

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔令和2（2020）年度 研究進捗評価用〕

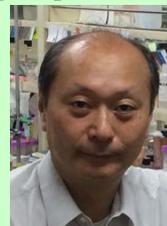
平成29年度採択分
令和2年3月31日現在

アミノ基キャリアタンパク質を介する生合成機構の解明と二次代謝産物構造多様性の拡張
Studies on mechanisms of biosynthesis of biomolecules via amino-group carrier protein and extension of structural diversity of secondary metabolites

課題番号：17H06168

西山 真 (NISHIYAMA MAKOTO)

東京大学・生物生産工学研究センター・教授



研究の概要（4行以内）

アミノ基キャリアタンパク質(AmCP)は、基質のアミノ基に結合して基質を生合成酵素に運ぶ新しいタンパク質である。本研究では、各生合成酵素の立体構造及び AmCP 認識機構を解明すると共に、二次代謝産物の生合成システムを対象として AmCP による天然化合物の構造多様性を創出・拡張機構を解明することを目指す。

研究分野：農学

キーワード：微生物代謝、酵素化学

1. 研究開始当初の背景

我々はアミノ基に結合する新規なキャリアタンパク質として AmCP を見出した。AmCP はリジンやアルギニン生合成といった一次代謝だけでなく、二次代謝産物の生合成にも広く利用されることが分かってきた。すなわち、AmCP を介したシステムが一次代謝という生命活動の維持だけでなく、天然化合物の多様性の拡張という重要な役割を有することを示しているが、その機構解明はあまり進んでいない。

2. 研究の目的

本研究では、AmCP が関わる一次・二次代謝産物生合成システムにおいて、各種代謝酵素群による AmCP 認識機構の解析し、効率の良い物質生産系の解明を目指す。最近の我々の研究により、AmCP は二次代謝産物の生合成システムに転用され、より複雑化し、構造の多様性を創出するシステムとして用いられていることが明らかになりつつある。放線菌では多様な二次代謝産物が作られることが知られているが、今まで生合成研究されているものの多くが、テルペン、ポリケチドなどの一群の化合物である。本研究では、新たな天然化合物生合成システムとしての AmCP システムの全容の解明を目指す。

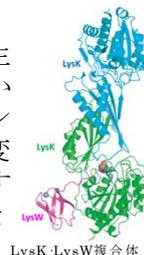
3. 研究の方法

本研究では、AmCP がどのようにリジン・アルギニン生合成などの一次代謝、放線菌をはじめとする様々な菌の二次代謝に寄与し効率的に物質変換に利用されているのかを

微生物学、生化学、分子生物学、生物有機化学、酵素学、構造生物学などを駆使した学際的研究を展開して解明する。

4. これまでの成果

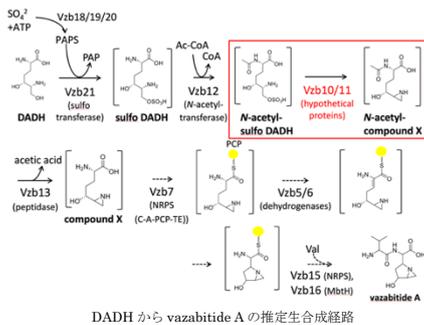
T. thermophilus のリジン生合成経路でリジンを AmCP から切り離す酵素 LysK のリジン複合体結晶構造を決定し、改変体の機能解析結果を満たす LysK・LysW 複合体モデル構造を作製することに成功した。



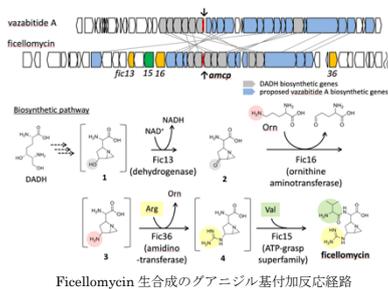
また、リジンとアルギニンの生合成における進化関係を明らかにすべく、アーキアである *S. acidocaldarius* のホモクエン酸合成酵素の活性調節機構の解析を行い、通常転写因子に付加して転写制御を担うエフェクター結合ドメインが同酵素に付加されており、同ドメインへのリジン結合により酵素活性の調節がもたらされる初めての事例を明らかにした。

