

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	マクロラクタム抗生物質ビセニスタチンのアミノ酸スターター部位の生合成機構
Title(English)	Study on the biosynthetic pathway for the -amino acid starter unit of macrolactam polyketide antibiotic vicensistatin
著者(和文)	篠原雄治
Author(English)	Yuji Shinohara
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9399号, 授与年月日:2014年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:江口 正,藤本 善徳,小松 隆之,工藤 史貴,草間 博之
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9399号, Conferred date:2014/3/26, 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： Department of	物質科学	専攻	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 (理学)
学生氏名： Student's Name	篠原 雄治		指導教員 (主)： Academic Advisor(main)	江口 正
			指導教員 (副)： Academic Advisor(sub)	

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

ピセニスタチンは放線菌 *Streptomyces halstedii* HC34 が生産する 20 員環マクロラクタム配糖体抗生物質であり、抗腫瘍活性を有することが知られている。マクロラクタム構造に着目すると、3-アミノ-2-メチルプロピオン酸 (Amp) スターター部位と酢酸及びプロピオン酸単位に由来するポリケチド骨格から構築されており、その融合機構に興味をもたれた。また、天然にはピセニスタチンとは異なるβ-アミノ酸スターター部位を有するマクロラクタム抗生物質が存在しており、生合成工学を利用してβ-アミノ酸スターター部位を変換させた新規マクロラクタム抗生物質の創出も可能であると考えられた。そこで、本研究ではピセニスタチンのスターター部位生合成機構の解明を目指し、さらに、得られた知見を基に生合成工学を利用したピセニスタチン類縁体の創出へ展開することとした。

本研究では、まず、ピセニスタチン生合成遺伝子クラスター中にコードされる酵素が過不足なく生合成に関与すると考え、当研究室で行われていた取り込み実験と遺伝子破壊実験より、前駆体であることが明らかとなった 3-メチルアスパラギン酸 (MeAsp) から始まる推定スターター生合成経路を新たに考え直し、スターター生合成に関与すると考えた 6 つの酵素を大腸菌にて異種発現させ機能解析を試みた。まず、2 つのアデノシン-5'-三リン酸 (ATP) 依存型アデニル化酵素 VinM と VinN のうち、VinN が MeAsp を選択的に認識し、つづいてアシルキャリアプロテイン (ACP) VinL のアミノアシル化反応を触媒することが LC-ESI-MS 分析により明らかとなった。次に、VinN と VinL の反応によって得られたアミノアシル ACP とピリドキサル-5'-リン酸依存型脱炭酸酵素 VinO を反応させた結果、脱炭酸反応が進行し、ピセニスタチンのスターター部位に相当する 3-アミノ-2-メチルプロピオニル ACP 中間体 (Amp-VinL) が生成した。この段階で、もう一方の ATP 依存型アデニル化酵素 VinM が機能すると考え、各種アミノ酸と、ATP、Amp-VinL、VinM を反応させた結果、L-アラニン (Ala) を基質として Amp のアミノ基をアシル化する反応が進行することが分かった。アシル基転移酵素 VinK は、構築されたジペプチドアシル ACP 中間体 (Ala-Amp-VinL) を選択的に認識し、ジペプチド構造をポリケチド合成酵素 (PKS) ローディングモジュールの ACP に転移することが明らかとなった。

ポリケチド鎖末端のアラニンは、PKS による炭素鎖伸長反応後にアミド加水分解酵素 VinJ により加水分解反応により除去され、最後に PKS の末端に存在するチオエステラーゼドメインがマクロラクタム化を触媒して、ピセニラクタムの構築が完結すると予想した。そこで、基質アナログ体として、N-アラニル-セコピセニラクタムエチルエステルを合成し、VinJ と反応させたところ、加水分解反応が進行してポリケチド鎖末端のアラニンが除去されたセコピセニラクタムエチルエステルが生成した。

