

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580082
 研究課題名（和文） 3-アミノ 4-ヒドロキシ安息香酸を前駆体とする化合物の生合成遺伝子群の解析
 研究課題名（英文） Characterization of biosynthetic gene clusters for secondary metabolites synthesized from 3-amino 4-hydroxybenzoic acid
 研究代表者
 大西 康夫 (OHNISHI YASUO)
 東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
 研究者番号：90292789

研究成果の概要：

3-ヒドロキシ 4-アミノ安息香酸 (3,4-AHBA) 合成酵素遺伝子配列を利用して、3,4-AHBA から生合成される2つの化合物の生合成遺伝群を2種の放線菌より取得し、種々の解析を行った。その結果、新規な2-アミノフェノールニトロソ化酵素を含む生合成酵素群による4-ヒドロキシ-3-ニトロソベンズアミド生合成経路の全貌を明らかできた。また、フェロヴェルディン生合成に関与する遺伝子群をほぼ特定し、その生合成経路を推定できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：抗生物質生産

1. 研究開始当初の背景

地球上には、極めて多様性に富んだ構造をもつ低分子化合物を“二次代謝産物”として生産する多種多様な微生物が存在している。それゆえ、人類は抗生物質等の生理活性物質の多くを微生物二次代謝産物から発見することができ、それらを“薬”として利用してきた。既知の天然生理活性物質（9,000種以上）のうち約6割は、放線菌と呼ばれる一群の微生物が生産しており、放線菌の二次代謝産物生産能の高さには目を見張るものがある。放線菌が“天然の化合物貯蔵庫”と言わ

れる所以である。一方、様々な低分子化合物を合成するためには様々な酵素が必要であるため、放線菌はユニークな反応を触媒する新規酵素の宝庫でもある。有機合成では困難な反応を触媒する新規酵素の発見は、酵素学・生物化学上、基礎的に重要であるだけでなく、微生物を用いた“ものづくり”という応用研究においても重要である。研究代表者はこれまで、ユニークな反応を触媒する新規酵素遺伝子を取得し、その反応機構の解明ならびに“ものづくり”への応用について研究を行ってきたが、さらに新たな反応を触媒する新規酵素遺伝子を取得し解析することを

大きな目標として、3,4-AHBA 合成酵素遺伝子を含む、2つの新規二次代謝生合成遺伝子クラスターの取得・解析を計画した。放線菌の二次代謝関連酵素に関する解析は、国内外で盛んに研究が行われているが、以下に述べるように本研究対象の化合物に関しては研究がほとんどあるいは全く行われていなかった。

4-ヒドロキシ-3-ニトロソベンズアミド (4,3-HNBAm) は3分子で Fe^{2+} をキレートする化合物であるが、この Fe^{2+} キレーターは放線菌が生産する緑色色素として単離された。その後、本化合物の前駆体が 3,4-AHBA であることが示され、3,4-AHBA の生合成経路解明のため安定同位体の取り込み実験が行われたが、生合成遺伝子については全く報告がなかった。一方、フェロヴェルディン (ferroverdin, FV) は放線菌が生産する緑色色素として、50年以上も前に発見された化合物であるが、近年、北里大学の供田らによって、コレステロールエステル転移蛋白の阻害剤として再発見された。供田らは3つの類縁体を同定し、フェロヴェルディン A-C と命名した。本化合物の生合成に関しては全く報告がないが、4,3-HNBAm と同様、3,4-AHBA が生合成の前駆体となっている可能性が極めて高いと考えられた。3,4-AHBA は放線菌 *Streptomyces griseus* が生産する黄色色素グリキサゾン (GX) の生合成前駆体でもあり、研究代表者のグループが世界に先駆けてその生合成酵素を明らかにしたばかりであった。

2. 研究の目的

Streptomyces murayamaensis の 4,3-HNBAm 生合成遺伝子群および *Streptomyces* sp. WK 5344 の FV 生合成遺伝子群を取得し、その解析を通して、両化合物の生合成経路、生合成酵素を明らかにすることが本研究の第一の目的である。研究代表者が発見した 3,4-AHBA 合成酵素遺伝子が広く放線菌に分布し、実際に 3,4-AHBA の合成に使われていることを示すことも本研究の目的の1つである。また、ユニークな反応を触媒する新規酵素の取得が期待できるが、将来的には、このような酵素を有用物質生産に応用することを視野に入れて研究を進める。

