

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	抗腫瘍抗生物質パクタマイシンの生合成に関わるアミノ基転移酵素の機能解析
Title(English)	
著者(和文)	平山茜
Author(English)	Akane Hirayama
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10416号, 授与年月日:2017年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:江口 正,豊田 真司,植草 秀裕,後藤 敬,工藤 史貴
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10416号, Conferred date:2017/3/26, 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

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻： Department of	物質科学	専攻	申請学位 (専攻分野)： 博士 Academic Degree Requested Doctor of	(理学)
学生氏名： Student's Name	平山 茜		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)

放線菌 *Streptomyces pactum* が生産する抗腫瘍抗生物質であるパクタマイシンは、高度に修飾された炭素五員環サイクリトールや天然物では非常に珍しい 3-アミノアセトフェノン部位を有しており、その生合成機構は興味深い。本博士論文研究では、パクタマイシン生合成の鍵段階と考える窒素原子の導入機構に着目し、*in vitro* での酵素機能解析を中心として生合成機構を調べた。

パクタマイシンの五員環骨格には 3 つの窒素官能基が結合しており、そのうちの 1 つはグルコサミンに由来する。そこで、五員環骨格と *N,N*-ジメチルカルバモイル基との結合に関わる 1 位の窒素原子と、アセトフェノンとの結合に関わる 3 位の窒素原子の導入に、それぞれピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) 依存型アミノ基転移酵素 PctC および PctV が関与すると推定し、酵素活性を調べた。これまでにパクタマイシン生産菌に対する[U-¹³C₆]グルコースや 3-アミノ[ring-U-¹⁴C₆]安息香酸の投与実験が行われており、3-アミノアセトフェノン部位は 3-アミノ安息香酸を前駆体として生合成されることと、一次代謝経路であるシキミ酸経路から派生して構築されることが示唆されている。そのため、シキミ酸経路中間体である 3-デヒドロキナ酸あるいは 3-デヒドロシキミ酸へのアミノ基転移反応が 3-アミノ安息香酸生合成において重要であると考えた。金属アフィニティーカラムクロマトグラフィーにより精製した PctC と PctV を用いて種々の検討を行った結果、PctV はアミノ基供与体として L-グルタミン酸を用いて 3-デヒドロシキミ酸を 3-アミノ安息香酸へと変換する反応を触媒する酵素であることが明らかとなった。

続いて、PctV によって導入された 3-アミノ安息香酸の窒素原子が炭素五員環またはその前駆体である糖との結合を形成するタイミングを絞り込むために、重水素化標識を施した 3-アミノ安息香酸と 3-アミノアセトフェノンとをパクタマイシン生産菌へと投与した。その結果、3-アミノ安息香酸が非常に効率よくパクタマイシンの生合成に利用される条件下においても 3-アミノアセトフェノンのパクタマイシンへの取り込みは観測されなかった。このことから、3-アミノアセトフェノンはパクタマイシンの生合成中間体ではないことが強く示唆された。加えて、糖転移酵素 PctL の基質特異性を調べることで、3-アミノ安息香酸のカルボキシ基がアセチル基へと変換される過程で生じる β-ケト-ACP チオエステル体が PctL の基質であることを強く示唆する結果を得た。これらの結果から、パクタマイシンの 3 位の窒素原子が主骨格へと組み込まれるタイミングを提唱した。

もう 1 つのアミノ基転移酵素である PctC は、パクタマイシンの 1 位の窒素原子の導入に関わると予想した。対応する位置のアルコールが脱水素酵素によって酸化された後に PctC によるアミノ基転移反応が進行すると推測し、生合成遺伝子クラスター中に存在する脱水素酵素 PctP による酸化反応と PctC によるアミノ基転移反応を検討した。その結果、3-アミノアセトフェノンと *N*-アセチルグルコサミンからなる *N*-グリコシドの 3 位の水酸基は、PctP と PctC による酵素反応によってアミノ基へと変換されることが明らかとなった。さらに、PctP の反応における基質特異性を調べることで、*C*-メチル化反応や脱 *N*-アセチル化反応が進行するよりも前に *N*-グリコシドの 3 位の水酸基がアミノ基へと変換されることが強く示唆された。

