

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	マクロラクタム配糖体抗生物質クレマイシンの生合成に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	天貝啓太
Author(English)	Keita Amagai
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9255号, 授与年月日:2013年9月25日, 学位の種別:課程博士, 審査員:江口 正,藤本 善徳,植草 秀裕,工藤 史貴,大森 建
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9255号, Conferred date:2013/9/25, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(博士課程)  
Doctoral Program

# 論文要旨

## THESIS SUMMARY

専攻:	物質科学	専攻	申請学位 (専攻分野):	博士 (理学)
Department of			Academic Degree Requested	Doctor of
学籍番号:			指導教員 (主):	江口 正
Student ID Number			Academic Advisor(main)	
学生氏名:	天貝 啓太		指導教員 (副):	
Student's Name			Academic Advisor(sub)	

### 要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters )

クレミマイシンは放線菌 *Streptomyces* sp. M1635-86F5 が生産する 19 員環マクロラクタム抗生物質で、メチシリン耐性菌を含むグラム陽性菌に対して幅広い抗菌活性を有することが知られている。着目すべきはその特異な構造で、 $\beta$ -アミノ脂肪酸スターター部位を含む二環性アグリコン骨格や、希少糖であるシマロースを含んでおり、その生合成機構に非常に興味を持たれた。そこで、クレミマイシン生合成機構の酵素・遺伝子レベルでの解明を目指し、研究を展開した。

まず始めにクレミマイシンの生合成前駆体に関する知見を得るため、安定同位体標識化合物を用いた投与実験を行った。ポリケチド生合成の伸長基質として一般的に使用される生合成前駆体の安定同位体標識化合物、 $[1-^{13}\text{C}]$ 酢酸ナトリウム、 $[1,2-^{13}\text{C}]$ 酢酸ナトリウム、 $[1-^{13}\text{C}]$ プロピオン酸ナトリウムと、 $\text{D}$ - $[6,6-^2\text{H}]$ グルコースをそれぞれクレミマイシン生産菌培養液中に投与し、得られたクレミマイシンを  $^{13}\text{C}$ -NMR, INADEQUATE,  $^2\text{H}$ -NMR で解析した。その結果、クレミマイシンのアグリコン骨格は 11 個の酢酸ユニット、2 個のプロピオン酸ユニットで構築され、シマロースの生合成前駆体は  $\text{D}$ -グルコースであることが明らかとなった。また、スターター部分においても標識化酢酸やプロピオン酸が取り込まれたことから、スターターはポリケチド合成酵素 (PKS) によって伸長された側鎖にアミノ基が直接導入されることによって生合成されることが示唆された。そこで、その詳細なアミノ基導入機構およびクレミマイシン生合成の全体像を遺伝子・酵素レベルで解明するため、クレミマイシン生合成遺伝子の探索を行った。

クレミマイシン生産菌染色体ゲノム DNA のコスミドライブラリーを構築し、ジデオキシ糖生合成に関わる酵素、NDP 糖 2,3-デヒドラターゼや NDP 糖 4,6-デヒドラターゼをコードしている遺伝子を手掛かりに、クレミマイシン生合成遺伝子クラスターを探索した。その結果、染色体ゲノム DNA 上約 95 kbp の領域に、PKS、2,6-ジデオキシヘキソース合成酵素群、ポスト PKS 修飾酵素群などをコードしている遺伝子が含まれるクラスターを見出し、これを *cmi* 遺伝子クラスターと名付けた。このうちシトクローム P450 酸化酵素をコードする遺伝子 *cmiM4* を破壊し、代謝産物を解析したところ、クレミマイシン生産能を完全に失ったことが分かったため、この遺伝子クラスターがクレミマイシン生合成に関わることを示すことができた。また遺伝子翻訳産物の相同性解析と、PKS のドメイン解析の結果から、アグリコン炭素骨格は PKS により生合成され、シマロースは TDP-ジギトキソース生合成と類似した経路で構築されることが推定された。またスターターは、既に当研究室で明らかにしたピセニスタチン生合成経路におけるスターター修飾反応および PKS へのローディング、チオエステラーゼによる環化の前の加水分解反応に関わる酵素群と同一性を有する酵素遺伝子が保存されていたため、これらと同様の反応経路で  $\beta$  位のアミノ基が他のアミノ酸によって保護されると予想出来た。

