

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05776

研究課題名(和文) 非タンパク性アミノ酸を独創する微生物酵素研究とその応用利用

研究課題名(英文) Research on microbial enzymes that create non-protein amino acids and their applications

研究代表者

丸山 千登勢 (Maruyama, Chitose)

福井県立大学・生物資源学部・准教授

研究者番号：20452120

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)：非タンパク性アミノ酸(NPAA)は、生体内においてアミノ酸代謝中間体や神経伝達物質として機能するだけでなく、生物組織や天然有機化合物の構成成分として機能している。NPAAの最大の魅力は、その化学構造と物性に起因するユニークな生理活性であり、ペプチド創薬の分野において、今後さらにNPAAの需要が拡大すると考えられる。そこで我々は、NPAAの新たな探索資源として、微生物が生産するペプチド系二次代謝産物の構造多様性に着目し、3つのNPAAからなるペプチド化合物resormycin(RM)の生合成機構を解明を目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の創薬研究では、これまでに解明された生体メカニズムを基に標的分子(タンパク質)に対して作用する医薬品を、合理的に設計する「分子標的治療薬の創成」が試みられている。特にペプチドや抗体などの中分子ペプチド創薬への期待が高まっている。申請者らが提案するNPAAのペプチド・抗体創薬分野への利用は、中分子ペプチドの構造多様性創出に寄与することができ、さらにはプロテアーゼによる分解を阻害するなどの知見からも、新規中分子ペプチド創薬の開発を加速することが期待される。

研究成果の概要(英文)： Nonproteinogenic amino acids (NPAA) have a crucial role as intermediates of amino acid metabolism, neurotransmitters in vivo, and components of natural products. We aim to discover the novel NPAAs and the valuable enzymes involved in the NPAA biosynthesis via the study of peptide natural product biosynthesis. The most significant feature of NPAA is its unique bioactivity due to its chemical structure and physical properties. Moreover, the biosynthetic enzymes involved in the NPAA formation are worthy of academic interest and industrial use. Therefore, in peptide-drug discovery, the demand for NPAAs and NPAA biosynthetic enzymes is expected to expand in the future further. Thus, we focused on the structural diversity of peptide natural products produced by microorganisms as a new exploratory resource for NPAAs.

研究分野：応用微生物学

キーワード：非タンパク性アミノ酸 二次代謝産物 生合成

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまでに140以上のNPAAが生物から同定されている。これらは、生体内においてアミノ酸代謝中間体や神経伝達物質として機能するだけでなく、生物組織や天然有機化合物の構成成分として機能している。NPAAの最大の魅力は、その化学構造と物性に起因するユニークな生理活性であるが、合成化学における重要な中間原料としての役割も大きい。しかし、その多くが有機合成によって供給されており、一般的に高価であることが最大の欠点である。

しかしながら、NPAAを活用したペプチド創薬は、構造多様性を与えるだけでなく、プロテアーゼによる分解を阻害するなどの知見から、今後さらにNPAAの需要が拡大すると考えられる。またNPAA生合成酵素は、アミノ酸に対して特異的な反応を触媒することから、様々な疾病に起因する血中アミノ酸濃度変化を迅速測定するための臨床検査への応用が期待される。そこで申請者らは、NPAAの新たな探索資源および安価な供給資源、さらには臨床上有用なアミノ酸修飾酵素の探索資源として、微生物が生産するペプチド系二次代謝産物の多様性に着目した。本研究では、resormycin (RM) 生合成機構の解明と、NPAA生合成酵素の機能解析および臨床応用を目指した。

