

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850048

研究課題名(和文)ジアゾ基を持つ天然物の生合成機構の解明

研究課題名(英文)Study on biosynthesis of natural products with diazo group

研究代表者

勝山 陽平(Katsuyama, Yohei)

東京大学・農学生命科学研究科・講師

研究者番号：50646437

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)：放線菌の生産する二次代謝産物の一群にジアゾ基を持つものがある。これらの化合物は有用な生理活性を持つにもかかわらず、その生合成機構はこれまで未知であった。その生合成機構を明らかにするために、ジアゾ基を持つ化合物であるcremeomycinの生合成経路を解析した。Cremeomycinの生合成遺伝子クラスターをクローニングし異種放線菌に導入した所、cremeomycinの生産が確認された。また、この異種生産株を用いた遺伝子破壊実験からcremeomycinの生合成経路を推定した。さらに生合成酵素の組換えタンパク質を試験管内で解析した結果、ジアゾ基形成に重要な亜硝酸生合成経路の存在が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Several Streptomyces produce natural products containing a diazo group. Although some of these natural products possess important activities, biosynthetic pathway of a diazo group remained obscure. To get an insight into the diazo group biosynthesis, the cremeomycin biosynthetic pathway was elucidated. Cremeomycin biosynthetic gene cluster was cloned and expressed in a heterologous host. As a result, cremeomycin production was observed in the heterologous host. Gene inactivation experiments suggested using the heterologous host enabled to predict the biosynthetic pathway. In vitro analysis of recombinant enzymes involved in biosynthesis of cremeomycin revealed a novel nitrous acid biosynthetic pathway which is responsible for diazo group formation.

研究分野：天然物化学

キーワード：天然物 ジアゾ基 生合成 放線菌

1. 研究開始当初の背景

放線菌の生産する二次代謝産物は抗生物質であるバンコマイシンや免疫抑制剤であるタクロリムスに代表されるように有用な活性を持つ化合物が数多く含まれる化合物群である。そのような化合物群の中にジアゾ基を持つものが存在する。これらも有用な生理活性を持つにもかかわらず、その生合成に関する知見はほとんど得られていなかった。

2. 研究の目的

放線菌 *Streptomyces cremeus* 由来のジアゾ基を持つ天然物 cremeomycin (図 1) の生合成遺伝子及び生合成酵素群を解析する事でジアゾ基生合成に関する知見を得る事を目指した。Cremeomycin は他のジアゾ基を持つ天然物に比べ構造が単純であるため、知見を得やすいと考えた。解析の過程で発見された酵素を詳細に解析する事でジアゾ化を担う酵素がどのような分子メカニズムでジアゾ化を行っているかを明らかにする事と試みる。さらにバイオインフォマティクスにより新規なジアゾ化合物生合成遺伝子クラスターを見出し、その生合成産物を同定することなどによって、本研究で見いだされたジアゾ化機構が他のジアゾ化合物においても用いられていることを示すことを目指す。

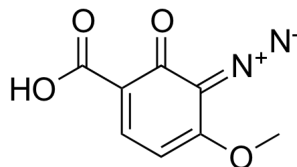


図 1 cremeomycin の構造

3. 研究の方法

(1) Cremeomycin の生合成遺伝子クラスターの取得及び異種発現

Cremeomycin はその構造から 3-amino-4-hydroxybenzoic acid (3,4-AHBA) から生合成されると予想された。そこで 3,4-AHBA 合成酵素、GriH と GriI の保存領域から縮重プライマーを設計し、保存領域を増幅した。次に *S. cremeus* のゲノムと pTOYAMAcos をもとにコスミドライブラリーを構築した。増幅した保存領域をプローブとした、コロニーハイブリダイゼーションにより、生合成遺伝子クラスターを持つコスミドを絞り込んだ。さらに、得られたコスミドの配列を次世代シーケンサーで解析する事で解読した。また、得られたコスミドを *Streptomyces albus* に導入する事で異種生産を試みた。

(2) 生合成遺伝子破壊株の構築による中間体の解析

Cremeomycin 生合成遺伝子クラスターを持つコスミドの配列情報から cremeomycin の生合成に最低限必要な遺伝子を予測した。Cremeomycin の生産に不要と思われる領域を

欠失したコスミドを作成し、異種発現により cremeomycin の生合成に与える影響を調べた。さらに、得られたコスミドをもとに cremeomycin の生合成遺伝子のうち一つが欠失したコスミドを全ての cremeomycin 生合成遺伝子について構築した。これらのコスミドを同様に異種発現し、cremeomycin 生合成に与える影響を調べた。