一方、スターターのアミノ基導入機構については、*cmi* 遺伝子クラスター中に一般的に知られているアミノ基転移酵素遺伝子が存在しなかったため、未知の機構で触媒されることが示唆された。そこでクレミマイシンスターターと類似した構造のスターターを有するマクロラクタム化合物の生合成遺伝子クラスターと、本研究で取得した *cmi* 遺伝子クラスターを比較してみたところ、これらには特徴的な共通する酵素遺伝子群が存在していた。よってこれらの翻訳産物、*CmiS1*、*CmiS2* がアミノ基導入反応に関わると予想し、大腸菌で大量発現・精製し、*in vitro* での機能解析を行った。まず *CmiS1* は、*CmiP2* のアシルキャリアープロテイン (ACP) 上で *CmiS2* によって還元的アミノ化されて生じた 3-アミノノナン酸チオエステルの加水分解を触媒すると仮定し、3-ケトノナン酸 N-アセチルシステアミン (NAC) チオエステルを基質アナログとして用いて酵素反応を検討したが、全ての条件で 3-アミノノナン酸は検出されなかった。そこで、別の候補基質として 2-ノネン酸 NAC チオエステルを用いたところ、*CmiS1* と *CmiS2* によって 3-アミノノナン酸が生成することが分かった。また、予想とは異なり *CmiS2* 非存在下で新たな生成物が検出された。そこで *CmiS1* 酵素反応を大スケールにて行い、各種 NMR スペクトルおよび MS スペクトルを用いて構造決定を行ったところ、この生成物は N-カルボキシメチル-3-アミノノナン酸であることが分かった。すなわち、*CmiS1* は  $\alpha,\beta$ -不飽和チオエステルへのグリシンの共役付加反応と、チオエステルの加水分解を触媒する酵素であることが分かった。このようなアミノ基導入機構はこれまでに例が無く、新規のアミノ基導入機構であると考えられる。また、この結果から *CmiP2*、*CmiP3* で分断された DH ドメインは協同して活性を発現していることが示唆され、その相互作用機構は非常に興味深いものといえる。本研究で得られたこれらの知見は、今後、 $\beta$ -アミノ酸含有型マクロラクタム生合成マシナリーを応用した新規抗生物質の創製研究へと応用できる期待できる。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 2 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 2 copies of 800 Words (English).

(博士課程)  
Doctoral Program

## 論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻 : Department of	物質科学	専攻	申請学位 (専攻分野) : Academic Degree Requested	博士 (理学) Doctor of
学籍番号 : Student ID Number			指導教員 (主) : Academic Advisor(main)	江口 正
学生氏名 : Student's Name	天貝 啓太		指導教員 (副) : Academic Advisor(sub)	

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Cremimycin is a 19-membered macrolactam glycoside antibiotic isolated from *Streptomyces* sp. MJ635-86F5, showing a broad spectrum against Gram-positive bacteria. And this antibiotic has a characteristic  $\beta$ -amino fatty acid moiety as the starter unit. So far the biosynthetic gene clusters of vicenistatin and incednine, which are also  $\beta$ -amino acid starter unit-containing macrolactam glycoside antibiotics have been elucidated, and their starter units are shown to be derived from L-glutamate in vivo and in vitro. The cremimycin starter unit biosynthesis is quite interesting as it is unlikely that it is derived from a proteinogenic amino acid. Therefore, in this thesis, the cremimycin biosynthetic pathway was elucidated through several experiments.

A series of feeding experiments showed that the cremimycin aglycon is derived from two propionates and eleven acetates, and a sugar moiety is derived from D-glucose. Next we attempted to explore the cremimycin biosynthetic gene cluster by a traditional method, and finally we explored ca. 95 kbp region on the cremimycin producing-strain genomic DNA, harboring the genes encoding polyketide synthetases (PKS), sugar biosynthetases, and characteristic enzymes for  $\beta$ -amino acid-containing macrolactam biosynthesis. Involvement of this gene cluster for cremimycin production was confirmed by a gene inactivation experiment.

Since there is no gene encoding an enzyme involved in the amino-transfer, this cluster was compared to other gene clusters involved in the BE-14106 and ML-449, which also bear  $\beta$ -amino fatty acid starter moieties, and explored a characteristic operon, encoding fatty acyl-CoA thioesterase (FcoT), truncated PKS, and FAD-dependent glycine oxidase. Therefore, CmiS1 (FcoT) and CmiS2 (glycine oxidase) were expressed heterologously in *E. coli* and their functions were analyzed in vitro. As a result, it was elucidated that CmiS1 catalyzes Michael addition of glycine to 2-nonenoyl thioester followed by thioester hydrolysis, and CmiS2 oxidizes carboxymethyl moiety of CmiS1 product, leading to 3-aminononanoate.

In this study, the cremimycin biosynthetic mechanism was proposed. In addition, the explored amino-transfer system is unique and this discovery provides new insights into  $\beta$ -amino acid biosynthesis.