これらβ-アミノ酸スターター生合成に関わる酵素の基質認識機構を明らかにするため、X 線結晶構造解析を試みたところ、アシル基転移酵素 VinK とアミド加水分解酵素 VinJ の解析に成功した。VinK は、比較的広いポケットを有しており、ジペプチドアシル VinL を選択的に認識して反応することが示唆された。また、VinJ は、長鎖のポリケチド鎖の認識に関わる疎水的なトンネルが存在していることから、加水分解反応が進行するタイミングが PKS における炭素鎖伸長反応の終期であることが示唆された。

以上のように、一連の酵素機能解析の結果、ピセニスタチンのスターター生合成機構を明らかにした。特に注目すべきは、β-アミノ酸スターター部位のβ-アミノ基がアミノアシル化されて、後に除去されるという保護-脱保護反応が利用されることである。微生物はこのような生合成マシナリーを利用して、複雑な骨格の天然有機化合物を生合成していることは驚くべきことである。

ピセニスタチンのβ-アミノ酸スターター部位の生合成においては、VinN が MeAsp を選択的に認識することが分かったので、異なるβ-アミノ酸を認識するホモログ酵素を利用すれば類縁体の生産が可能であると考えた。そこで、MeAsp 生合成系を欠失させた *vinI* 遺伝子破壊株に、インセドニン生合成における ATP 依存型アデニル化酵素遺伝子 *idnL1* を挿入した。*idnL1* 発現株に 3-アミノブタン酸を投与し培養した結果、3-アミノブタン酸をスターター部位に有したピセニスタチン類縁体の生産が示唆された。

以上、本博士論文研究では、ピセニスタチンスターター生合成機構を解明し、さらに生合成工学を利用してピセニスタチン類縁体の創出法を示すことができた。

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 1 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 1 copy 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
学生氏名 : Student's Name	篠原 雄治		指導教員 (主) : Academic Advisor(main)	江口 正
			指導教員 (副) : Academic Advisor(sub)	

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Vicenistatin is a 20-membered macrolactam antibiotic produced by *Streptomyces halstedii* HC34. It was presumed that its unique 3-amino-2-methylpropionate (Amp) unit at this starter position of the polyketide is constructed by unprecedented biosynthetic transformations. I hypothesized that uncharacterized enzymes that are encoded in the vicenistatin biosynthetic gene cluster are responsible for the reactions. The biosynthetic gene cluster for vicenistatin contains an amidohydrolase VinJ, an acyltransferase VinK, an acyl carrier protein VinL, two ATP-dependent ligases VinM, VinN, and a decarboxylase VinO, which were proposed to be involved in the starter biosynthesis. To understand how Amp starter unit is incorporated into the vicenistatin polyketide backbone, functional analysis of these enzymes were carried out.

In vitro enzymatic analysis revealed that 3-methylaspartate is selectively loaded to VinL by VinN. After decarboxylation by VinO, VinM captures the β -amino group of β -aminoacyl-VinL with L-alanine to give dipeptidyl-VinL. Then, VinK recognizes the dipeptidyl moiety and selectively transfers it to the loading ACP domain of polyketide synthase. It was also found that VinJ removes the terminal alanyl moiety of the elongated polyketide chains prior to the macrolactamization. It should be noteworthy that the protection-deprotection strategy is utilized in the biosynthetic pathway of vicenistatin. The crystal structures of VinK and VinJ supported the substrate specificity for the above-mentioned alanyl substrates. VinK has a pocket enough to accommodate the dipetidyl-VinL as a substrate. VinJ possesses a long hydrophobic tunnel for the recognition of the polyketide chain moiety of its substrate.

Because it was found that VinN recognizes 3-methylaspartate selectively, the other β -amino acid activating enzyme IdnL1 which recognizes 3-aminobutyrate in icednine biosynthesis, was introduced into the *vinI* disruptant, which abolishes the 3-methylaspartate formation. Expectedly, this mutant harboring the *idnL1* gene produced the vicenistatin derivative with 3-aminobutyrate at the starter position by feeding of 3-aminobutyrate.

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 1 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 1copy of 800 Words (English).