3. 研究の方法

研究代表者は GX の生合成研究において、3,4-AHBA の生合成酵素遺伝子 *gril*, *grIH* を発見したが、この発見によって、3,4-AHBA を前駆体とする化合物の生合成遺伝子群取得

の道が一気に拓けた。放線菌において、二次代謝産物の生合成遺伝子群は染色体上でまとまって(「クラスター」として)存在しているため、3,4-AHBA 生合成酵素遺伝子をプローブに用いることで、3,4-AHBA を前駆体とする化合物の生合成遺伝子群をクローニングすることができる。本研究では、以下に述べるようにして、4,3-HNBAm および FV 生合成遺伝子群を取得し、機能解析を行った。

(1) 生合成遺伝子群の取得

grIH 相同遺伝子断片のクローニング

S. griseus の *grIH* およびそのホモログ遺伝子の塩基配列を元に設計したプライマーを用いて、*S. murayamaensis* および *Streptomyces* sp. WK 5344 より、*grIH* 相同遺伝子断片を PCR クローニングした。本 DNA 断片をプローブとしたサザン解析により、両株はそれぞれ1つだけ *grIH* 相同遺伝子をもつことが示された。

pTOYAMAcos を用いた生合成遺伝子群のクローニング

pTOYAMAcos はコスミドベクターとして 30-40 kb の DNA 断片を大腸菌にクローニングできるが、接合によってそのまま大腸菌から放線菌に導入でき、放線菌染色体に組み込まれるという非常に便利なツールである。両株のクロモソームより pTOYAMAcos コスミドライブラリーを作製し、それぞれの *grIH* 相同遺伝子をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションによって、*grIH* 相同遺伝子を含む 30-40 kb 程度の DNA 断片を複数個取得した。

塩基配列の決定

取得したコスミド DNA の制限酵素マップ作製、サザン解析、部分塩基配列決定により、*grIH* 遺伝子が挿入 DNA 断片のほぼ中央に位置し、生合成遺伝子クラスター全長が含まれると思われるコスミドクローンを選抜し、全塩基配列を決定した。

(2) 異種放線菌での 4,3-HNBAm および FV の生産

生合成遺伝子クラスターは 4,3-HNBAm では 8 kb 以内、FV でも 20 kb 以内と予想されるため pTOYAMAcos に生合成遺伝子クラスター全長を組み込むことが可能であり、このようなベクターを放線菌 *Streptomyces lividans* に導入することによって、異種宿主における 4,3-HNBAm および FV の生産が期待できる。また、生合成遺伝子群のサブクローニングによって、両化合物の生産に必要な遺伝子を絞り込むことができる。まず、このような手法により、確かに両生合成遺伝子クラスターをクローニングできていることを確認することにした。

(3) 生合成経路、生合成酵素の解析

異種発現系を用いた *in vivo* 解析および組換えタンパク質を用いた *in vitro* 反応の解

析等によって、4,3 HNBA_m および FV の生合成経路の解明を目指した。

4. 研究成果

(1) 4,3 HNBA_m 生合成経路に関する解析

4,3 HNBA_m 生合成遺伝子クラスターの取得

3(1)に記述した方法により、4,3 HNBA_m 生合成遺伝子群を含むと考えられる 30 kb の挿入断片をもつコスミドを取得し、塩基配列を決定した。*gril*, *griH* ホモログを含む 25 個の ORF が見出された。

