MK 新規生合成経路の解析を行った。MqnA に関しては、*T. thermophilus* 及び *A. cellulolyticus* におけるオルソログ、TTHA0803 及び Acel_0261 を中心に、*in vivo*、*in vitro* の両面から解析を行ったが、その詳細を明らかにすることはできなかった。一方、FL から

DHFL が生成する MqnB オルソログに関して、*S. coelicolor*、*T. thermophilus*、*A. cellulolyticus*、*H. pylori* が有する各酵素 (SCO5662、SCO4327; TTHA0556; Acel_0264、Acel_0106; HP0089、HP1178) の機能解析を行い、コリスミ酸から DHFL に至る経路に多様性がある (FL のヒポキサンチン部位がアデニン部位となった Aminodeoxyfutalosine (AFL) がその経路の中間に関与する場合がある) ことを明らかにすることができた (図)。MqnA に関しては、本研究でも Acel_0261 の生成物として確認された 3-(1-carboxyvinyl) benzoate と、*S*-adenosylmethionine 及び嫌氣的に精製した TTHA0804 により AFL が生成することが別グループの研究より *in vitro* で証明された。このことから MqnA の生成物は FL ではなく AFL であり、その後 DHFL に至る経路に FL を介する場合と介さない場合があることが示された。FL を介さない経路 (AFL を直接 DHFL へと変換する経路) を持つ細菌は、これまでに *H. pylori* しか見つかっていないため、本反応が抗ピロリ菌剤として非常に有望なターゲットとなる可能性が考えられる。

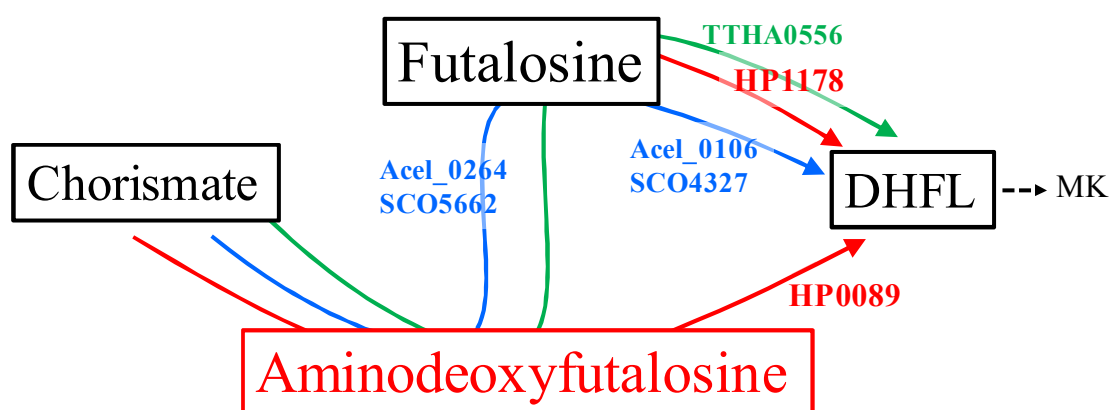


図 MK 新規生合成経路の多様性

まとめ

本研究により、PABA の新規生合成経路の存在が明らかとなり、また MK 新規生合成経路における AFL を介した多様性の存在が明らかとなったことで、微生物の多様性やその進化を考える上でも重要な生理学的な新たな知見を得ることができただけでなく、応用面でも有用な抗生物質の開発等に繋がる有力な手掛かりをも得ることができた。今後、新規生合成経路の更なる詳細の解明、更には本研究で見出された経路 (反応) に特異的な阻害剤の探索を通し、ヒトにとって有効かつ安全性の高い抗生物質の開発が期待される。