

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14370

研究課題名（和文）放線菌が持つ新たなニトロ化酵素の探索

研究課題名（英文）Identification of novel nitrating cytochrome P450s from Actinomycetes

研究代表者

富田 宏矢 (Tomita, Hiroya)

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任研究員

研究者番号：00814229

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ニトロ化反応は化学工業的に重要であるが、酵素を使ったニトロ化反応はこれまでほとんど知られていない。本研究では新たなニトロ化酵素の探索を行った。その結果、放線菌よりラホヤマイシンの生合成に関与する新規ニトロ化酵素を発見した。この酵素は脂肪族化合物のニトロ化を行う物であり、これまで見つかっている芳香族ニトロ化酵素とは大きく異なる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の化学工業で一般的な強酸を使うニトロ化反応を酵素反応で置き換えることができれば、環境負荷を大幅に軽減することができる。そのためには、現状数が少ないニトロ化酵素のレパートリーを広げることで、様々な化合物をニトロ化するための酵素変換プラットフォームの構築を進める必要がある。本研究で新たなニトロ化酵素が見つかったことから、これを含めニトロ化酵素の機能改変を行うことで対象化合物を広げていくことができる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Although nitration reaction is very important in industry, only several enzymes catalyzing nitration are known. In this study, novel nitrating cytochrome P450s are the targets to be found. As a result, a P450 was revealed to be involved in lajollamycin biosynthesis. This enzyme catalyzes the nitration of aliphatic compounds, which is different from known nitrating P450s for aromatic compounds.

研究分野：天然物生合成

キーワード：生合成 放線菌 ニトロ化 シトクロムP450

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

環境保護の観点から、化学工業における物質変換プロセスは環境負荷の低い生物学的プロセスへの転換が模索されている。中でも芳香族化合物のニトロ化反応は、芳香環に窒素原子を導入するため工業的に非常に重要な工程であるが、現在主流である化学的変換ステップは環境負荷が大きい。これを改善するため、酵素を用いた生物学的変換プラットフォームの開発が望まれるものの、酵素反応は対応できる基質が制約される上、現状芳香族のニトロ化反応を触媒できる酵素の発見例はわずかである。そのため、新たなニトロ化酵素の発見と機能改変が必要である。

2. 研究の目的

放線菌は多種多様な二次代謝産物を生産することで知られ、すでに 2 種見つかったニトロ化酵素はいずれも *Streptomyces* 属由来であることから、優れた研究材料である。本研究では、放線菌 *Streptomyces qinglanensis* の持つ 2 つのシトクロム P450 酵素の機能の同定と基質特異性の変換を目指す。研究対象としたこれら 2 つの P450 は、既知のニトロ化 P450 と同様に (1) 二次代謝産物合成遺伝子クラスター内にコードされ、(2) 一酸化窒素合成酵素遺伝子と隣接してコードされる。既知のニトロ化酵素と本研究で新たに発見される酵素のエンジニアリングを通じ、様々な化合物をニトロ化可能な物質変換の基盤構築に大きく寄与することが期待できる。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子破壊株の作製

シトクロム P450 酵素の機能を調べるため、遺伝子の破壊を試みた。これまで *Streptomyces* 属放線菌で使用された実績のある CRISPR-Cas9 を用いるプラスミドを使った。この遺伝子破壊用プラスミドを保持した大腸菌から放線菌へ接合伝達を行い、放線菌の形質転換を試みた。プラスミドの導入はプラスミドに含まれている抗生物質耐性遺伝子による薬剤耐性の有無によって判定した。

(2) ニトロ化合物生産条件の検討、生産物の推定

Streptomyces 属放線菌の研究で広く用いられている培地で培養した。培養液に等量の酢酸エチルを加えて化合物を抽出し、酢酸エチル層を回収した。溶媒を除去した後、少量のメタノールに溶かし LC-MS で分析した。