4,3 HNBA_m 生合成遺伝子の特定

S. lividans の染色体 DNA に上記のコスミドを組み込んだ株を作製し、種々の検討を行ったが、4,3 HNBA_m の生産は確認できなかった。そこで、高コピー数プラスミドである pIJ702 の *mel* プロモーターの下流に 4,3 HNBA_m 生合成に関与すると考えられる遺伝子を連結し、これを *S. lividans* に導入して、4,3 HNBA_m 生産を試みた。その結果、*nspI*, *nspH*, *nspE*, *nspF*, *nspN* と命名した 5 つの遺伝子だけで、4,3 HNBA_m が生産されることが明らかになった。*nspI*, *nspH* は *Gril* および *GriH* のホモログをそれぞれコードする遺伝子である。この 5 つの遺伝子は、*S. murayamaensis* 染色体上、この順で同一向きに並んで存在しており、1 つの転写単位を構成していると推定される。また、*nspI* の上流には、同じ向きにアスパラギン酸キナーゼホモログ (*GriJ* ホモログ) をコードする *nspJ* が存在しており、*nspJ* も *nspIHEFN* と同一転写単位であると考えられる。*S. griseus* の *GriJ* と同様、このアスパラギン酸キナーゼホモログは、3,4 AHBA 合成の基質となるアスパラギン酸セミアルデヒドの供給に関与していると考えられる。一方、*nspN* の下流にも 31 bp 隔てて同じ向きにもう 1 つの ORF が存在する。この ORF も *nspIHEFN* と同一の転写単位である可能性が高い。この ORF はカルボキシエステラーゼホモログをコードしているが、この ORF を含めて *nspIHEFN* を発現させても、*nspIHEFN* だけの時と全く同様に 4,3 HNBA_m が生産されたことから、この ORF は少なくとも直接的には 4,3 HNBA_m 生産には関与していないと結論した。

一方、*nspI*, *nspH* の 2 つの遺伝子の発現によって、予想通り 3,4 AHBA が生産されることを確認した。さらに、*nspI*, *nspH*, *nspE*, *nspF* の 4 つの遺伝子の発現では、3,4 AHBA のアミノ基がニトロソ化された化合物、4-ヒドロキシ-3-ニトロソ安息香酸 (4,3 HNBA) が検出された。この結果より、*nspE*, *nspF* は 3,4 AHBA のアミノ基のニトロソ化を触媒できることが強く示唆された。*NspF*, *NspE* はチロシナーゼおよびそのコファクターのホモ

ログであるが、*NspF* は新規の芳香族アミンニトロソ化酵素であることが示唆された。一方、*NspN* はアスパラギン合成酵素ホモログであり、この酵素によって、3,4 AHBA のカルボン酸がアミド化されていることが予想されたが、*NspF* と *NspN* のいずれが先に 3,4 AHBA に作用するのかについては、この時点では不明であった。

NspF の基質特性に関する解析

大腸菌で生産、精製した組換え *NspF* タンパク質を用いた *in vitro* ニトロソ化反応によって、*NspF* の基質特異性に関して解析を行った。以下のことが明らかになった。

・3-アミノ-4-ヒドロキシベンズアミド (3,4 AHBA_m) 3,4 AHBA に対する K_{cat}/K_m はそれぞれ、 25000 ± 2400 , 25 ± 1 であり、*NspF* の基質として、3,4 AHBA_m は 3,4 AHBA に比べて格段に優れていた。

・2-アミノフェノールを基質とした時は、2-ニトロソフェノールではなく、キノニンミンが生成した。また、4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸は基質にならず、3-アミノ-4-ヒドロキシベンズアルデヒド (3,4 AHBA_L)、3-アミノ-4-ヒドロキシベンゼンスルホン酸は基質となったことから、2-アミノフェノールの水酸基のパラ位に置換基があることが、アミノ基のニトロソ化に重要であると考えられる。

・*NspF* はチロシナーゼホモログであるが、チロシナーゼ活性 (モノフェノールオキシダーゼ活性) は有さず、2-アミノフェノール類以外の芳香族アミンは基質にならなかった。

NspN の基質特性に関する解析

NspN は大腸菌では活性のある形で生産することができなかったため、*S. lividans* において生産させた組換え *NspN* タンパク質を用いた *in vitro* 反応によって、その基質特性について解析した。その結果、以下のことが明らかになった。

・*NspN* はグルタミンをアミノ供与体とし、ATP の存在下、3,4 AHBA を効率よく 3,4 AHBA_m に変換した。

・4,3 HNBA を基質とした場合には、アミド化反応は全く進行しなかった。

・アスパラギン酸セミアルデヒドも基質にはなかった。

・安息香酸や桂皮酸などは、*NspN* により、カルボン酸がアミド化されたため、*NspN* の基質特性は、それなりに寛容であると考えられる。

結論・考察

異種発現系を利用した *in vivo* 解析により、4,3 HNBA_m の生合成に必要な 5 つの遺伝子 *nspI*, *nspH*, *nspE*, *nspF*, *nspN* が明らかになり、(i) *Gril*, *GriH* のホモログである *NspI*, *NspH* による 3,4 AHBA の合成、(ii) チロシナーゼおよびそのコファクターのホモログで

