

アミノ基キャリアタンパク質を介して生合成される 新規天然物の探索と特異なN-N結合形成機構の発見

松田 研一, 西山 真

1. はじめに

官能基の反応性をコントロールする保護・脱保護の工程は、有機合成化学において欠かすことのできない操作であるが、同様の工程は生体内の代謝経路にも存在する。たとえば、グルタミン酸からオルニチンを合成する過程で生じるセミアルデヒドは、分子内のアミノ基と自発的に反応し環化産物を生じるが、これを防ぐためにアミノ基は経路初期にあらかじめアセチル基によって保護されている（図1a）。セミアルデヒドがアミノ基へと変換されたのち、アセチル基は酵素的に脱保護される。

*Thermus thermophilus*をはじめとする一部の好熱性細菌は、上述の経路に類似した経路によって α -アミノアジピン酸（AAA）からリシンを生合成する。この過程で用いられるアミノ基の「保護基」はアセチル基ではなくタンパク質である。約50アミノ酸からなるLysWと名づけられたこの小さなタンパク質は、金属を結合する球状ドメインとC末端のループ領域からなる。ループのC末端にはGlu残基が存在し、その γ -カルボキシ基にAAAのアミノ基が縮合される。これによりAAAのアミノ基はタンパク質の保護基によって保護される。この反応はATP依存的にLysXによって触媒される。こうして生じたLysWとAAAの複合体LysW- γ -AAAに対し、LysZ, LysY, LysJのそれぞれが、AAA部分のリン酸化、アルデヒドへの還元、アミノ基転移を触媒し、結果的にAAA部分はリシンへと変換される。最後にペプチダーゼLysKにより、アミノ基が脱保護され、リシンが生成する¹⁾。LysWのタンパク質表面は負に帯電している一方で、変換酵素群LysX, LysY, LysZ, LysJ, LysK

の基質結合ポケット付近のタンパク質表面は正に帯電しており、LysWによって保護された中間体を効率よく認識する²⁻⁴⁾。これによりLysWは、変換の過程で生じるセミアルデヒドの自発的な環化を抑制する保護基としてだけでなく、各代謝酵素の活性中心へ中間体を効率的に運搬するキャリアタンパク質として機能する。生合成中間体を運搬するキャリアタンパク質は脂肪酸合成経路や一部の二次代謝経路にもみられるが、LysWは立体構造や中間体の結合様式がこれらとはまったく異なることから、我々はこれを新たにアミノ基キャリアタンパク質（amino group-carrier protein: AmCP）と命名している。

AmCPを利用した代謝経路は生物界に広く分布しており、たとえばアーキアでは、リシンだけでなく、アルギニンの前駆体であるオルニチンの生合成にも利用されている^{5,6)}。さらに一部の細菌においては、AmCPは一次代謝のみならず二次代謝にも利用されている。放線菌*Streptomyces* sp. SANK 60404は、AmCPを用いて、グルタミン酸から非タンパク質構成性のアミノ酸DADH [(2S,6R)-diamino-(5R,7)-dihydroxy-heptanoic acid]を生合成する（図1a）⁷⁾。DADHの側鎖はさらなる修飾反応を受け、窒素原子を含む特異な二環性骨格アザビシクロ環（1-azabicyclo[3.1.0]hexane）へと変換されたのち、ペプチド性天然物vazabotide Aに組み込まれる（図1b）⁷⁾。アザビシクロ環は抗腫瘍活性物質azinomycinや抗菌物質ficellomycinにも含まれる骨格で、高い求電子性により核酸塩基のアルキル化活性の本体として機能する。近年、azinomycinやficellomycinの生合成遺伝子クラスターが単離され、同様のDADH生合成酵素遺伝子群が含まれていたことから、これらもAmCPを介して生合成されうるものと推測される^{8,9)}。AmCPを介する一次代謝経路は生物界に広く分布する一方で、AmCPを介して生合成されると推定される二次代謝産物は上記の二つを合わせても3例のみであり、二次代謝におけるその多様性は不明であった。本稿では、AmCPの二次代謝における多様性を明らかにするために行った天然物の探索研究の結果と、それを通じて偶然にも発見された、細菌界に広く分布する新奇な代謝経路について解説する。

東京大学生物生産工学研究センター（〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1）

Genome-mining of amino group carrier protein-mediated machinery led to the discovery of an unprecedented hydrazine-forming enzyme in bacteria.