### 2. 研究の目的

3つのNPAA (Phe誘導体、hydroxy-L-Val、 $\beta$ -homolysine) から構成されるペプチド化合物RMは、*Streptomyces* 属放線菌が生産する植物病原真菌特異的な抗生物質である。構成成分の一つである $\beta$ -homolysineは、有機合成品が医薬品の合成原料やアミノ酸アナログとして市販されているが、天然物からは見つかっておらず、RMは数少ない天然由来 $\beta$ -homolysine含有化合物である。これまでに $\beta$ -homolysine生合成に関する研究報告はなく、 $\beta$ -homolysineは新規経路によって生合成される可能性が示唆された。またL-Valのメチル化、水酸化誘導体は、数多くの天然有機化合物に含まれており、生理活性に重要な役割を担っているが、L-Valのメチル化および水酸化酵素が実際に同定された例は少ない。これら修飾酵素は、創薬研究においてペプチド系化合物の多様性創出に有用だけでなく、臨床分野においてもアミノ酸濃度測定法への活用が期待されている。さらにPhe修飾酵素については、フェニルケトン尿症の診断薬として臨床利用されるなど、需要が高い。本研究で明らかにするRM生合成機構は、このような学術的、工業的に価値の高いNPAAおよびNPAA生合成酵素を新たに創造すると期待している。そこで本研究では、次の3つの研究項目を3年の研究計画で進めた。

研究項目(1) RM生合成遺伝子群の同定および機能解析

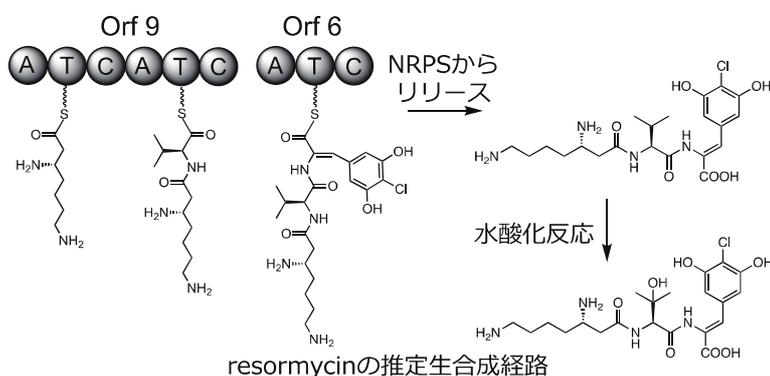
研究項目(2)  $\beta$ -homolysineの発酵生産法の確立

研究項目(3) Phe誘導体生合成酵素群の血液中アミノ酸濃度測定法への応用研究

### 3. 研究の方法

#### (1) RM生合成遺伝子群の同定および機能解析

RM生産菌のドラフトゲノム情報をAntiSMASHにて解析し、RM生合成に関与する遺伝子群を探索したところ、2つの非リボソーム型ペプチド合成酵素(NRPS)遺伝子を含む約50 kbpの遺伝子群を見出した。これらNRPSが持つ、基質アミノ酸の活性化を触媒するアデニル化ドメイン(Aドメイン)について、組換え酵素を用いて基質特異性を調べたところ、2つのAドメインがそれぞれ、L-Valと $\beta$ -homolysineを特異的に認識することを明らかにした。よってRMのペプチド構造がNRPSによって生合成されると予想された。また本遺伝子群にはNRPS遺伝子の他に、Pheのクロル化や水酸化に関わる遺伝子も含まれており、RM生合成遺伝子群であると予想された。そこで本研究項目では、本研究で見出した約50 kbpのゲノム断片をBACベクターへクローニングし、resormycinを生産しない異種放線菌を宿主とした異種発現を行った。



#### (2) $\beta$ -homolysineの発酵生産法の確立

申請者が見出した遺伝子群の機能推定から、 $\beta$ -homolysineの生合成酵素遺伝子を探索したところ、L-Lysを基質とする酵素遺伝子はlysine-2,3-aminomutase遺伝子の他にはなく、 $\beta$ -homolysineの炭素骨格がL-Lysに由来しない可能性が考えられた。しかし興味深いことに、本遺伝子群には、agmatineを加水分解し、putrescineとureaを形成する酵素agmatinaseに相同性を示す酵素遺伝子が存在したことから、 $\beta$ -homolysineがputrescineに由来することが予想された。そこで本研究項目では、 $\beta$ -homolysine生合成に関わる酵素遺伝子を同定し、放線菌を

