The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

2S-Da01 抗生物質ストレプトスリシンの生合成研究で出くわした新規アミノ酸修飾酵素

○濱野 吉十
（福井県大・生物資源）
hamano@fpu.ac.jp

天然有機化合物の生合成研究は、医薬品として利用されている化合物を対象に発展し、有効成分の効率生産に貢献してきた。生物のゲノム解析が容易になった現在においては、機能未知の生合成遺伝子クラスターから新規天然有機化合物を創製するゲノムマイニングへと発展している。他方、実用化されていない天然有機化合物に生合成研究を適用し、有用な化合物を創製する試みは極めて少ない。

放線菌によって生産される streptothricin（ST）は、強力な抗生物質であるが、原核・真核生物の両者に対して毒性を示すため臨床利用されていない。そこで我々は、ST を天然物の未利用モデルとして捉え、その生合成研究によって有用化合物を創製できるか検証した。ST は、その化学構造に 1 残基の β- リジンあるいは 2 ～ 7 残基の β- リジンペプチドを有していることを特徴とし、また、この β- リジンペプチド側鎖が長くなるほど生理活性が強い。最近我々は、β- リジンペプチドの生合成が新規機能を有する非リボソームペプチド合成酵素（NRPS）によって合成されることを明らかにするとともに、生合成工学によって創製した β- リジンペプチドのみの構造が原核生物特異的に細胞毒性を示すことを見出した（C. Maruyama *et al., Nat. Chem. Biol.*, 8, 791-797, 2012）。このように、未利用化合物においても、その生合成研究が有用化合物の創製につながることを示し、また、新規酵素の発掘にもつながった。

そこで、さらに、ST の streptolidine lactam 構造をターゲットとした生合成工学によって新たな医薬品リード化合物の創製あるいは新規酵素の同定につながるか検証した。streptolidine lactam は、L-arginine を出発物質として生合成されることが知られている。最近我々は、L-arginine が α- ケトグルタル酸依存性 L-arginine hydroxylase（ORF12）によって 3,4-dihydroxy-L-arginine へと変換され、さらに、PLP 依存性 aminotransferase（ORF14）によって中間体 hydroxy-L-capreomycidine が合成されることを明らかにしている。hydroxy-L-capreomycidine は、さらに NRPS の A domain と T domain から成る ORF13 の基質になるが、その反応産物は同定されておらず、streptolidine lactam への後半の生合成ステップについては未解明のままであった。そこで、本シンポジウムでは、最近明らかにした streptolidine lactam の生合成後半ステップに関わる酵素について報告する。特に、ATP-grasp motif を有し amide ligase に相同性を示す酵素（ORF8）は、streptolidine を基質として ATP 依存的に分子内 6 員環ラクタム形成を触媒する新規 amide ligase であり、ST の生合成研究にてまた新たなアミノ酸修飾酵素を見出すことができた。

New amino-acid modification enzymes encountered in the biosynthetic study of an antibiotic, streptothricin

○Yoshimitsu Hamano
(Dept. Biosci., Fac. Biotechnol., Fukui Pref. Univ.)

Key words peptide, amino acid, biosynthesis

2S-Da02 放線菌二次代謝産物異種発現生産の大規模検証

○新家 一男
（産総研）
k-shinya@aist.go.jp

天然化合物のリソースとして現在でも微生物は最も有望なリソースの一つであるが、従来の発酵法による二次代謝産物生産では新規物質の発見は難しくなっているのが現状である。一方で、ゲノムシークエンス解析技術の進歩に伴い、微生物の中でも多種多様な化合物を生産する放線菌、*Pseudomonas*あるいは*Bacillus*属などには、多くの二次代謝産物生合成遺伝子が存在することが明らかになってきている。特に放線菌では、従来の培養技術では、一つの菌株中に存在する生合成遺伝子クラスター約 1/3 程度しか利用出来ておらず、大多数の生合成遺伝子が未利用な状態で存在している。また、海洋生物由来の生理活性物質は、高い生物活性を有するにも拘わらず、極めて低い生産性による十分なサンプル供給が不可能なため、産業面での応用が困難あるいは不可能なケースが多い。これら海洋生物由来の天然化合物は内在する共生微生物が生産すると考えられているが、それらの微生物は単独では培養困難であることが多く、従来の発酵技術で化合物生産を行うことは不可能であるのが現実である。

そこで、微生物の持つ隠れた能力を十分に引き出すことを目的に、大規模な生合成遺伝子を用いた異種発現生産の検討を行った。微生物は多種多様な二次代謝産物を生産するが、中でも臨床で用いられている化合物の一群として I 型ポリケタイド生合成経路 (PKS) で生産されるマクロライド化合物は、最も重要な微生物二次代謝産物であるにも拘わらず、その生合成遺伝子クラスターが巨大なため異種発現生産が困難であった。例えば、免疫抑制剤である FK506 (タクロリムス) の生合成遺伝子は 107 kbp にもおよぶ巨大なクラスターから構成される。このような巨大な遺伝子単位を応用する技術として、バクテリアの人工染色体 BAC (Bacterial Artificial Chromosome) を用いたゲノムライブラリー調製法があるが、元々はヒトゲノム解析などほ乳類のゲノムライブラリーの調製に用いられて来た技術であり、取り扱いが困難であるため汎用的な技術として微生物への応用はほとんど行われてこなかった。我々は、放線菌二次代謝産物において最も重要な位置を占める、I 型 PKS 生合成遺伝子クラスターを取得することを目的に、この BAC 技術の改良を行い微生物に最適化された BAC 技術の確立に成功した。BAC ベクターに加えて従来のゲノムライブラリーに汎用されている Cosmid ベクターを用いて、放線菌が生産する化合物に注目し、総数 64 化合物の生合成遺伝子クラスターを取得した。次いで、これら *Streptomyces avermitilis*を親株とする SUKA 株、 *Streptomyces* albus J1074 株および *Streptomyces lividans*を親株とする KASU1 株の 3 つのホスト菌株を用いて、取得した生合成遺伝子クラスターについて異種発現生産を行い、現在の技術でどの程度の化合物が異種発現により生産可能かを検証した。本講演では、大規模な微生物二次代謝産物異種発現生産検証における、生合成遺伝子クラスター取得、異種発現生産の成功率、化合物生産量等に関して述べる。

Large-scale verification of heterologous expression of secondary metabolites of actinomycetes' origin

○Kazuo Shin-ya
(AIST)

Key words biosynthesis, heterologous production, Bacterial Artificial Chromosome

NII-Electronic Library Service