Kenichi Matsuda and Makoto Nishiyama (Biotechnology Research Center, The University of Tokyo, Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan)

本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920130

© 2020 公益社団法人日本生化学会

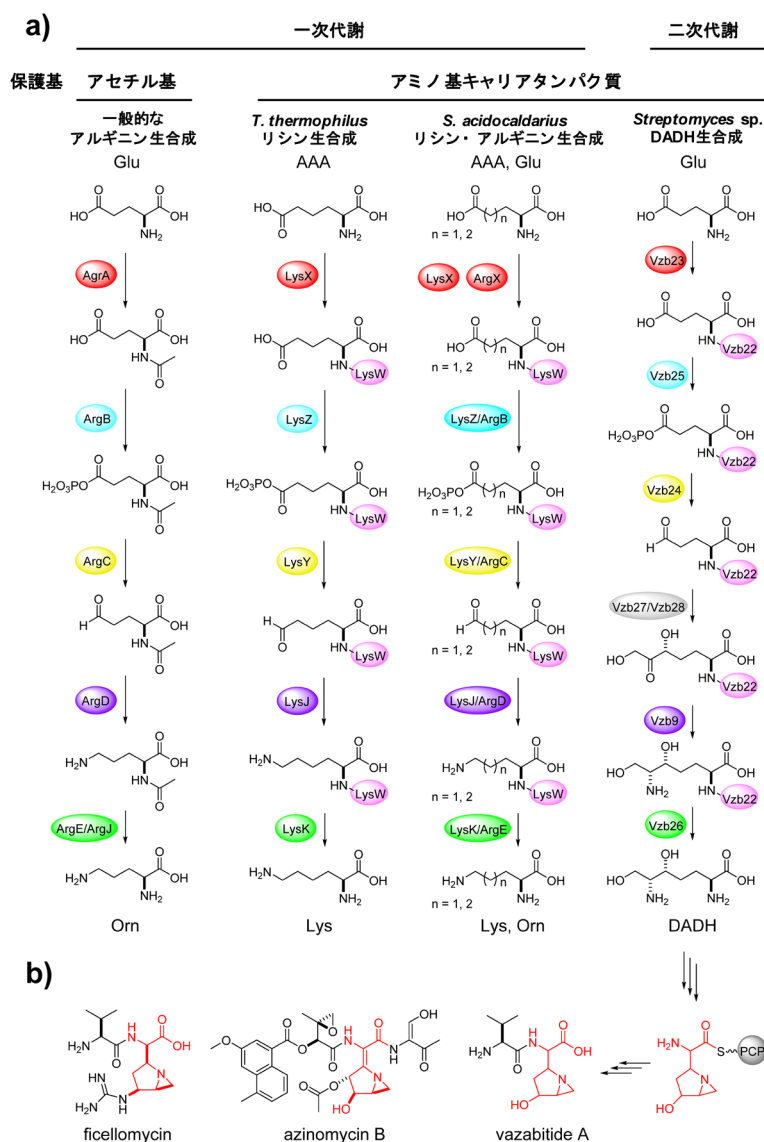


図1 アミノ基キャリアタンパク質 (AmCP) を介する一次・二次代謝経路

(a) アセチル基および AmCP によるアミノ基の保護を伴う代謝経路. (b) DADH の変換経路. AmCP を介して生合成された DADH はペプチド系天然物の部分骨格へと変換される.