宿主とした発酵生産菌の分子育種を試みた。

### (3) Phe 誘導体生合成酵素群の血液中アミノ酸濃度測定法への応用研究

フェニルケトン尿症やメープルシロップ尿症は、Phe や Val などの分岐鎖アミノ酸の代謝異常に起因する先天性代謝異常症であり、重篤な発達障害を引き起こす。これらの診断方法の一つとして、血液中アミノ酸濃度測定法が適応されており、RM 生合成研究から明らかにする Phe 誘導体や hydroxy-L-Val の生合成酵素は、上記の診断キットの開発に有用であることが予想される。そこで、これら生合成酵素の同定と反応条件の最適化、酵素安定性の向上によるキット開発の基盤研究を行った。

## 4. 研究成果

### (1) RM 生合成遺伝子群の同定および機能解析

RM 生産菌のドラフトゲノム情報より見出した約 50 kbp のゲノム断片を BAC ベクターにクローニングし、RM を生産しない異種放線菌を宿主とした異種発現実験を行った。その結果、RM を生産蓄積することが判明した。このことから、本研究で取得したゲノム断片には RM 生合成に関わる全ての遺伝子セットが含まれていることを明らかにし、本ゲノム断片を RM 遺伝子群とした。RM 遺伝子群について、遺伝子破壊実験および組換え酵素を用いた機能解析の結果から、(1)RM のペプチド構造が NRPS によって生合成されること、(2) -homolysine が生合成中間体として生合成された後に RM へと取り込まれること、(3)L-Val 水酸化反応はペプチド構造が形成された後に触媒されることを明らかにした。

### (2) -homolysine の発酵生産法の確立

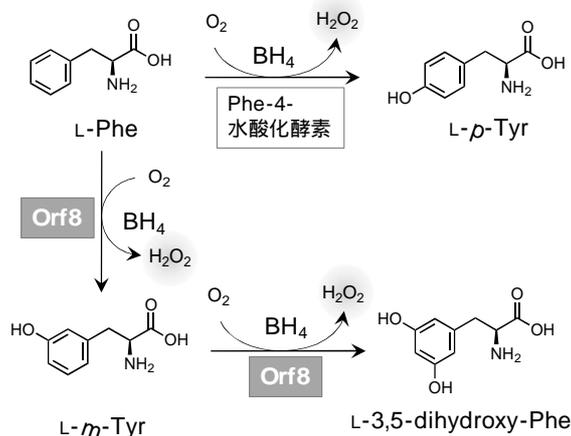
RM 遺伝子群の各遺伝子を破壊し、RM 生合成中間体の探索による機能解析を行った結果、NRPS 遺伝子破壊株において、RM の生産性が完全に消失し、-homolysine が生合成中間体として生産蓄積されることを明らかにした。このことから、各遺伝子破壊株において、-homolysine の生産蓄積を調べることにより、-homolysine 生合成に関わる酵素遺伝子を選抜できると考えた。実際に -homolysine 生産性の消失を指標とした遺伝子破壊実験から、RM 遺伝子群の 7 つの酵素遺伝子に絞り込むことができた。さらにこれらの 7 つの遺伝子について機能推定したところ、その一つである Orf14 が、L-Arg の代謝物である agmatine を putrescine に変換する agmatinase に相同性を示すことを明らかにし、-homolysine が L-Arg から生合成される可能性を見出した。

そこで、-homolysine を生産蓄積する NRPS 遺伝子破壊株に、<sup>13</sup>C-L-Arg を用いた添加培養実験を行い、生成物を HPLC/HR-TOF-MS<sup>2</sup> にて分析したところ、<sup>13</sup>C-L-Arg 由来の putrescine が、RM の -homolysine 分子内に取り込まれた可能性が強く示唆された。このことから、-homolysine は、これまでに報告のない、新規経路にて生合成される可能性を導くことができた。