アーキアのリジン生合成と他のアミノ酸生合成の進化を解明する手がかりとなるオルニチンアミノ基転移酵素、およびホモクエン酸合成酵素についてその性質を明らかにした。これ以外にも、酵素タンパク質に基質を共有結合して生合成するシステムをシアノバクテリアのビオチン生合成に発見し、反応機構を解明した。

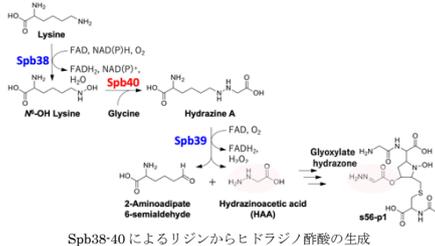
放線菌の vazabotide A 生合成において、アザビシクロ環形成反応に先立つアジリジン環合成を Vzb10 と Vzb11 が行うことを突き止めた。



Ficellomycin は、Fic13、Fic16、Fic36 が順に反応することで、抗細菌活性に必要なグアニジル基が付加したアザビシクロ環含有アミノ酸が生成し、Fic15 がそれと Val を結合することで生合成されることを明らかにした。



s56-P1 の水酸基に付加したグリオキシル酸ヒドラゼンの生成に *spb38-40* が関わることを見つけ出した。さらに Spb40 が直接的に N-N 結合形成を担うことを見出した。Spb40 は N 末側に Cupin ドメイン、C 末側に MetRS ドメインを有する。MetRS ドメインでグリシル AMP が生成し、Cupin ドメインでヒドロキシリジンと縮合して、分子内 rearrangement が生じ、N-N 結合が形成されることを明らかになりつつある。



Streptomyces sp. SpE090715-01 が有する Type II AmCP 遺伝子クラスターが抗生物質 maleimycin の生合成に関わることを明らかにした。同生合成系では、通常の AmCP を介した生合成と同様に、その C 末端に付加されたグルタミン酸側鎖がセミアルデヒド化される。その後、3 炭素分がホモクエン酸合成酵素ホモログによる反応で増炭されたのち、以降の生合成が進行することが示唆された。

Serratia sp. ATCC39006 の AmCP 遺伝子クラスターは、DADH 生合成酵素遺伝子ホモログに加えて、4 つ機能未知遺伝子を含んでいる。現在までに、AmCP の C 末端にグルタミン酸が付加された後、リン酸化、還元を経て生成したセミアルデヒド型中間体が生じ、それが 2 アミノ 5,7 ジヒドロキシ 6 オキソヘプタン酸へと変換されることが明らかになりつつある。

5. 今後の計画

LysW(AmCP) および機能未知タンパク質 LysV の生合成酵素の活性調節や複合体系における役割を解明する。Vaz10/11 およびそのホモログの結晶構造解析により、アジリジン環形成反応を解明すると共に、アザビシクロ環形成機構の解明を目指す。Spb40 の N-N 結合形成機構の詳細を明らかにする。maleimycin におけるマレイミド骨格形成機構は新規性が高いため、その解明を目指す。*Serratia* の AmCP マシナリーで生合成される化合物の同定と生物活性の解析を行う。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. A novel suicide enzyme catalyzes multiple reactions in a single active site for biotin biosynthesis in cyanobacteria. Sakaki, K., *Nishiyama, M. ら (11 名中 11 番目). *Nat Chem Biol*, **16**, 415-422 (2020)
2. Biochemical characterization of archaeal homocitrate synthase from *Sulfolobus acidocaldarius*. Suzuki, T., *Nishiyama, M. ら (11 名中 11 番目). *FEBS Lett*, **594**, 126-134 (2019)
3. Discovery of unprecedented hydrazine-forming machinery in bacteria. Matsuda, K., *Nishiyama, M. ら (6 名中 6 番目). *J Am Chem Soc*, **140**, 9083-9086 (2018)
4. An ornithine ω -aminotransferase required for growth in the absence of exogenous proline in the archaeon *Thermococcus kodakarensis*. Zheng, R.C., *Nishiyama, M. ら (7 名中 6 番目). *J Biol Chem*, **293**, 3625-3636 (2018)
5. Crystal structure of LysK, an enzyme catalyzing the last step of lysine biosynthesis in *Thermus thermophilus*, in complex with lysine: Insight into the mechanism for recognition of the amino-group carrier protein, LysW. Fujita, S., *Nishiyama, M. ら (6 名中 6 番目) *Biochem Biophys Res Commun*, **491**, 409-415 (2017)

7. ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/biotec-res-ctr/saiboukinou/>