2. アミノ基キャリアタンパク質を利用した二次代謝経路の多様性について¹⁰⁾

AmCP を介した物質変換システムの二次代謝における多様性を明らかにすることを目指し、はじめに *amcp* 遺伝子を有する放線菌株を探索した. *amcp* 遺伝子の金属結合モチーフと C 末端の保存モチーフに対応するプライマーを設計し、これを用いて放線菌ゲノムに対して PCR スクリーニングを行った. その結果、848 株の放線菌コレクションから *amcp* 遺伝子を有する放線菌 12 株を選抜した (図 2a). 各菌株をドラフトゲノムシーケンス解析に供し、*amcp* 遺伝子の周辺領域を解析したところ、いずれの菌株においても DADH の生合成に必要な遺伝子がすべてそろっていた

(図 2b). 加えてその周辺領域には、菌株ごとに異なる修飾酵素遺伝子群が存在していた. このことから、DADH 以降の代謝経路は菌株ごとに大きく異なり、DADH を共通中間体として多様な構造の天然物が生合成されることが示唆された.

3. AmCP を介して生合成される天然物の探索¹⁰⁾

選抜された菌株のうち *Streptomyces* sp. SoC090715LN-17 (以下 s56 株) に着目し、AmCP を介して生合成される天然物を探索した. *amcp* 遺伝子周辺の遺伝子領域約 70 kb を、パート A、パート B に分割し、2 種類のコスミドベクターを用いてそれぞれをクローニングした (図 2c). これらを

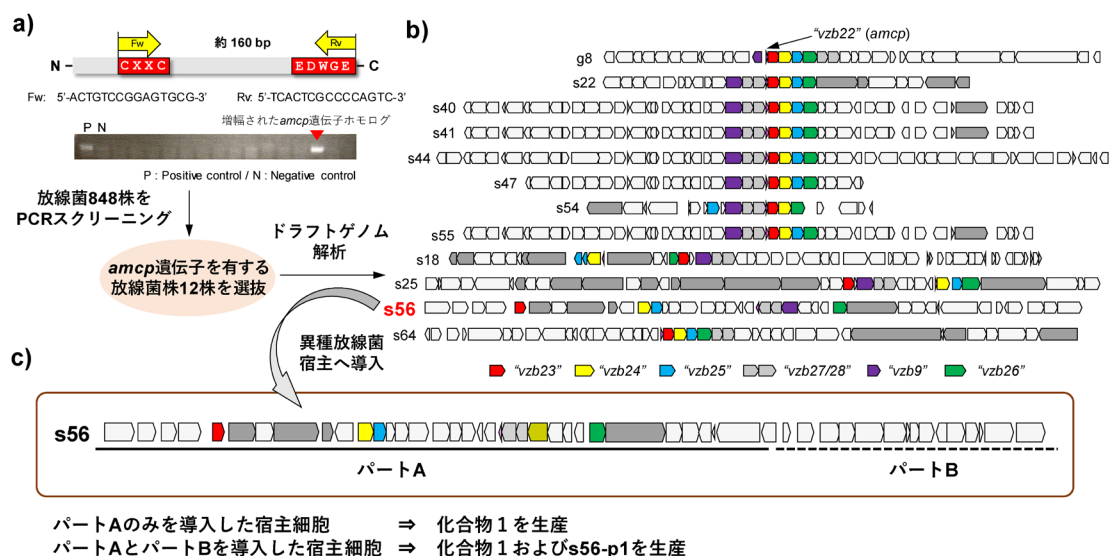


図2 AmCPを介する二次代謝経路の探索
(a) *amcp* 遺伝子を標的としたPCRスクリーニング. (b) PCRによって増幅された *amcp* 遺伝子の周辺領域. (c) s56株の *amcp* 遺伝子周辺領域のクローニングおよび異種放線菌宿主へ導入.

異種放線菌宿主に導入したところ、パートAを導入した宿主は新たに化合物1を生産し、さらにパートA, B両方を導入した宿主は化合物1に加えてs56-p1を生産した(図3). 化合物1およびs56-p1はいずれもN-アセチルシステインが付加した五員環構造を有するが、これは前述のアザビシクロ環骨格が、異種放線菌宿主内でmycothiolを介する解毒経路によって代謝されて生じたものと考えられる. 興味深いことに、s56-p1のDADHに由来する五員環構造は、vazabotide Aやazinomycin, ficellomycinとは異なり、天然物としては非常にまれな窒素-窒素共有結合(N-N)を有する部分構造によって修飾されていた. DADHを共通の中間体として生合成される天然物群は、それらを構成するアミノ酸が多様であることに加えてDADHに由来する活性本体そのものをさまざまに修飾することで、物理化学的性質や標的特異性を巧みにチューニングしていることがうかがえる. s56-p1の発見により明らかとなったアザビシクロ環骨格を母核とした構造多様化戦略に学ぶことで、今後、活性や標的特異性を制御した類縁化合物の創成が可能になると期待している.

