

令和元年6月10日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18159

研究課題名(和文)アクチノロージンの有機触媒作用に基づく生体触媒成立の分子基盤の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular basis of biocatalysis formation based on the organocatalysis of actinorhodin

研究代表者

西山 辰也(NISHIYAMA, Tatsuya)

日本大学・生物資源科学部・助手

研究者番号：10759541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Streptomyces coelicolorの生産するactinorhodinは有機触媒(触媒作用を持つ金属原子非含有低分子有機化合物)であるが、生理機能は不明である。そこで、本化合物と結合が示唆される蛋白質に着目し、有機触媒の生理機能解明を目指した。本研究では目的蛋白質の精製、同定を行い、遺伝子を決定した。すると、本化合物の生合成クラスター中の遺伝子であると判明した。次にクローニング、大量発現系を構築し、表面プラズモン共鳴法により定量的に結合を観察することに成功した。加えて、他の有機触媒をスクリーニングし、granaticinも有機触媒であることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで微生物から見つかっている有機触媒はACTのみであったが、過去の我々の研究から天然にはACT以外にも有機触媒が存在している可能性が強く示唆されていた。本研究では、自然界の菌から新たな有機触媒の探索に成功し、この予想が正しいことを証明した。ACTや新たな有機触媒グラナチシンは抗生物質として発見された化合物である。すなわち、本研究の成果はこれまで抗生物質としての視点で注目されてきた二次代謝産物を、有機触媒という新たな視点から評価し直し新たな価値を見いだすものであり、近年では困難になりつつある微生物資源の再発掘につながると期待できる。

研究成果の概要(英文)：The actinorhodin produced by Streptomyces coelicolor is an organocatalyst. However its physiological functions are unknown. The organocatalyst is catalysis which is a low molecular mass compound without metal ions. Therefore, we focused on proteins that are suggested to bind to this compound and aimed to elucidate the physiological functions of organic catalysis. In this study we succeeded the purification of this protein, and detected the gene which was one of the actinorhodin gene cluster. Subsequently, we cloned the gene and succeeded in observing binding quantitatively by surface plasmon resonance. In addition, we screened other organocatalysts and found that granaticin is also an organocatalyst.

研究分野：応用微生物学

キーワード：actinorhodin organocatalysts streptomyces antibiotics oxidase

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまでアミノ酸からなる酵素と、RNA(核酸)からなるリボザイムの2種類が生体内で機能する触媒(生体触媒)として知られていた。しかし我々は最近、放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)が生産する二次代謝産物の1つとして知られるアクチノロージン(ACT)が、それだけで(タンパク質等を必要とせず)L-アスコルビン酸およびL-システインの酸化反応を触媒することを発見した(図1)。各種定量分析法を用い、(1)ACTは酸化反応で消費されない、(2)ACTは少量(触媒量)で多量の基質を酸化する、(3)金属分子を含まない、ことを明らかにした。すなわち、ACTは生体触媒として機能しうる最初の有機触媒であることが判明した。

触媒は構成する分子の性状に応じて分類されており、2000年に定義された新しい触媒は有機触媒と呼ばれ、触媒活性を有し、金属を含まない低分子有機化合物を指す。有機触媒は、工業で一般的に使用されている金属触媒と比較して温和な条件下で化学反応を促進できるため、グリーンケミストリーへの応用に関心が高まっている。しかし、生体触媒としての有機触媒は知られていなかった。

