

アゾキシアルケン化合物の生合成機構解析と構造多様化

荒川 賢治

広島大学大学院統合生命科学研究科

研究の目的

放線菌は顕著な生理活性かつ複雑な分子骨格を有する二次代謝産物を生合成する。我々は放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株の多重遺伝子変異株においてアゾキシアルケン化合物 KA57A (図 1A) の蓄積を見いだした (論文 1)。本化合物は特異なアゾキシ結合を有しており、本菌のゲノム解析 (論文 2) を行ったところ、従来知られている窒素・窒素結合形成酵素の相同性遺伝子が見いだされず、新規酵素である可能性が示唆された。また、本株は2つのヒドラジド化合物 KA57D1, KA57D2 を蓄積した (図 1B) (論文 3)。標識アミノ酸の取り込み実験から KA57-A がセリン、KA57D1 がバリン、KA57D2 がイソロイシンを起源としており、窒素・窒素結合形成酵素は様々なアミノ酸を認識する可能性が示唆された。本課題では、KA57A 生合成遺伝子の網羅的遺伝子破壊解析と推定生合成基質の酵素変換実験、さらには他のアゾキシアルケン化合物生合成遺伝子のスクリーニングなどを駆使し、特異な二次代謝産物生合成メカニズムの解明を目指した。

方法

図 2 に KA57A 推定生合成経路を示す。まずヘキシルアミンとセリンが縮合し、ヒドロキシルアミン中間体が転位・酸化されてアゾキシ ($N=N^+-O^-$) 結合を形成し、次いで様々な官能基変換を経て 1',2'-ジヒドロ KA57A が合成され、最後に C1'-C2' の不飽和化が生じて KA57A が生合成される(論文 1)。また、KA57A, valanimycin および maniwamycin (図 1; 論文 4) 生合成遺伝子クラスターを比較したところ、N-ヒドロキシルラーゼやキナーゼなど共通遺伝子を見いだした。本研究では、共通遺伝子の破壊株構築と代謝産物解析を中心とし、生合成経路の全容解明を目指した。