4. 新奇なN-N結合形成機構の発見¹¹⁾

amcp 遺伝子を指標とした化合物探索により発見されたs56-p1は天然物としては非常にまれなヒドラゾン構造を含んでいる. ヒドラゾンをはじめとするN-N結合を含む官能基は天然物全体の0.1%程度にしかみられないが、それらはペプチドやポリケタイド、グリコシドといった多様なクラスの天然物に含まれ、多くの場合、生物活性に重

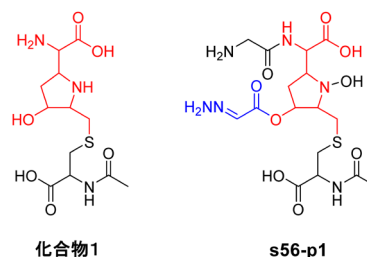


図3 異種放線菌宿主が生産した新規天然物の化学構造
DADHに由来する部分構造を赤、特異なヒドラゾンユニットを青で示した.

要な役割を果たす¹²⁾. 生体内におけるN-N結合形成の仕組みは米国ライス大学のParryらの研究グループによりvalanimycinを対象に古くから研究されてきたが、反応の詳細は不明であった. 最近になって、2017年にカナダ、ブリティッシュコロンビア大学のK. Ryanらによりpiperazic acid生合成におけるN-N結合形成を触媒する酵素が初めて同定されたのを皮切りに、cremeomycin, kinamycin, fosfazinomycinの生合成に共通した遊離亜硝酸を利用する経路や、病態モデル動物作製試薬streptozotocinの生合成におけるグアニジノ基窒素の分子内転位による経路などが次々に報告されている(図4a)^{13, 14)}. 一方、s56-p1生合成遺伝子クラスター中にはそれらのN-N結合形成酵素遺伝子が見いだされなかったため、これまでとは異なる仕組みによってN-N結合が形成されると予想された.