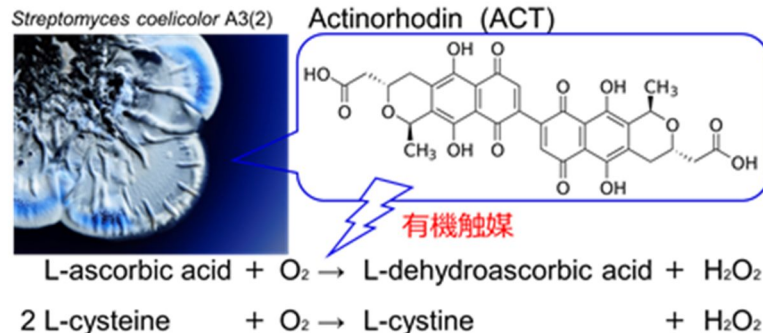


図1 有機触媒アクチノロージン

我々はさらに、ACT以外にも植物由来の天然化合物がACTと同様の触媒活性を有していることを発見・報告した。このことは、今はまだ報告の無い生体触媒としての有機触媒が、広く生物界に存在している可能性を示唆するものである。ACTは放線菌の二次代謝産物の1つである。これまで二次代謝産物は主として抗生物質等としての特性が注目され、その作用が詳しく調べられてきた。一方、我々による発見は、抗生物質の一つと考えられてきたACTに全く新しい作用と役割があることを示している。

加えて、ACTの有機触媒証明実験において、ACTが細胞外タンパク質と相互作用することを示唆する結果が得られた。

### 2. 研究の目的

生体触媒としての有機触媒はACT以外に知られておらず、その機能や生理的・進化的意義は不明である。加えて、二次代謝産物であるACTが細胞外タンパク質と結合するならば、そのような例は知られておらず、低分子タンパク質複合体の新規な機能の発見にもつながる。

そこで、有機触媒の生理機能を解明することを目的として研究を行った。本研究では、ACTと特異的に結合するタンパク質に焦点をあて、(1)その相互作用機序を生化学的・遺伝学的手法により明らかにする。(2)同様の特性を示す低分子-タンパク質複合体の探索を、遺伝子情報を基に行う。これらを通じて生体触媒の成り立ちに関する分子進化の系譜に関する新しい理解を進めることを目的とした。

### 3. 研究の方法

まず、ACTの持つ可視光域の吸光とSDS-PAGEを指標とし、カラムクロマトグラフィーによりACT結合タンパク質を精製した。そして部分アミノ酸配列情報に基づくペプチドマスフィンガープリント法を用いてタンパク質の同定を行なった。*S. coelicolor* A3(2)はモデル放線菌でありゲノム配列が解読されているため、アミノ酸配列情報から遺伝子を特定した。特定された遺伝子を、ACT非生産菌を宿主として大量発現させ、組換えタンパク質を得た。一方でACTはカラムクロマトグラフィーを用いて精製し、これらの結合を検証するため表面プラズモン共鳴装置(biacore)超遠心分析装置を用いて測定した。さらに遺伝学的アプローチで本タンパク質およびACTの生理機能の解明を試みた。まずは本遺伝子の破壊株を相同組換え法で作出し、その表現型の違いを観察した。

さらに天然にはACT以外の有機触媒が存在すると考え、(1)天然から菌を単離しスクリーニングを行なうと同時に、(2)ACT結合タンパク質の遺伝子情報をもとにBlast検索を行い、相同性を示すタンパク質を保有する菌を探索した。

### 4. 研究成果

#### (1)ACT結合タンパク質の精製および同定

ACTとの結合が示唆されるタンパク質を精製し同定した結果、本タンパク質はACT生合成クラスタ中に存在するSC05074タンパク質であると判明した。本タンパク質には細胞外に分泌さ

れるのに必要なシグナル配列が存在していることがアミノ酸配列情報から判明した。

### (2) 遺伝子のクローニングおよび大量発現系構築

SCO5074 は ACT と結合しているためか、ACT 同様に pH 中性で紫色を呈している。ACT と SCO5074 タンパク質の結合を調べる為には、ACT 非含有 SCO5074 タンパク質を獲得する必要がある。そこで、ACT 非生産放線菌を宿主として、*sco5074* 遺伝子のクローニングおよび大量発現を行なった。図 2 は組換え SCO5074 タンパク質を発現、精製した SDS-PAGE の結果である。これより、目的タンパク質の取得に成功した。