### (3) Phe 誘導体生合成酵素群の血液中アミノ酸濃度測定法への応用研究

RM 構造内の Phe 誘導体は、その化学構造から、ベンゼン環に 1 箇所のクロル化と 2 箇所の水酸化、また 位の脱プロトン化の触媒を受けて生合成されると予想された。そこでこれらの修飾反応を触媒する酵素遺伝子を探索したところ、halogenase に相同性を示す *orf5* と、Phe の 位を水酸化に関わる *orf7* および *orf16* を見出した。しかしながら、Phe 誘導体には 2 箇所の水酸基が存在するが、興味深いことに、本遺伝子群には Phe-4-水酸化酵素に相同性を示す酵素遺伝子は *orf8* 遺伝子一つしか存在しなかった。そこで Phe-4-水酸化酵素で報告されている反応組成を参考に、Orf8 組換え酵素を用いた *in vitro* 反応を試みたところ、Phe を基質に 2 箇所の水酸化反応を触媒した。したがって Orf8 は、既存の Phe 水酸化酵素群と同様に、5,6,7,8-tetrahydropteridine (BH<sub>4</sub>) を補酵素とする水酸化酵素であるが、1 つの酵素で 2 度の水酸化反応を触媒する新規 Phe 水酸化酵素であることが判明した。すなわち、これまでの Phe 定量用酵素と比較して、2 倍の酵素活性を示す高感度な Phe 診断用酵素としての開発が期待された。

そこで、さらに詳細に Orf8 の機能を調べるために、既存の Phe-4-水酸化酵素 (Tyr 合成酵素) の X 線結晶構造解析をもとに、Orf8 のモデリング解析を行なったところ、Phe-4-水酸化酵素や Phe-3-水酸化酵素で高く保存されている活性残基はよく保存されていたが、水酸化部位の決定に重要なアミノ酸残基はいずれの既存酵素にも一致せず、基質である Phe のベンゼン環周辺に広い空間を形成する可能性が考えられた。この領域のアミノ酸残基の違いが、Orf8 の水酸化部位選択性に重要であることが強く示唆された。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Kudo Fumitaka, Minato Atsushi, Sato Shusuke, Nagano Nayuta, Maruyama Chitose, Hamano Yoshimitsu, Hashimoto Junko, Kozone Ikuko, Shin-ya Kazuo, Eguchi Tadashi	4. 巻 24
2. 論文標題 Mechanism of S-Adenosyl-L-methionine C-Methylation by Cobalamin-dependent Radical S-Adenosyl-L-methionine Methylase in 1-Amino-2-methylcyclopropanecarboxylic Acid Biosynthesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 8975 ~ 8979
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.2c03555	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 -
1. 著者名 丸山千登勢、濱野吉十	4. 巻 84
2. 論文標題 バクテリア由来1-amino-2-methylcyclopropanecarboxylic acid生成に関わるSAM C-メチル化酵素	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 酵素工学ニュース	6. 最初と最後の頁 22-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -
1. 著者名 Maruyama Chitose, Hamano Yoshimitsu	4. 巻 59
2. 論文標題 tRNA-dependent amide bond-forming enzymes in peptide natural product biosynthesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Opinion in Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 164 ~ 171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbpa.2020.08.002	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 -