s56-p1生合成遺伝子クラスターのうちパートAのみを導入した異種放線菌宿主はヒドラゾンユニットを欠いた化合物1のみを生産することから、ヒドラゾンユニットの生合

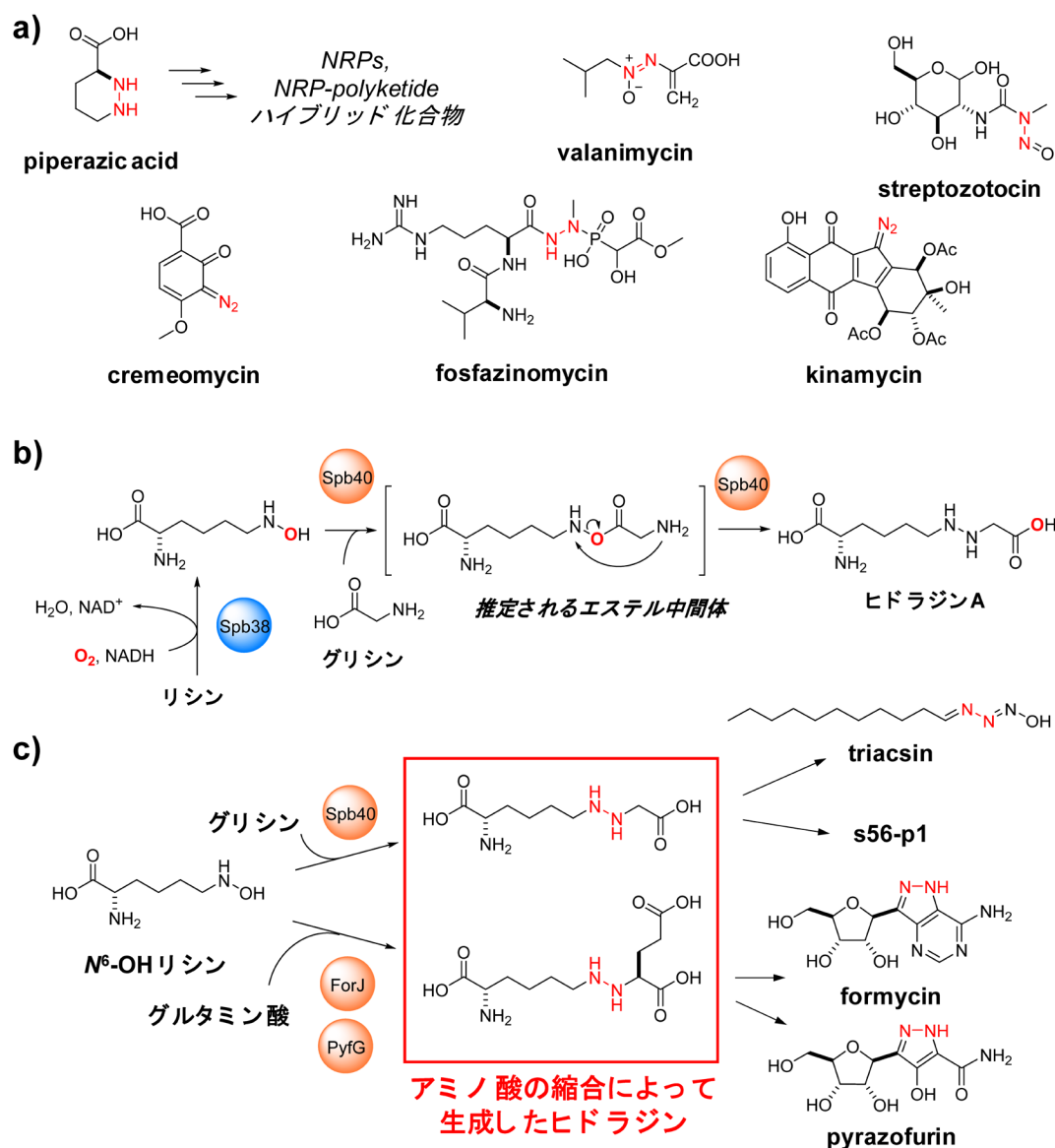


図4 細菌における新たなN-N結合形成機構

(a) N-N結合含有天然物の例. (b) Spb38, Spb40によるヒドラジンAの推定生成経路. 同位体で標識した酸素原子を赤字で示した. (c) Spb40やそのホモログを介するN-N結合含有天然物の生成経路.

成遺伝子群はパートBにコードされると考えられた. そこでパートBのみを導入した異種放線菌宿主を培養し, 代謝物を酸分解したところ, ヒドラジン N_2H_4 の生成が確認された. この結果は, パートBにコードされたいずれかの酵素によってN-N結合形成反応が触媒されたことを示している. そこでパートBに含まれる12個の遺伝子を個別に破壊したところ, *spb38*と*spb40*と名づけた遺伝子のいずれかを破壊した場合に, 代謝物中のヒドラジンが消失することがわかった. そこでこの2遺伝子を大腸菌に導入したところ, この大腸菌はLysとGlyからなる新しいヒドラジン化合物 (ヒドラジンA) を生産した (図4b). 以上の実験により, 遺伝子クラスター内の50個近い遺伝子の中

ら, N-N結合形成に必要な十分な二つの遺伝子を同定することに成功した. そこで次にそれぞれの酵素の機能を個別に解析した. Spb38の組換えタンパク質を試験管内でリシンと混合したところ, 側鎖のアミノ基が水酸化されることが判明した. また, *spb40*遺伝子を導入した大腸菌の培養液に水酸化リシンを添加すると, 水酸化リシンはヒドラジンAへと変換された. このことからSpb40は水酸化リシンとグリシンを基質としてN-N結合形成を触媒し, ヒドラジンAを生成することが明らかになった. Spb40の触媒する反応について知見を得るため, ^{18}O で同位体ラベルしたN⁶-OHリシンを調製し, Spb40を発現した大腸菌に添加したところ, ^{18}O 原子はヒドラジンAのグリシン部分のカル

ボキシ基に取り込まれることが判明した。このことから、Spb40の触媒するN-N結合形成反応は、エステル中間体の生成と、それに続く分子内転位反応の二段階によって進行することが示唆された(図4b)。Spb40はN末端には金属結合性のcupinドメインを、またC末端にはメチオニルtRNA合成酵素と相同性を示すドメインを有するため、各ドメインが個々の反応を触媒することによりヒドラジンAが精製すると予想される。現在、組換えタンパク質を用いたSpb40の機能解析を行っており、近い将来、個々のドメインの機能の詳細を明らかにできると考えている。

5. おわりに

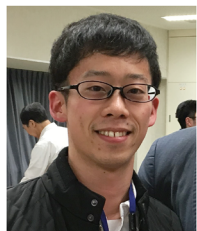
spb40のホモログ遺伝子はアクチノバクテリア門だけでなく、複数の細菌門に広く分布している¹¹⁾。このことはSpb40が、s56-p1の生合成だけでなく、さまざまなN-N結合含有化合物の生合成に関わる普遍的なN-N結合形成の仕組みであることを示唆している。実際2019年に入り、研究試薬として用いられるアシルCoA合成酵素阻害剤tri-acsinや抗腫瘍抗ウイルス活性物質pyrazofurin, formycinといったN-N結合含有天然物の生合成にSpb40ホモログが関与することが次々に報告されている¹⁵⁾。興味深いことに、pyrazofurinやformycinの生合成においてはリシンとグルタミン酸からなる新たなヒドラジン中間体を経ることが示唆されている。このことはSpb40ホモログによって縮合されるアミノ酸の種類に多様性があることを示している(図4c)。アミノ酸の縮合によって生じたヒドラジンはそれぞれの異なる経路で代謝され、ヒドラゾンやトリアゼン、ピラゾールといった多様な官能構造へと変換される。今後、データベースに眠る機能未知のSpb40ホモログ遺伝子の機能を解析することで、N-N結合含有天然物の生合成に関する知見が得られることに加え、特異な官能構造を含む新たな天然物のケミカルスペースを開拓できると期待している。

