

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15257

研究課題名(和文)ピラジン環の新たな生合成経路の解明

研究課題名(英文)Enzymatic Cascade in Pseudomonas that Produces Pyrazine from Amino Acids

研究代表者

榎尾 俊介(MASUO, Shunsuke)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：10767122

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文):ピラジン類は、フェロモンやにおい成分などとしてよく知られる化合物群である。我々はPseudomonas fluorescens SBW25の単環式ピラジン類を生合成するための新しいメカニズムを発見した。天然のアミノ酸である4APheが、新規、-oxoamine synthaseのPapDによりアミノケトンへと変換され、これが自然重合して生じる還元型のジヒドロピラジンがPapFにより酸化されピラジンが形成される生合成機構を明らかとした。これらの2つの酵素は、単環式ピラジンを合成するユニークなメカニズムを構成しており、天然のアミノ酸からピラジン誘導体を生合成するための新たな戦略となりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自然界でピラジン類縁体が発見されてから半世紀以上経つが、本研究により初めてアミノ酸を原料としたピラジン環の生合成機構が明らかとなった。PapDおよびPapFをコードすると予想される遺伝子は細菌に広く保存されていたため、多くの細菌が同様の機構でピラジン類縁体を生合成している可能性がある。自然界にはアミノ酸を原料とすると予想されるピラジン類縁体が多く存在するため、本知見はこれら化合物の生合成経路を解明するための基礎的知見として重要である。また、本生合成経路を改変・利用することで、アミノ酸原料からのピラジン化合物の生産といった、合成生物学的な研究を行うことが可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文):Pyrazines are biologically active pheromones and odors distributed among biological systems while their biosynthesis mechanism are fairly understood. The function of bacterial pap gene cluster revealed unique pathway for 2,5-dimethyl-3,6-bis(4-aminobenzyl)-pyrazine (DMBAP) synthesis that novel family of -oxoamine synthase initially converts an amino acid to aminoketone, which couples to be a dihydropyrazine and forms the pyrazine DMBAP by novel dihydropyrazine oxidase. This finding establishes the novel enzymic framework of pyrazine biosynthesis.

研究分野：生化学、応用微生物学

キーワード：ピラジン 生合成 アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

ピラジン類は、ベンゼンに 1,4-窒素原子を置換した芳香族複素環化合物で、香料、医薬品、化学品の原料として広く利用されている。これまで抗菌、抗真菌、抗がん、抗ウイルスなどの幅広い生理活性を有するピラジン類が天然から多数単離されており、医薬品や農薬原料として期待されている。

フラバコールは *Aspergillus flavus* から単離された最も原始的なピラジンであり、ロイシンとイソロイシンから得られるジケトピペラジンの脱水生成物であると考えられている。*Corynebacterium glutamicum* は、分岐鎖アミノ酸の生合成の中間体であるアシロインを介してアルキルピラジンを合成する。*Serratia* や *Vibrio* 属細菌は、スレオニン脱水素酵素を用いてスレオニンをアミノアセトンに変換し、これを中間体としてアルキルピラジンを生合成する。これらは、アリのフェロモンや細菌のオートインデューサーとして機能することが明らかとなっている。しかしながら、ピラジン環の形成に関わる酵素はいまだに解明されておらず、スレオニン以外のアミノ酸からのピラジンの生合成は未知であった。

2. 研究の目的

これまでに、*P. fluorescens* SBW25 株の *papABC* が 4-アミノフェニルアラニン (4APhe) 生合成遺伝子であることを示し、これを用いて 4APhe とその類縁体の発酵生産系を構築してきた。その研究の過程で、*papABC* に近接する 3 つの機能未知遺伝子 [PFLU_1773 (*papD*), PFLU_1774 (*papE*) および PFLU_1775 (*papF*)] を見出した。*papABCDEF* を発現させた大腸菌の代謝産物の解析結果から、これらの遺伝子は、新規なピラジン類縁体である 2,5-ジメチル-3,6-ビス(4-アミノベンジル)ピラジン (DMBAP) の生合成に関わると示唆された。本研究では、*papDEF* がコードする各酵素の機能を明らかとすることで、このピラジン化合物の生合成機構を明らかとすることを目的とした。また、本生合成機構を利用してアミノ酸を原料とした新たなピラジン化合物の生産系の構築に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌宿主での *papABCDEF* の異種発現

P. fluorescens SBW25 株の *papA*, *papB*, *papC*, *papD*, *papE* および *papF* をそれぞれ人工合成し、pET-duet1, pCDF-duet1 あるいは pRSF-duet1 の T7 プロモーターの下流に連結した。得られたプラスミドを大腸菌に導入し、Modified M9 培地を用いて培養した。IPTG 添加後の培養液に含まれる代謝産物を HPLC を用いて分析した。

(2) 組換え酵素の調製

papD, *papE* および *papF* をそれぞれ pET28a プラスミドに連結し、得られた pET-*papD*, pET-*papE* および pET-*papF* 大腸菌 BL21 (DE3) にそれぞれ導入した。得られた組換え大腸菌を用いて、PapD, PapE および PapF の組換え酵素を調製した。組換え酵素は、HisTrap アフィニティーカラムを用いて精製した。