(3) 一酸化窒素合成酵素阻害剤の利用による基質同定

一酸化窒素合成酵素の阻害剤 N^o-ニトロアルギニンメチルエステル (NAME) を培地に添加して培養を行った。その後上記と同様に代謝物の抽出、分析を行った。

(4) 組換えタンパク質の調製、ニトロ化反応の検証

大腸菌を用い、2 種の P450 の組換えタンパク質の調製を行った。精製は His-tag を使った Ni アフィニティークロマトグラフィーを用いた。

ニトロ基を持たないラホマイシンは、NAME を添加した培養液から各種カラムクロマトグラフィーを使った HPLC により精製した。

(5) 別の基質候補を用いた検証

Acyl-carrier proteins (ACPs) はモノエン、ジエンの伸長鎖に対応する ACP を大腸菌で発現させ、精製した。モノエン、ジエンカルボン酸をスクシンイミドと縮合することでエステルを合成し、CoA とエステル交換することで CoA 体を得た。各ステップにおいて、必要に応じて HPLC による精製および LC-MS による分析を行った。またこれと ACP を混和し、sfp タンパク質を用いて ACP にローディングさせた。N-アセチルシステアミン (SNAC) 体は、カルボン酸と SNAC を縮合することで合成した。テトラエンカルボン酸はジエンのアルデヒド体から Wittig 反応や Knoevenagel 縮合反応を用いて伸長することで合成した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子破壊株の作製

これまで使用実績のある pCRISPOmyces2 を用い、遺伝子破壊を試みた。*Streptomyces* 属放線菌において広く使われている実験手法に従って形質転換を試みたものの、プラスミドが導入された株を取得することはできなかった。おそらく *S. qinglanensis* の形質転換効率が著しく低いためであると考えられる。

(2) ニトロ化合物生産条件の検討、生産物の推定

様々な種類の培地を用いて *S. qinglanensis* を培養し、その培養液に酢酸エチルを加えて化合物抽出を行った。酢酸エチル層に回収された化合物を LC-MS により分析したところ、1つの培養条件においてニトロ基に特徴的な UV 吸収を示す化合物の生産が確認された。

次に、研究対象としている2つの P450 遺伝子が含まれる二次代謝産物生合成遺伝子クラスターのうち1つについて、生産物の分子骨格形成に関わるポリケチド合成酵素 (PKS)、非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) のドメイン構成より生産物の予想を行った。その結果、この PKS-NRPS はオキサゾロマイシンの生合成に関わる PKS-NRPS と極めてよく似ていることが分かった。異なるのは最も上流の PKS 部位のみであった。

以上の結果から、この遺伝子クラスターから生合成される化合物はニトロ基を持つオキサゾロマイシン類縁体であることが予想され、既知化合物であるラホヤマイシンが有力候補として挙げられた。ラホヤマイシンはオキサゾロマイシンクラスに含まれる化合物で、ポリエン骨格の末端にニトロ基を有する。その精密質量は、上記 LC-MS 分析で得られた質量データとよく一致していた。ラホヤマイシンの生合成機構は不明であり、おそらく本研究で対象としている P450 によってニトロ基が導入されることが期待された。このような非芳香族 (脂肪族) 化合物に対するニトロ化酵素は前例がない。

(3) 一酸化窒素合成酵素阻害剤の利用による基質同定

遺伝子破壊が困難であったため、別のアプローチをとることにした。ヒトなどの研究において、様々な種類の一酸化窒素合成酵素阻害剤が広く使われていることから、本研究でもこれを用いることでニトロ化酵素の機能を抑制することができると考えた。阻害剤として、放線菌で使用された実績のある N^o-ニトロアルギニンメチルエステル (NAME) を用いることにした。