ある NspF, NspE によるアミノ基のニトロソ化、(iii) アスパラギン合成酵素ホモログである NspN によるカルボキシル基のアミド化、が示された。さらに、組換えタンパク質を用いた NspF, NspN の基質特性の解析結果より、3,4-AHBA はまず NspN により、3,4-AHBAm に変換され、ついで NspF によって、4,3-HNBAm に変換されることが強く示唆された。このようにして、4,3-HNBAm の生合成経路、生合成酵素が明らかになった。

研究代表者は、*S. griseus* の GX 生合成においては、3,4-AHBA は GriC, GriD に 3,4-AHBAL に変換された後、チロシナーゼおよびそのコファクターホモログである GriF, GriE によって、キノイミン体に酸化されることをすでに明らかにしていた。NspF および GriF について、3,4-AHBAL を基質に速度論解析を行った結果、両者ともニトロソフェノール生成およびキノイミン生成の両反応を触媒できるが、NspF は前者を、GriF は後者を好むことが明らかになり、両酵素の *in vivo* での触媒反応通りの結果となった。両者とも 2-アミノフェノール類を主な基質とする酵素であり、2-アミノフェノールオキシダーゼといえることができるが、特に NspF はアミノ基のニトロソ化を効率よく触媒する点で、新規の 2-アミノフェノールオキシダーゼ (nitroso-forming 2 aminophenol oxidase) と言える。NspF は芳香族アミンのニトロソ化酵素の初めての例である。NspF と GriF の起源は共通であり、それぞれの機能に適した構造に進化したと考えられるが、それぞれの反応の分子機構に大変興味をもたれる。

(2) FV 生合成経路に関する解析

FV 生合成遺伝子クラスターの取得

3(1) に記述した方法により、FV 生合成遺伝子群を含むと考えられる 42 kb の挿入断片をもつコスミドを取得し、塩基配列を決定した。GriI, GriH ホモログを含む 38 個の ORF が見出された。

FV 生合成遺伝子クラスター組み込み株での FV 生産

S. lividans の染色体 DNA に上記のコスミドを組み込んだ株を作製したが、この株では FV の生産は確認できなかった。*gril*, *griH* ホモログ遺伝子 (*fevI*, *fevH* と命名) の周辺には GX 生合成遺伝子群の経路特異的転写活性化因子 (SARP family) である GriR と 42% の相同性を示すタンパク質をコードする遺伝子 (*fevR* と命名) が存在し、FevR が FV 生合成遺伝子群の経路特異的転写活性化因子であると予想された。そこで *fevR* をチオストレプトン誘導性プロモーターの下流に配置した高コピー数プラスミドを、取得したコスミド組み込み *S. lividans* 株に導入し、*fevR* の強制発現を試みたところ、FV の生産

が確認できた。よって、取得した 42 kb の DNA 断片中に FV 生合成遺伝子群がすべて含まれていることが明らかになった。

一方、*fevI*, *fevH* を *S. lividans* で発現させたところ、予想通り、3,4-AHBA が生産された。

結論・考察

取得した 42 kb の DNA 断片中の *fevI*, *fevH* 周辺の遺伝子によって、3,4-AHBA から FV が生合成されると考えられる。FV 生合成においても 4,3-HNBAm と同様に 3,4-AHBA のアミノ基のニトロソ化が必要であるが、本研究によって 4,3-HNBAm のニトロソ化に関与することが明らかになった NspE, NspF のホモログをコードする遺伝子 (*fevE*, *fevF* と命名) が *fevI*, *fevH* 周辺にコードされている。また、FV におけるビニルフェノールユニットの生合成に関与すると考えられる酵素群も見出された。さらに、3,4-AHBA からなるユニットとビニルフェノールユニットのエステル結合に関与すると考えられる遺伝子についても予想することができた。一方、*fevR* を強制発現させた FV 生合成遺伝子組み込み *S. lividans* 株の解析によって、生合成中間体と考えられる化合物の検出にも成功している。以上のように、FV 生合成経路および生合成酵素に関する重要な知見が得られた。近い将来、その全貌を解明できると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 1 件)

Streptomyces murayamaensis の 4-hydroxy-3-nitrosobenzamide 生合成経路の解明

野口秋雄、北村武史、尾仲宏康、大西康夫、堀之内未治

日本放線菌学会 2009 年度大会

2009 年 7 月 16-17 日 (秋田)

(発表予定)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 康夫 (OHNISHI YASUO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし