

新規なアニリン誘導体生合成経路の解明

梶尾 俊介

筑波大学 生命環境系

研究の目的

アニリン骨格を有する化合物は医薬・化成品の原料となりうる重要な化合物である。近年、我々は4-アミノフェニルアラニン (4APhe) の生合成遺伝子 *papABC* を含むシュードモナス属細菌由来の機能未知遺伝子クラスターが、側鎖にアニリン骨格を有するピラジン化合物の生合成に関与することを発見し、PapABC およびピラジン環の形成と側鎖の修飾に関わる PapDEF からなる新規な生合成機構を解明した。¹⁾ ゲノムデータベースを用いて *papABCDEF* 様遺伝子クラスターを探索したところ、粘液細菌 *Haliangium ochraceum* のゲノム配列中に、4APhe 生合成遺伝子 *papABC* を有しているが *papDEF* を持たず、代わりに非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) をコードする遺伝子等を有する新規クラスターを見出した (図 1A)。本研究は、この機能未知遺伝子クラスターの機能を解析し、新規なアニリン類縁体の生合成機構を明らかとすることを目的とする。

方法

1. 発現プラスミドの構築

H. ochraceum JCM 11303 株のゲノム DNA を鋳型として、KOD One (Toyobo) を用いた PCR により遺伝子断片を増幅し、NEBuilder HiFi DNA アッセムブリー (NEB) を用いて発現ベクターへのクローニングを行った。次世代シーケンスおよびサンガーシーケンスにより配列を確認した。

2. 代謝産物の解析

大腸菌の培養上清および酢酸エチル抽出画分を LCMS8045 (Shimadzu) を用いた LC-MS 分析に供した。ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 Column (Waters) を用いて代謝産物を分離した。

結果

1. NRPS 様酵素のドメイン予測

AntiSmash 5.1 等を用いた解析から、Hoch_1367 にコードされるタンパク質は5つのモジュールからなる NRPS であることが予想された (図 1B)。各モジュールのアデニル化 (A) ドメインに保存された基質認識に関わるアミノ酸残基の比較から、

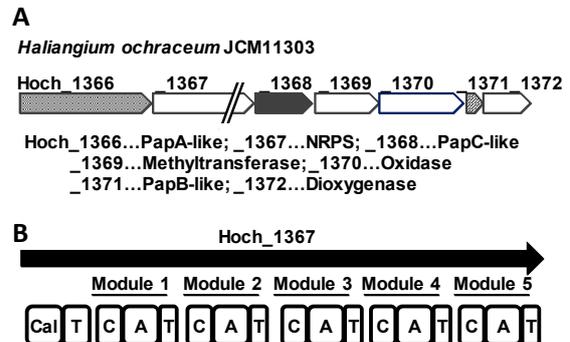


図 1. 遺伝子クラスター(A)と新規 NRPS (B)

モジュール 1、2 はそれぞれセリンを、4 はプロリン、5 はグリシンを認識すると予想された。また、N 末端に存在する acyl-CoA ligase (CAL) ドメインはモジュール 1 のセリンのアシル化に関わると予想された。²⁾ 一方、モジュール 3 に高い相同性を示すものではなく、これまでに知られていない基質を認識すると考えられた。Hoch_1367 は、4-アミノフェニルアラニン (4APhe) の生合成に関わると予想される Hoch_1366, _1368, _1370 とクラスターを形成していることから、モジュール 3 は 4APhe あるいはその類縁体を認識する可能性が高いと考えられた。

2. 4APhe 生合成遺伝子の機能解析

Hoch_1366、Hoch_1368 および Hoch_1370 をそれぞれ発現用プラスミドに連結し、大腸菌 BL21(DE3) を宿主とした異種発現を行った。各種発現菌の培養上清を HPLC にて分析したところ、Hoch_1366、_1368、_1370 の 3 つ全てを発現させた大腸菌の培養上清に 4APhe が蓄積していた。Hoch_1366 のみ、あるいは Hoch_1368 と 1370 を発現させた菌の培養上清に 4APhe は検出されなかった。以上のことから、Hoch_1366、Hoch_1368 および Hoch_1370 は 4APhe の生合成遺伝子であることが示された。