NAME を添加して *S. qinglanensis* を培養し、(2)と同様に化合物の抽出と分析を行った。その結果、ラホヤマイシンの生産量は顕著に減少しており、代わりにニトロ基に相当する質量および UV 吸収がない化合物の蓄積が見られた。このことから、ラホヤマイシンの生合成には一酸化窒素合成酵素が関わっていることが強く示唆され、P450 によりニトロ基が導入されることが裏付けられた。

(4) 組換えタンパク質の調製、ニトロ化反応の検証

*In vitro*での解析を行うため、大腸菌を用い2種の P450 組換えタンパク質を調製した。ラホヤマイシンの生合成に関わると推定される P450 は可溶性タンパク質として取得することができた一方、もう片方の P450 は不溶性であった。この遺伝子クラスターを詳細に調べると、P450 遺伝子と一酸化窒素合成酵素遺伝子の間には数百 bp の距離があり、おそらくオペロンではないと予想された。そのため、この酵素はニトロ化反応を行わない可能性が示唆されたことから、その後はラホヤマイシンの生合成研究に注力することとした。

ラホヤマイシン生合成機構における P450 によるニトロ化反応のタイミング、すなわち基質の解明に取り組んだ。最も有力な(3)の実験で蓄積した化合物を精製し、組換えタンパク質およびその他必要な補因子と共に反応させた。なお一酸化窒素は試薬によって供給した。しかしながらニトロ化反応の進行、すなわちラホヤマイシンの生成は確認できなかったため、この化合物はニトロ化反応の基質ではないことが示唆された。

(5) 別の基質候補を用いた検証

ニトロ化反応が PKS-NRPS の分子骨格形成過程において起こる可能性を検証することにした。この場合、ニトロ化は acyl-carrier proteins (ACPs) 上で起こると考えられるため、生合成過程の序盤の中間体であるポリエン ACP およびその模倣体である N-アセチルシステアミン (SNAC) 体を用いることにした。モノエン、ジエン、トリエン、テトラエン-SNAC 体およびモノエン、ジエン-ACP を調製してニトロ化反応を行ったものの、いずれに対しても反応の進行は見られなかった。

以上の結果より、本研究でラホヤマイシンの生合成機構に関する知見が得られた。特にここで解析した P450 は脂肪族化合物に対するニトロ化酵素であることが強く示唆された。これまでに報告されたニトロ化 P450 はいずれも芳香族化合物に対するものであるため、この P450 はこれらとは性質の異なる新規性の高い酵素である。最も興味深いニトロ化反応のタイミング、すなわち基質についての解析では、*in vitro*で再構築可能なものを検証したものの、特定には至らなかった。ポリケチド合成酵素による化合物骨格形成過程など、*in vitro*での再現が難しいところでニトロ化が行われている可能性がある。これを特定するためには、やはり遺伝学的な解析が重要であるため、本研究で試みた手法とは異なる方法で遺伝子破壊を試みる必要があると考えられる。

一方、遺伝子破壊実験は困難であったものの、一酸化窒素合成酵素阻害剤を用いた実験によってニトロ化に関する知見を得ることができた。この手法は前例があまりなく、今後新たなニトロ化合物およびニトロ化酵素の研究を行う上で有用であると思われる。

当初もう一つの研究対象としていた P450 に関しては、遺伝子破壊および組換えタンパク質の取得ともに成功しなかった。この遺伝子については隣接する一酸化窒素合成酵素遺伝子との

間がやや離れていることから、他のニトロ化酵素遺伝子のようにオペロンを構成していない可能性が高い。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroya Tomita, Yohei Katsuyama, Yasuo Ohnishi
2. 発表標題 Genome mining for novel nitrating cytochrome P450s provides insights into lajollamycin biosynthesis
3. 学会等名 The 4th A3 Foresight Symposium on Chemical and Synthetic Biology of Natural Products (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 富田宏矢、勝山陽平、大西康夫
2. 発表標題 ラホヤマイシン生合成に関与する脂肪族ニトロ化酵素に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2019年～2020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
--	---------------------------	-----------------------	----