(3) Cremeomycin の生合成を担う酵素の *in vitro* 解析

Cremeomycin の生合成に重要と予想された酵素の組換えタンパク質を大腸菌を用いて調製し、その反応性を試験管内のアッセイにより解析した。

(4) Cremeomycin の生合成を担う酵素の結晶構造解析

上述した酵素を金属アフィニティークロマトグラフィーとイオン交換クロマトグラフィーを用いて精製し、結晶化スクリーニングに供した。

(5) ジアゾ基を持つと考えられる酵素のゲノムマイニング

ジアゾ基の生合成に重要と思われる遺伝子を持つ放線菌を既に明らかとなっているゲノム情報をもとに探索した。そのような遺伝子を持つ放線菌を購入し、それらの遺伝子の破壊株を構築した。得られた株と野生株の代謝プロファイルを LC-MS を用いて比較する事で、これらの遺伝子が生合成する化合物を調べた。

4. 研究成果

(1) Cremeomycin の生合成遺伝子クラスターの取得及び異種発現

GriH と GriI の保存領域から縮重プライマーを設計し、保存領域を増幅した結果、特異的な DNA 断片の増幅が観測された。得られた領域を解析した所、GriH、GriI のホモログを含む領域だとわかった。増幅により得られた DNA 断片を用いてコロニーハイブリダイゼーションを行った結果、3つのコスミドが得られた。これらのうち一つを解析した結果、推定 cremeomycin 生合成遺伝子クラスターを含んでいた。この領域に存在した *griH* のホモログをコードする遺伝子を欠失させた所、cremeomycin を生産しない変異株が得られた事から、この生合成遺伝子クラスターが cremeomycin 生合成遺伝子クラスターである事が明らかとなった。このクラスター中には 3,4-AHBA の生合成に関わる酵素 (CreH, CreI)、メチル化酵素 (CreO)、二つのフラビン依存型酸化酵素 (CreM, CreK)、脱離酵素 (CreG)、ATP 依存アデニル化酵素 (CreN) をコードする遺伝子が存在した。また、これら以外にも生合成遺伝子の転写制御因子と考えられるタンパク質 (CreR1, CreR2, CreR3, CreR4) をコードする遺伝子が存在した。次に

得られたコスミドを *S. albus* に導入し、得られた形質転換体が *cremeomycin* を生産するか調べた。その結果、*cremeomycin* の生産は見られなかった。そこで、経路特異的転写活性化因子をコードすると考えられる *creR1* の上領域を恒常発現プロモーターである *ermE** プロモーターに置換したコスミドを構築し、同様の実験を行った。その結果、*cremeomycin* の生産が確認された。

(2) 生合成遺伝子破壊株の構築による中間体の解析

前述した遺伝子群が *cremeomycin* に必要充分である事を示すために、不要な部分を削ったコスミドを作成し、同様に実験を行った。その結果、前述した遺伝子を含まない領域を削除したコスミドを用いても *cremeomycin* の異種生産は可能であった。

次に *creQ*, *creM*, *creK*, *creG*, *creN* のいずれかを欠失させたコスミドを構築した。得られたコスミドを *S. albus* に導入し *cremeomycin* の生産性を検証した。その結果、*creN* 欠損株以外はすべて *cremeomycin* の生産性を失っていた。*creM* 欠損株においては 3-amino-4-methoxybenzoic acid (3,4-AMBA) が蓄積していた (図2)。また、*creK* および *creG* 欠損株においては 3-amino-2-hydroxy-4-methoxybenzoic acid (3,2,4-AHMB) が蓄積していた (図2)。また、*creO* 欠損株では中間体と思われる化合物の蓄積は見られなかった。しかし、この酵素はメチル化酵素であるため、*CreO* は 3,4-AHBA の *O*-メチル化を触媒すると考えられる。以上の結果から *CreK* と *CreG* が何らかの形で共同して 3,2,4-AHMB より *cremeomycin* を合成している事が示唆された (図2)。

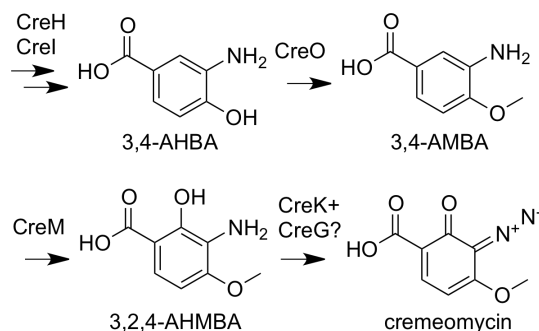


図2 異種発現実験により推定された *cremeomycin* の生合成経路

(3) *Cremeomycin* の生合成を担う酵素の *in vitro* 解析

次に *CreK* と *CreG* の組換えタンパク質を調製し、*in vitro* 解析によりそれらの性質を調べた。まず、*CreK* の基質を 3,2,4-AHMB と予測して反応を行ったが、生成物を確認する事は出来なかった。3,2,4-AHMB を *cremeomycin* へと変換するためには何らかの化合物から窒素をジアゾ基の遠位の窒素として供給する必要がある。そこで *CreK* はこの供給源と

