

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012

課題番号：24651235

研究課題名（和文） ゲノムデータベースの精査による補酵素類の新規生合成経路の予測と検証

研究課題名（英文） Estimation of an alternative biosynthetic pathway for co-factors by close investigation of genome databases.

研究代表者

大利 徹 (DAIRI TOHRU)

北海道大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：70264679

研究成果の概要（和文）：ゲノムデータベースの精査により新規経路・酵素の存在を予測し、その検証を行った。具体的には、①*Nitrosomonas eutropha* では 4-アミノ安息香酸の合成に機能未知の NE1434 が関与すること、②*Streptomyces coelicolor* の glutamate-cysteine ligase 様遺伝子 SCO0910 は ergothioneine の生合成に関与すること、③*S. coelicolor* では、真核生物でタウリン生合成経路に関与する 2 つのオルソログ SCO3035、および SCO3416、2782/2017 を持つ。しかし組換え酵素を用いて検討した結果、これらはタウリンの生合成には関与しないと推定された。

研究成果の概要（英文）：The involvement of new enzymes for co-factors biosynthesis was examined. (i) pABA; A function unknown gene, NE1434, was obtained from *Nitrosomonas europaea* by shotgun cloning experiment using pABA-auxotrophic *E. coli* mutant ( $\Delta$ pabABC) as a host. (ii) Glutathione; *Streptomyces* strains do not use glutathione. However, SCO0910 was confirmed to be glutamate-cysteine ligase and was essential for ergothioneine biosynthesis. (iii) Taurine; SCO3035 in *S. coelicolor* A3(2) was reported to be the first enzyme in taurine biosynthesis (J. Bacteriol. **188**, 5561, 2006). To investigate taurine biosynthesis in *S. coelicolor* A3(2), SCO3416, 2782, and 2017, putative enzymes catalyzing the second reaction, were used for in vitro assay. However, all enzymes did not show the expected activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000 円	930,000 円	4,030,000 円

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生体分子科学・生物分子化学

キーワード：生合成、4-アミノ安息香酸、グルタチオン、エルゴチオネイン、タウリン

## 1. 研究開始当初の背景

近年のゲノム解析技術の進歩やコスト軽減により多くの微生物のゲノム情報が容易に入手できるようになった。その結果、これまで主に大腸菌を用いて明らかにされた生合成経路の遺伝子、特に補酵素の生合成に関与する遺伝子のオーソログが見いだせない場合も多いことが分かってきた。

## 2. 研究の目的

そこで、そのような微生物では、従来とは異なる経路で補酵素を生合成するのかウエットな生化学実験で実証実験を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

葉酸の構成成分である、4-アミノ安息香酸 (PABA)、グルタチオン、タウリンについて、これまで知られていない経路が存在するか組換え酵素を用いて検証した。

## 4. 研究成果

①4-アミノ安息香酸 (PABA) 新規経路の解析： 既知経路の PABA 合成に関与する

pabA, B, & C 欠損大腸菌を宿主に用い、新規経路を有する *Nitrosomonas eutropha* を DNA 供与体としてショットガンクローニングを行った結果、pyrroloquinoline quinone (PQQ) synthase と弱い相同性を持ち、機能未知とされている NE1434 を得た。本遺伝子のオーソログは、同じく新規経路を持つと予想されるクラミジアでは、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から、PABA の生合成に関与する可能性が強く示唆された。本酵素の基質を探るため、NE1434 を持つ形質転換株を変異処理し PABA 要求株を得た。本株を宿主に用いてショットガンクローニングを行ったが、特異的な遺伝子は得られず、NE1434 の基質を推定できなかった。

②グルタチオン生合成経路： *Streptomyces* 属放線菌や結核菌では、抗酸化剤としてグルタチオンの代わりにマイコチオールを用いる。しかし、放線菌 *Streptomyces coelicolor* は、グルタチオン生合成の初発反応を触媒する glutamate-cysteine ligase (EC 6.3.2.2) と 37% の identity を示すオーソログを有する (SCO0910)。そこで組換え酵素を用いて機能解明を行った結果、予想される活性を有し、

更なる実験により、結核菌などで抗酸化物質として機能することが知られている *ergothioneine* の生合成に関与することを明らかにした。

③タウリン生合成経路： タウリンは、システインから生合成される経路が知られているが、微生物に本経路は無いとされてきた。しかし、*J. Bacteriol.* **188**, 5561 (2006)で、*S. coelicolor* の SCO3035 が初発反応を触媒する酵素であることが報告された。そこでタウリン生合成上、次の反応を触媒する脱炭酸酵素のオーソログ (SCO3416, 2782, 2017) がタウリン生成活性を有するか組換え酵素を用いて検討した。しかし、予想される活性は検出できなかったことから、*S. coelicolor* はタウリンを合成しないと推定された。

## 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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

佐藤康治、小林大毅、大利 徹、バクテリアにおける新規葉酸生合成経路の解明、平成 25 年度 日本農芸化学会大会、東北大学、平成 25 年 3 月

[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：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/tre/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

大利 徹 (DAIRI TOHRU)

北海道大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：70264679

### (3)連携研究者

佐藤 康治 (SATO YASUHARU)

北海道大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号：30360928