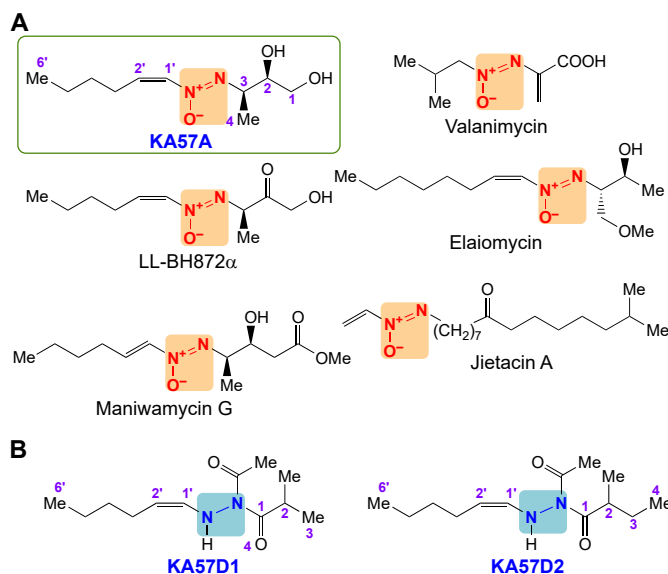


図 1. (A) アゾキシアルケン化合物の化学構造
(B) 放線菌 *S. rochei* KA57 株が生産するヒドラジド化合物

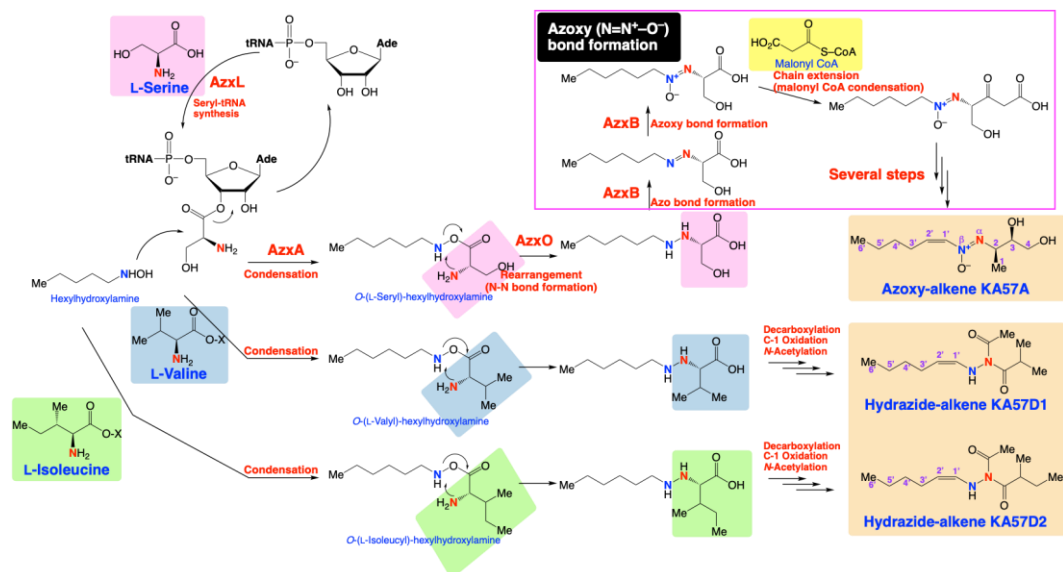


図 2. アゾキシアルケン化合物 KA57A とヒドラジド化合物 KA57D1, KA57D2 の生合成経路

結果

Streptomyces sp. TOHO-M025 株の次世代シーケンス解析を行い、maniwamycin 生合成遺伝子 (*mwm*) を解読した。KA57A 生合成遺伝子 (*azx*) クラスター (論文 2) について、*mwm* と比較検討したところ、*N*-ヒドロキシラーゼ遺伝子 (*M025-432*, *SRO_1832*) やキナーゼ遺伝子 (*M025-426*, *SRO_1821*) など共通遺伝子を見いだした (表 1)。これらについて網羅的に遺伝子破壊を行い、得られた破壊株の代謝産物解析を行った。*N*-ヒドロキシラーゼ遺伝子に関して、valanimycin の遺伝子破壊株と同様に当該アゾキシアルケン化合物 KA57A を生産せず、本遺伝子群の生合成への関与が強く示唆された。キナーゼ遺伝子 *SRO_1821* 破壊株について代謝産物解析を行った

表 1. Maniwamycin 生合成遺伝子 (*mwm*) クラスターと KA57A 生合成遺伝子 (*azx*) , valanimycin 生合成遺伝子 (*vlm*) クラスター

<i>mwm</i>	start	stop	direction	<i>azx</i>	<i>vlm</i>	Putative function
M025-423	497081	498550	+			CoA transferase
M025-424	498603	499157	+			carboxymuconolactone decarboxylase family protein
M025-425	499258	500736	-	SRO_1819	vlmK	VlmK-like protein
M025-426	500736	501722	-	SRO_1821	vlmJ	diacylglycerol kinase
M025-427	502359	503438	+	SRO_1848		fatty acid desaturase
M025-428	503542	504951	+	SRO_1846		MFS transporter
M025-429	505043	505189	+	SRO_1849		hypothetical protein
M025-430	505245	506222	-	SRO_1850	vlmA	hypothetical protein
M025-431	506393	508000	+	SRO_1831		aldehyde dehydrogenase
M025-432	508032	509168	+	SRO_1832	vlmH	oxidoreductase
M025-433	509209	510498	+	SRO_1833		acetylornithine aminotransferase
M025-434	510508	510999	+	SRO_1834		cyclase
M025-435	511016	511543	+	SRO_1835	vlmO	VlmO-like protein
M025-436	511543	512109	+	SRO_1836	vlmR	NADPH - flavin oxidoreductase
M025-437	512202	513113	+	SRO_1837	vlmB	FAD/FMN-containing dehydrogenases
M025-438	513143	514126	+	SRO_1838		3-oxoacyl-ACP synthase
M025-439	514175	514402	+	SRO_1839		Acyl carrier protein
M025-440	514402	515622	+	SRO_1840		3-oxoacyl-ACP synthase
M025-441	515674	516945	+	SRO_1843	vlmL	serine-tRNA ligase
M025-442	517184	517345	+			IS110 family transposase
M025-443	517341	517625	-			hypothetical protein
M025-444	517735	518079	+			hypothetical protein
M025-445	518480	519715	-			Putative amino acid permease