文 献

- Horie, A., Tomita, T., Saiki, A., Kono, H., Taka, H., Mineki, R., Fujimura, T., Nishiyama, C., Kuzuyama, T., & Nishiyama, M. (2009) Discovery of proteinaceous N-modification in lysine biosynthesis of *Thermus thermophilus*. *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 673–679.
- Yoshida, A., Tomita, T., Fujimura, T., Nishiyama, C., Kuzuyama, T., & Nishiyama, M. (2015) Structural insight into amino group-carrier protein-mediated lysine biosynthesis: crystal structure of the LysZ·LysW complex from *Thermus thermophilus*. *J. Biol. Chem.*, **290**, 435–447.
- Shimizu, T., Tomita, T., Kuzuyama, T., & Nishiyama, M. (2016) Crystal structure of the LysY·LysW complex from *Thermus thermophilus*. *J. Biol. Chem.*, **291**, 9948–9959.
- Fujita, S., Cho, S.H., Yoshida, A., Hasebe, F., Tomita, T., Kuzuyama, T., & Nishiyama, M. (2017) 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. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **491**, 409–415.
- Ouchi, T., Tomita, T., Horie, A., Yoshida, A., Takahashi, K., Nishida, H., Lassak, K., Taka, H., Mineki, R., Fujimura, T., et al. (2013) Lysine and arginine biosyntheses mediated by a common carrier protein in *Sulfolobus*. *Nat. Chem. Biol.*, **9**, 277–283.
- Yoshida, A., Tomita, T., Atomi, H., Kuzuyama, T., & Nishiyama, M. (2016) Lysine biosynthesis of *Thermococcus kodakarensis* with the capacity to function as an ornithine biosynthetic system. *J. Biol. Chem.*, **291**, 21630–21643.
- Hasebe, F., Matsuda, K., Shiraishi, T., Futamura, Y., Nakano, T., Tomita, T., Ishigami, K., Taka, H., Mineki, R., Fujimura, T., et al. (2016) Amino-group carrier-protein mediated secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces*. *Nat. Chem. Biol.*, **12**, 967–972.
- Zhao, Q., He, Q., Ding, W., Tang, M., Kang, Q., Yu, Y., Deng, W., Zhang, Q., Fang, J., Tang, G., et al. (2008) Characterization of the azinomycin B biosynthetic gene cluster revealing a different iterative type I polyketide synthase for naphthoate biosynthesis. *Chem. Biol.*, **15**, 693–705.
- Liu, Y., Li, M., Mu, H., Song, S., Zhang, Y., Chen, K., He, X., Wang, H., Dai, Y., Lu, F., et al. (2017) Identification and characterization of the ficellomycin biosynthesis gene cluster from *Streptomyces ficellus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **101**, 7589–7602.
- Matsuda, K., Hasebe, F., Shiwa, Y., Kanesaki, Y., Tomita, T., Yoshikawa, H., Shin-ya, K., Kuzuyama, T., & Nishiyama, M. (2017) Genome mining of amino group carrier protein-mediated machinery: Discovery and biosynthetic characterization of a natural product with unique hydrazone unit. *ACS Chem. Biol.*, **12**, 124–131.
- Matsuda, K., Tomita, T., Shin-ya, K., Wakimoto, T., Kuzuyama, T., & Nishiyama, M. (2018) Discovery of unprecedented hydrazine-forming machinery in bacteria. *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 9083–9086.
- Blair, L.M. & Sperry, J. (2013) Natural products containing a nitrogen-nitrogen bond. *J. Nat. Prod.*, **76**, 794–812.
- Du, Y.L., He, H.Y., Higgins, M.A., & Ryan, K.S. (2017) A heme-dependent enzyme forms the nitrogen-nitrogen bond in piperazate. *Nat. Chem. Biol.*, **13**, 836–838.
- Ng, T.L., Rohac, R., Mitchell, A.J., Boal, A.K., & Balskus, E.P. (2019) An N-nitrosating metalloenzyme constructs the pharmacophore of streptozotocin. *Nature*, **566**, 94–99.
- Wang, S.A., Ko, Y., Zeng, J., Geng, Y., Ren, D., Ogasawara, Y., Irani, S., Zhang, Y., & Liu, H.W. (2019) Identification of the formycin A biosynthetic gene cluster from *Streptomyces kaniharaiensis* illustrates the interplay between biological pyrazolopyrimidine formation and *de novo* purine biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **141**, 6127–6131.

著者寸描

●松田 研一（まつだ けんいち）



北海道大学大学院薬学研究院助教，博士（農学）。

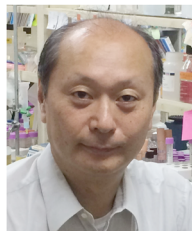
■略歴 2011年東京大学農学部生命科学・工学専修卒業，14年同大学院農学生命科学研究科修士課程修了，17年同研究科博士課程修了，同年次世代天然物化学技術研究組合特別研究職員を経て，同年6月より現職。

■研究テーマと抱負 新奇な天然物生合成酵素の発見とその機能解析，ゲノム情報に基づく天然物探索を効率化し，それによって天然物構造多様性を拡充したい。

■ウェブサイト <http://www.pharm.hokudai.ac.jp/tennen/index.html>

■趣味 筋力トレーニング（自重）。

●西山 真（にしやま まこと）



東京大学生物生産工学研究センター教授，博士（農学）。

■略歴 1984年東京大学農学部農芸化学科卒業，86年同大学院農学系研究科修士課程修了，88年同研究科博士課程退学，同年東京大学農学部助手，94年東京大学生物生産工学研究センター准教授，2003年より現職。

■研究テーマと抱負 微生物が示す有用形質は，ゲノムにコードされる酵素の多様性に依存する。そのような微生物が示すユニークな酵素（反応）を探索，発掘し，その機構を解明したい。

■ウェブサイト <http://park.its.u-tokyo.ac.jp/biotec-res-ctr/saiboukinou/>

■趣味 スポーツ一般，ギター。