3. 遺伝子クラスターの機能解析

大腸菌にて活性型の NRPS を発現させるため、NRPS の翻訳後修飾に関わるホスホパンテテイニルトランスフェラーゼの発現株を作製した。具体的には、粘液細菌 *Stigmatella aurantiaca* 由来で広い基質特異性を示す MtaA をコードする遺伝子を T7lac プロモーターに連結し、大腸菌 BL21(DE3)、HMS(DE3) および BL21 Star(DE3) のゲノム配列上の *entD* ローカスにそれぞれ組込むことで、NRPS 発現用宿主 BLmtaA、HMSmtaA および BLSmtaA を作製した。Hoch_1363 から Hoch_1372 をコードする 27 kb の DNA 断片を T7lac プロ

モーターの直下に連結した発現用プラスミドを構築し (図 2A)、NRPS 発現用宿主にそれぞれ導入した。得られた株を様々な培地、温度、IPTG 濃度で培養し、発現誘導後の代謝産物を LC-MS 分析に供した。しかしながら、空ベクターを導入したコントロール株と比較して発現株で特異的な代謝産物のピークは確認できなかった。GC-rich 遺伝子のためのコドン補正プラスミドを導入し同様の解析を行ったが特異的な代謝産物は得られなかった。クラスターの先頭にのみ T7lac プロモーターを配置

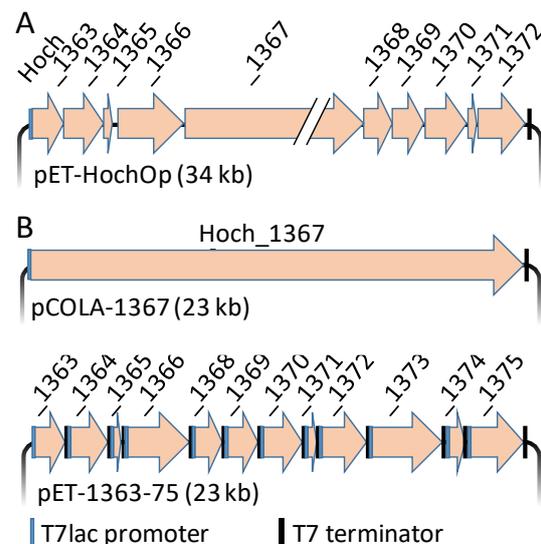


図 2. 発現プラスミド

した本発現プラスミドでは、クラスター内部の遺伝子がうまく転写されない可能性がある。そこで、それぞれの遺伝子を独立で T7lac プロモーターの直下に連結した発現用プラスミドを構築し (図 2B)、NRPS 発現用大腸菌に導入した。現在、これらの株の代謝産物の解析を進めている。

4. NRPS モジュール 3 の機能解析

縮合 (C) ドメイン、A ドメイン、PCP (T) ドメインで構成されるモジュール 3 の機能を解析するため、モジュール 3 の N あるいは C 末端に His タグを付加した組換えタンパク質の発現を試みた。ほとんどの大腸菌宿主および培養条件で目的タンパク質は封入体を形成したものの、ArcticExpress (DE3) RP を宿主とし低温で培養した際に、わずかではあるが可溶性画分に目的タンパク質の発現が確認された。Ni-NTA ビーズを用いたアフィニティー精製を行うことで、モジュール 3 の組換えタンパク質を調製した。今後は、モジュール 3 の 4APhe 等の基質に対するアデニル化活性を測定する予定である。

結論

4APhe あるいはその誘導体を認識すると予想される新規な NRPS 様タンパク質およびそれを含む遺伝子クラスターを発見した。クラスターに含まれる Hoch_1366, _1368, _1370 が 4APhe 生合成遺伝子であることを明らかとした。本研究は大腸菌での異種発現をメインに研究を進めたが、今後は放線菌、粘液細菌などの発現宿主を用いた解析および *H. ochraceum* の遺伝子破壊などにも取り組んでいきたい。今後、遺伝子クラスターおよび NRPS の機能解析を進めることで、アニリン骨格を含む新規なペプチド性化合物および代謝酵素の機能が明らかとなると期待される。

文献

- 1) Masuo, S., Tsuda, Y., Namai, T., Minakawa, H., Shigemoto, R., and Takaya, N. (2019) Enzymatic Cascade in *Pseudomonas* that Produces Pyrazine from α -amino acids. *ChemBioChem* **21**: 353-359.
- 2) Baars, O., Zhang, X., Gibson, M.I., Stone, A.T., Morel, F.M.M., Seyedsayamdost, M.R. (2018) Crochelins: Siderophores with an Unprecedented Iron-Chelating Moiety from the Nitrogen-Fixing Bacterium *Azotobacter chroococcum*. *Angew Chem Int Ed Engl.* **57**: 536-541.