1. 著者名 Maruyama Chitose, Chinone Yukiko, Sato Shusuke, Kudo Fumitaka, Ohsawa Kosuke, Kubota Junya, Hashimoto Junko, Kozone Ikuko, Doi Takayuki, Shin-ya Kazuo, Eguchi Tadashi, Hamano Yoshimitsu	4. 巻 10
2. 論文標題 C-Methylation of S-adenosyl-L-Methionine Occurs Prior to Cyclopropanation in the Biosynthesis of 1-Amino-2-Methylcyclopropanecarboxylic Acid (Norcoronamic Acid) in a Bacterium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 775 ~ 775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10050775	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 MARUYAMA Chitose	4. 巻 58
2. 論文標題 Novel Compounds Generated by Combinatorial Biosynthesis Using the Streptothricin Biosynthetic Enzymes: Biosynthetic Enzymes Found from Underused Antibiotics Are Useful!	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 KAGAKU TO SEIBUTSU	6. 最初と最後の頁 217 ~ 222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1271/kagakutoseibutsu.58.217	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13件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 岸千紘, 小笠原泰志, 山中一也, 五十嵐雅之, 大和徹, 濱野吉十, 丸山千登勢
2. 発表標題 抗生物質resormycin生合成遺伝子群に見出したPhenylalanine水酸化酵素の機能解析
3. 学会等名 日本放線菌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内山駿, 丸山千登勢, 橋本絢子, 隅田奈緒美, 米沢実, 新家一男, 濱野吉十
2. 発表標題 streptothricin 類縁化合物 SF-2111B が有する O-acylpeptide 構造の生合成機構解明
3. 学会等名 日本放線菌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岸千紘, 山中一也, 五十嵐雅之, 濱野吉十, 丸山千登勢
2. 発表標題 抗生物質 resormycin 生合成遺伝子群に見出したPhenylalanine水酸化酵素の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岸千紘, 丸山千登勢, 山中一也, 五十嵐雅之, 濱野吉十
2. 発表標題 抗生物質 resormycin 生合成遺伝子群に見出したPhenylalanine水酸化酵素の機能解析
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岸千紘, 丸山千登勢, 山中一也, 五十嵐雅之, 濱野吉十
2. 発表標題 抗生物質 resormycin 生合成遺伝子群に見出したPhenylalanine水酸化酵素の機能解析
3. 学会等名 日本放線菌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岸千紘, 丸山千登勢, 山中一也, 五十嵐雅之, 濱野吉十
2. 発表標題 抗生物質 resormycin 生合成遺伝子群に見出したPhenylalanine水酸化酵素の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 茅根千湖, 山中一也, 五十嵐雅之, 濱野吉十, 丸山千登勢
2. 発表標題 抗生物質 resormycinの生合成遺伝子群の同定および機能解析
3. 学会等名 2019年度日本放線菌学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 兼田康平, 武内大和, 加藤康夫, 丸山千登勢, 濱野吉十
2. 発表標題 細胞膜透過に寄与する抗生物質streptothricinのoligo(beta-Lys)構造
3. 学会等名 2019年度日本放線菌学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 兼田康平, 武内大和, 加藤康夫, 丸山千登勢, 濱野吉十
2. 発表標題 生体膜透過性・水溶性の一挙改善を志向した機能性低分子化合物のoligo(beta-Lys)修飾
3. 学会等名 日本生物工学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chitose Maruyama
2. 発表標題 Biosynthesis of peptide natural products
3. 学会等名 The 4th A3 Foresight Symposium on Chemical & Synthetic Biology of Natural Products 2019 meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukiko Chinone, Yoshimitsu Hamano, Junko Hashimoto, Ikuko Kozone, Kazuo Shin-ya, Chitose Maruyama
2. 発表標題 Identification and characterization of bacterial 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase
3. 学会等名 The 4th A3 Foresight Symposium on Chemical & Synthetic Biology of Natural Products 2019 meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukiko Chinone, Chitose Maruyama, Yoshimitsu Hamano
2. 発表標題 Identification and characterization of bacterial 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase
3. 学会等名 The 14th Asian Congress on Biotechnology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸山千登勢, 濱野吉十
2. 発表標題 streptothricin類縁抗生物質の生合成酵素群に見出した新規アミド合成酵素
3. 学会等名 第19回日本タンパク質科学会年会ワークショップ「天然物生合成の構造生物学と合成生物学の協奏」(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------