なる化合物を酸化すると考えた。供給源は何らかのアミノ酸であると予想し、*CreK* を 21 種のアミノ酸と反応させた。その結果、アスパラギン酸を基質としたときに NADPH 存在下で反応が進行した。次に生成物を ^1H NMR, ^{15}N NMR, LC-MS により解析した結果、この化合物はニトロコハク酸である事が明らかとなった。次に *CreG* の機能を調べるために、*CreG* を *CreK*, NADPH, アスパラギン酸存在下で反応させた所、フマル酸と亜硝酸の生成が確認された。このことから *CreG* はニトロコハク酸から亜硝酸を脱離させる酵素である事が明らかとなった。この実験結果から *CreK* と *CreG* は共同してアスパラギン酸から亜硝酸を合成する酵素である事が分かった。

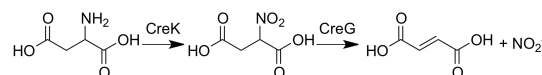


図3 *CreK* と *CreG* の触媒する反応。

次に亜硝酸と 3,2,4-AHMB から *cremeomycin* を合成する酵素を探索したが、発見する事が出来なかった。亜硝酸は酸性条件下で非酵素的にアミノ基と反応し、ジアゾ基を形成する事が既に知られている。そのため、*cremeomycin* 生合成においてジアゾ基の形成は非酵素的に起ると現在のところ考えている。

(4) *Cremeomycin* の生合成を担う酵素の結晶構造解析

CreK と *CreG* の組換えタンパク質を大量に調製し、結晶化条件のスクリーニングに供した。その結果、いずれのタンパク質においても結晶を得る事に成功した。現在、これらの解析する事でこれらの酵素の立体構造の解明を目指している。

(5) ジアゾ基を持つと考えられる酵素のゲノムマイニング

creK と *creG* のホモログを持つ生物を既に公開されているゲノム情報をもとに探索した所、複数の微生物がこれらのホモログを持っていた。これらの多くはオペロンを形成しており、*CreK*, *CreG* と同様の機能を担っている可能性が示唆された。この事は本研究で発見された新規亜硝酸生合成経路が他の二次代謝産物の生合成に関与している事を示唆している。これらのうち JCM より購入可能な放線菌 (*Streptomyces cattleya* NRRL8057 と *Streptomyces davawensis* JCM4913) を購入した。これらの持つ *creK* ホモログ遺伝子を破壊した株を構築した。得られた破壊株と野生株を様々な条件で培養し、それらの作る化合物を比較した。その結果、*Streptomyces davawensis* JCM4913 の野生株は生産するが、*creK* 破壊株は生産しない化合物が一つ見つかった。現在この化合物の構造を解析中である。

また、既知天然物から芳香族ジアゾ化合物

を經由して合成され则认为られる化合物を探索した。その結果、一つの候補化合物が見つかった。この化合物の生産菌のゲノムを解析した所、*creK*, *creG* ホモログが見つかった。

これらの結果から *CreK*, *CreG* からなる亜硝酸合成経路は他の二次代謝産物の生合成に關与している事が示唆された。

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)

[学会発表](計 4 件)

勝山陽平、東山洋輔、佐藤優花里、菅井佳宣、千田美紀、千田俊哉、大西康夫(口頭発表)、*Streptomyces cremeus* における *Creomeomycin* 生合成に關与する新規亜硝酸脱離酵素 *CreG* の X 線結晶構造解析、2015 年度農芸化学会(岡山)、3月27日

菅井佳宣、勝山陽平、大西康夫(口頭発表)、*Creomeomycin* のジアゾ基形成に關与する新規亜硝酸合成経路、2015 年度 農芸化学会(岡山)、3月27日

菅井佳宣、勝山陽平、大西康夫(口頭発表)、*Creomeomycin* の生合成研究、2013 年度日本放線菌学会大会(広島)、9月6日

菅井佳宣、勝山陽平、大西康夫(口頭発表、ポスター発表)、*Creomeomycin* 生合成経路の解析、2014 年度 日本放線菌学会大会(つくば)、6月19日

6. 研究組織

(1)研究代表者

勝山陽平 (KATSUYAMA, Yohei)

東京大学・農学生命科学研究科・講師

研究者番号：50646437