mwm; maniwamycin biosynthetic genes
azx; KA57A biosynthetic genes
vlm; valanimycin biosynthetic genes

ところ、KA57A が親株の 10%程度生産されていた。このことは、本遺伝子以外のキナーゼが代替している可能性を示唆している。本株については微量代謝産物も確認されており、構造解析を通して生合成機構に関する知見の獲得が期待できる。

結論

アゾキシアルケン化合物生合成に関しては、近年窒素・窒素結合含有天然物において窒素・窒素結合形成メカニズムの報告が相次いでいるが、クレミオマイシンにみられる亜硝酸生成経路、s56-p1 にみられるヒドラゾンユニット生成経路、に該当する遺伝子群は、*S. rochei* ゲノム上の KA57A 生合成遺伝子クラスター (論文 1) および *maniwamycin* 生産菌 (論文 4) には一切認められなかった。しかしごく最近、アゾキシアルケン化合物 *valanimycin* や *azodyrecin* 生合成において、ヒドロキシルアミンとアミノ酸が縮合して形成される中間体が、VlmO により異性化されて窒素・窒素結合形成、次いで VlmB によりアゾ基 ($N=N$) 形成とアゾキシ基 ($N=N^+-O^-$) 形成が引き起こされることが報告された (論文 5,6)。このことは、窒素・窒素結合形成酵素の多様性を示唆している。

我々は本研究の一環で、KA57A 生産菌において、異なるアミノ酸を認識してヒドラジドを形成することを明らかにした (論文 3)。このことは、窒素・窒素結合形成酵素の基質多様性を強く示唆しており、本酵素の分子基盤解明により天然物を凌駕する新規生理活性分子の創製が期待できる。現在 *in vitro* 変換実験による脂肪酸・アミノ酸縮合分子の構築を遂行中であり、新規アゾキシ化合物の生合成リデザインを目指す。

文献

- (1) Kunitake, H., Hiramatsu, T., Kinashi, H., and Arakawa, K. (2015) Isolation and biosynthesis of an azoxyalkene compound produced by a multiple gene disruptant of *Streptomyces rochei*. *ChemBioChem* **16**: 2237-2243.
- (2) Nindita, Y. *et al.* (2019) The genome sequence of *Streptomyces rochei* 7434AN4, which carries a linear chromosome and three characteristic linear plasmids. *Sci. Rep.* **9**: 10973.
- (3) Tanaka, Y. *et al.* (2023) Isolation of hydrazide-alkenes with different amino-acid origins from an azoxy-alkene-producing mutant of *Streptomyces rochei* 7434AN4. *J. Nat. Prod.* **86**: 2185-2192 (2023).
- (4) Tatsukawa, A., Tanaka, Y., Nagano, H., Fukumoto, A., Anzai, Y., and Arakawa, K. (2022) Isolation, biosynthetic investigation, and biological evaluation of *maniwamycin* G, an azoxyalkene compound from *Streptomyces* sp. TOHO-M025. *J. Nat. Prod.* **85**: 1867-1871.
- (5) Shi, J. *et al.* (2023) Conserved enzymatic cascade for bacterial azoxy biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **145**: 27131-27139.
- (6) Maleckis, M. *et al.* (2024) Biosynthesis of the azoxy compound *azodyrecin* from *Streptomyces mirabilis* P8-A2. *ACS Chem. Biol.* **19**: 641-653.