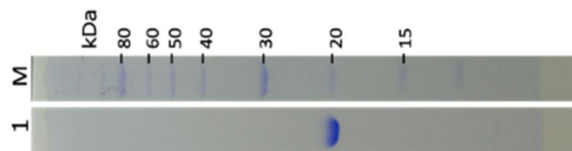


図 2 組換え SCO5074 の SDS-PAGE 結果  
1; 精製した組換え SCO5074,  
M; 分子量マーカー

### (3) ACT と SCO5074 タンパク質の結合

精製した ACT と ACT を含まない組換え SCO5074 とを、表面プラズモン共鳴装置 (biacore) および超遠心分析法を用いて測定した。その結果、結合を観察することに成功し、その測定結果から解離定数  $K_D=100$  nM、結合比 = 1:1 であることが判明した(図 3 )

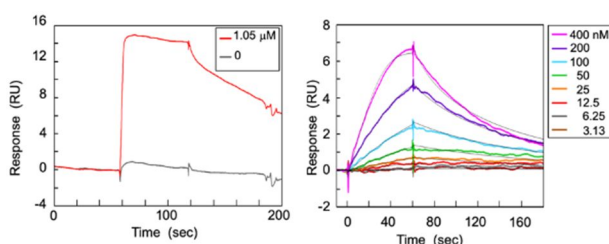


図 3 biacore を用いた組換え SCO5074 と ACT 結合測定結果

### (4) 遺伝子破壊法を用いた有機触媒生理機能解明

ACT との結合が確認された遺伝子を、相同組換えを用いて破壊した。その結果、親株 (WT) では青紫の色素 (ACT) が見られたが、破壊株 (*sco5074*) では赤紫を呈し、ACT 生産が減少した (図 4 )

### (5) 他有機触媒のスクリーニング

新たな有機触媒の探索の結果、約 800 株の菌から顕著な活性を持つ菌を 4 株獲得した。またこの中から 1 株選抜し、有機触媒の精製に成功した。*sco5074* の遺伝子情報を基に新規有機触媒の探索を行った結果では、グラナチシンが有機触媒であると発見した。これは微生物由来有機触媒として 2 例目である。

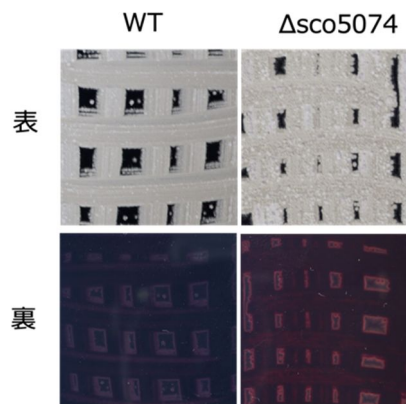


図 4 *S. coelicolor* A3(2) 野生株と *sco5074* 破壊株の表現型

WT; *S. coelicolor* A(3)2,  
*sco5074*; *S. coelicolor* A(3)2 *sco5074*

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

西山 辰也, 榎本 成美, 長安 伶奈, 高野 英晃, 上田 賢志、放線菌 *Streptomyces vietnamensis* の生産するグラナチシンも有機触媒である、2019, 3, 26、本農芸化学会 2019 年度大会、東京農業大学 (東京)

西山 辰也, 榎本 成美, 長安 伶奈, 高野 英晃, 上田 賢志、グラナチシンも有機触媒である、2018, 9, 12 第 33 回日本放線菌学会大会、武蔵野大学 (東京)

西山 辰也, 橋本 義輝, 高野 英晃, 熊野 匠人, 小林 達彦, 上田 賢志、アクチノロージンと結合する放線菌由来分泌タンパク質、2018, 3, 17、日本農芸化学会 2018 年度大会、名城大学 (名古屋)

西山 辰也, 橋本 義輝, 高野 英晃, 熊野 匠人, 小林 達彦, 上田 賢志、アクチノロージンに結合する分泌タンパク質、2017, 9, 8、第 32 回日本放線菌学会大会、若里市民文化ホー

ル(長野)

Tatsuya Nishiyama, Yoshiteru Hashimoto, Hideaki Takano, Takuto Kumano, Kenji Ueda, and Michihiko Kobayashi, Actinorhodin is an Organocatalyst, the 18th International Symposium on the Biology of Actinomycetes (ISBA18)、2017,05,25、韓国(濟州)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。