PctV による反応は 1 度のアミノ基転移反応と 2 度の脱水反応により構成されている。PctV のように 3 つの反応を触媒する PLP 依存型酵素の例はないため、その多段階反応の機構に興味を持ち、詳細な反応機構を調べた。まず、野生型酵素の結晶構造を得て、活性部位に存在すると予想したアミノ酸残基に対する部位特異的変異体を作製した。その結果、PLP 依存型酵素に保存されるリシン残基である Lys276 に対する変異体でのみ 3-アミノ安息香酸の生成能が失われることが明らかとなった。そこで、Lys276 に対する 2 つの変異体の反応における可視紫外吸収スペクトルの経時変化を調べた結果、K276Q 変異体酵素では PMP と 3-デヒドロシキミ酸とが縮合したイミン体が蓄積し、K276R 変異体酵素では 580 nm に極大吸収を有する反応中間体が蓄積することが明らかとなった。中間体を酵素の内部に含む K276R 変異体酵素の結晶構造を得ることで、2 つの水酸基を炭素六員環上に有したキノノイド体が中間体として蓄積していることが判明した。また、K276R 変異体酵素とキノノイド中間体との共結晶構造に基づいて更なる変異体を作製して酵素活性を調べた結果、3-アミノ安息香酸の生成に必要な残基は Lys276 のみであることが明らかになった。これらの結果に基づき、PLP 依存型酵素に保存されている残基である Lys276 が PctV の反応に特有の 2 度の脱水反応にも関与しているという PctV の反応機構を提唱した。

以上、本研究では、これらの結果に基づき、パクタマイシンの生合成経路を新たに提唱した。また、自然界で広く用いられている PLP 依存型酵素に関する新たな知見を与えた。

(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 Doctor of	(理学)
学生氏名 : Student's Name	平山 茜		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)

Pactamycin is an antitumor antibiotic produced by *Streptomyces pactum*. Its five-membered cyclitol core is decorated with 3-aminoacetophenone, 6-methylsalicylate, two methyl groups, and *N,N*-dimethylcarbamoyl group. The studies of total synthesis and biosynthesis of this interesting complex structure has been carried out, but the information about biosynthesis was poor. In this thesis, the timing of introduction of nitrogen atoms was investigated, because these nitrogen atoms play a role in the connection between cyclitol and its characteristic functional groups, and then the introduction of nitrogen atoms seemed to be very important steps in pactamycin biosynthesis.

At first, the function of two putative aminotransferases, PctC and PctV, were investigated. As a result of *in vitro* analysis, it appeared that PctV catalyzes the transformation of 3-dehydroshikimate to 3-aminobenzoate, which is a precursor of the 3-aminoacetophenone moiety. In addition, the detailed mechanism of PctV reaction was investigated. As a result of mutational analysis, only Lys276, which is conserved among PLP-dependent enzymes, was found to be essential for catalysis. K276R mutant accumulated a reaction intermediate, whose structure was determined by UV-Vis spectroscopy and co-crystal structural analysis of K276R mutant with the intermediate. Based on the results, the conserved lysine residue is also proposed to be responsible to dehydration, which is a characteristic feature in the PctV reaction.

Another putative aminotransferase PctC was expected to be involved in the introduction of amino group at C1 position of five-membered cyclitol moiety and putative dehydrogenase PctP seems to oxidize the corresponding alcohol before PctC reaction. The activities of PctC and PctP were investigated using several glucosamine derivatives. As a result, it was found that PctP catalyzes the oxidation of *N*-acetylglucosaminide of aniline derivatives with NAD⁺ and PctP and PctC convert the hydroxy group at C3 position of the *N*-glycoside to amino group. These results suggest that the amino group at C1 position of cyclitol moiety is introduced after transglycosylation and before formation of five-membered ring.

Based on these results, new biosynthetic pathway of pactamycin was proposed.

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).

注意 : 論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).