(3) 変異型 PapD 発現大腸菌の作製とスクリーニング

Error-prone PCR により *papD* を増幅し、得られた遺伝子断片を pET28a プラスミドに連結した。これを大腸菌 BL21 (DE3) に導入し、20000 個のコロニーを取得した。変異の導入率は 1000 bp あたり 5.4 塩基であった。得られたコロニーをピックし、Auto-induction 用培地 ZYM-5052 に植菌し、96 well プレートを用いて 30°C で 24 h 培養した。集菌した菌体を破砕したのち、Nickel-Chelating Resin を用いて変異型 PapD を簡易精製した。得られた組換え酵素を用いて、種々のアミノ酸を基質とした際の活性を測定した。活性測定には 5, 5-dithiobis- (2-nitro- benzoic acid) (DTNB) 法を用いた。

4. 研究成果

(1) *papABCDEF* 発現大腸菌の代謝産物解析

papABCDEF 発現菌の代謝産物を解析したところ、ピラジン化合物 DMBAP の生産が確認された。*papABC* は 4APhe の生産に関わることから、*papDEF* は 4APhe の DMBAP への変換に関与すると考えられた。*papABCDEF* 発現菌からそれぞれ *papD*, *papE* および *papF* を欠損させた株を作製した。HPLC、LC-MS 等を用いてこれらの株の代謝産物を解析したところ、*papD* を欠損させた株では、4APhe は生産するものの、DMBAP を全く生産しなくなることが分かった。一方、*papF* を欠損した株では、DMBAP の生産量が著しく減少し、その代わりに生合成中間体と予想された化合物 X を蓄積させることが示された。*papE* を欠損させた株では、*papABCDEF* 発現菌とほぼ同程度の DMBAP を生産していた。代謝産物を詳細に解析したところ、*papABCDEF* 発現菌で生産されるメチル化された DMBAP が、*papE* を欠損させた株では生産されなくなることが示された。以上の結果から、PapD は 4APhe を化合物 X へと変換し、PapF がこれを DMBAP へと変換し、PapE によりメチル化されるという生合成経路が予想された。

(2) PapD の機能解析

NMR を用いた構造決定により、化合物 X は 3-アミノ-4-(4-アミノフェニル)-2-ブタノン (APB)

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

であることが示された。組換え PapD を用いて様々な条件で酵素反応を行ったところ、基質として、4APhe と Acetyl-CoA を添加した際に APB が生産されることが示された。同位体標識した 4APhe と非標識の Acetyl-CoA を用いて酵素反応を行い、生じた APB を LC-MS/MS 分析した。得られたイオンフラグメントの m/z から、PapD は 4APhe のカルボキシ基を脱炭酸したのち、Acetyl-CoA のアセチル基を転移する、4APhe アセチルトランスフェラーゼであることが示された。また、吸収スペクトルから、本酵素は 330 nm と 415 nm に吸収極大を有する PLP 酵素であることが示された。PapD のアミノ酸配列を基に、分子系統解析を行ったところ、PapD はオキソアミン合成酵素の新たなサブファミリーを構成する新規酵素であることが示された。

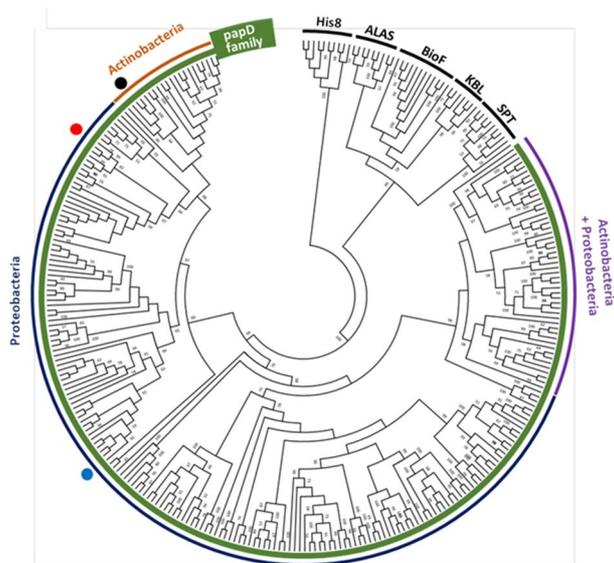


図 1 . PapD の分子系統解析

(3) PapF の機能解析

PapF は、グリシンオキシダーゼと相同性を示す。組換え PapF の吸収スペクトルから、本酵素は 379 nm と 450 nm に吸収極大を有するフラビン酵素であることが示された。組換え PapF は 4APhe および APB を基質としなかったが、APB が重合して生じる還元型のジヒドロピラジンに対しては活性を示し、反応産物として DMBAP を生産することが示された。このような活性を示す FAD 依存酸化酵素はこれまで知られておらず、PapF は新規なジヒドロピラジン酸化酵素であることが示された。

(4) PapE の機能解析

組換え PapE を用いて、S-アデノシルメチオンをメチル基供与体、DMBAP を基質として酵素反応を行ったところ、メチル化 DMBAP が生産された。また、本酵素は APB に対しても活性を示すものの、APB による基質阻害を受けることが明らかとなった ($K_i = 0.16 \pm 0.02$ mM)。

一連の解析から明らかとなった、ピラジン化合物の生合成機構を図 2 に示す。

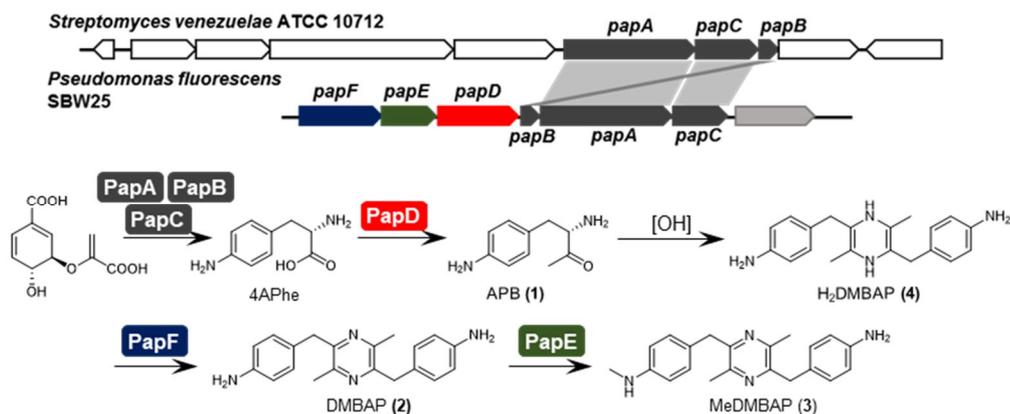


図 2 . ピラジン生合成経路

(5) 変異型 PapD のスクリーニング

PapD の基質特異性を改変・利用することで種々のアミノ酸をアミノケトンへと変換し、これをもとに DMBAP とは側鎖の異なる多様なピラジンを生産することが可能となる。PapD の分子系統解析を基に他生物由来の PapD 様酵素、あるいは部位特異的変異を導入した改変 PapD を調製し基質特異性を調べたものの、4-アミノフェニルアラニン以外のアミノ酸に対し十分な活性を示すものが得られなかった。そこで、ランダム変異による改変酵素のスクリーニングを行った。まず、変異型 PapD を発現する大腸菌ライブラリーおよび 96 ウェルプレートを用いたスクリーニング系を構築した。これを用いて、大腸菌ライブラリー1000 株のスクリーニングを行ったところ、グルタミン酸、アスパラギン酸、リシン、チロシンおよびトリプトファンに活性を示す変

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

異体をそれぞれ 16、12、11、5 および 11 株取得した。しかしながら、精製酵素を用いた活性測定では、いずれの変異型 PapD も目的アミノ酸に対して活性を示さなかった。本スクリーニングの酵素活性測定には CoA-SH の比色定量を用いたが、その反応特異性が低いため擬陽性の株を多数取得してしまったものと予想された。目的の変異型 PapD を取得するためには、より特異性の高い新たなスクリーニング系の構築が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masuo Shunsuke, Tsuda Yusuke, Namai Tomohito, Minakawa Hajime, Shigemoto Ryosuke, Takaya Naoki	4. 巻 21
2. 論文標題 Enzymatic Cascade in Pseudomonas that Produces Pyrazine from Amino Acids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 353 ~ 359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201900448	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Minakawa Hajime, Masuo Shunsuke, Kaneko Tatsuo, Takaya Naoki	4. 巻 77
2. 論文標題 Fermentation and purification of microbial monomer 4-aminocinnamic acid to produce ultra-high performance bioplastics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Process Biochemistry	6. 最初と最後の頁 100 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.procbio.2018.11.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shunsuke Masuo, Yusuke Tsuda, Tomohito Namai, Hajime Minakawa, Naoki Takaya
2. 発表標題 Mechanism of pyrazine biosynthesis in <i>Pseudomonas fluorescens</i> .
3. 学会等名 TGSW2018 Towards Microbial Control ver. 3.0 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎尾俊介、生井智仁、津田祐介、高谷直樹
2. 発表標題 <i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25株のピラジン生合成経路
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎尾俊介
2. 発表標題 ピラジン化合物の生合成経路
3. 学会等名 第5回糸状菌分子生物学研究会若手の会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 榎尾 俊介、高谷 直樹
2. 発表標題 アミノ酸の新たな利用の可能性～有用ピラジン化合物の生合成と代謝工学～
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津田 佑介、 生井 智仁、 榎尾 俊介、高谷 直樹
2. 発表標題 Pseudomonas fluorescens由来のピラジン生合成機構の解明
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ等
<https://www.mics.tsukuba.ac.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------