

学 位 論 文 の 要 旨

論文題目 ネクトリシンの生合成機構の解明と製法構築への応用に関する研究

氏 名 宮内 隆記

第1章ではイミノ糖の発見と医薬への応用とその生合成について紹介するとともに、本研究を開始した経緯について述べた。

微生物や植物などが産生する糖のアナログ、イミノ糖は、一般にグリコシダーゼ阻害活性を有するため、糖尿病やウイルス感染、ライソゾーム病などの様々な治療薬への応用が報告されている。もっとも基本的なイミノ糖は、ピラノース環やフラノース環中の酸素が窒素に置換された構造を有する。イミノ糖の生合成に関しては実質的には6員環のデオキシノジリマイシンについて報告があるのみで、知見が乏しい。デオキシノジリマイシンについては、グルコースを中間体とする推定生合成経路が報告されている。

ネクトリシンは、糸状菌が産生する5員環のイミノ糖で、 α -、 β -グルコシダーゼ、 α -、 β -マンノシダーゼ阻害活性を示す。ネクトリシンの化学構造は、糖尿病治療薬として三共株式会社（現第一三共株式会社）にて創製された化合物であるCS-1036の部分構造（Cユニット）と類似している。CS-1036は、イミノ糖であるCユニットの化学合成コストが高いことが課題となっていた。そこで、醗酵生産で得たネクトリシンをCユニットの原料とすることでCS-1036の製造原価低減することを企図した。菌株のスクリーニングによって糸状菌である *Thelonectria discophora* SANK 18292 株をネクトリシン高生産株として見出したが、工業的に本菌株を利用するにはその生産性は非常に低かった。製造原価低減のためには、大量生産に適した遺伝子組み換え微生物によるネクトリシンの生産が魅力的と考えられたが、ネクトリシンの生合成遺伝子や生合成経路に関する情報は報告されていなかった。そこで本研究ではネクトリシン生合成機構を解明してその製法構築に応用することを目的とした。

第2章では *T. discophora* におけるネクトリシン生合成経路を解析した。

はじめに、デオキシノジリマイシンに関する先行研究を踏まえて、ネクトリシンの生合成中間体としてペントース類を推測した。そして、ペントース6種と糖アルコール1種を添加して *T. discophora* を培養したところ、本菌はこれらの中でD-キシロースを良く資化した。また、D-リボースを添加した場合にネクトリシンの生産量が増加した。そこで、D-キシロースとD-リボースの各種¹³C同位体を添加し、産生されたネクトリシンへの同位体の取り込みをNMRと質量分析で確認した結果、これらの基質はネクトリシンの中間体であり、その取り込みパターンはペントースリン酸回路を経る経路で矛盾なく説明できた。さらに、*T. discophora* 菌体抽出液中に4-アミノ-4-デオキシアラビニトールが含まれていることを精製物のX線結晶構造解析及び各種分光スペクトル解析、元素分析により明らかにした。この化合物に菌体抽出液を添加するとネクトリシンに変換されたことから本化合物がネクトリシンの前駆体であることが示された。以上より、ネクトリシンの *T. discophora* における推定生合成経路を提案した。

第3章では、4-アミノ-4-デオキシアラビニトールをネクトリシンへ変換する酵素（NecC）について解析した。

まず、菌体抽出液より硫酸沈殿と陰イオン交換クロマトグラフィーにより NecC を精製した。そして NecC をトリプシン消化し LC-MS/MS 分析した結果、いくつかのアミノ酸配列断片を同定できた。それらはデータベース検索によりグルコース-メタノール-コリンオキシダーゼと相同性を示した。また、NecC はフラビン骨格を有する補因子を含有し、オリゴマーを形成していた。NecC の活性については、至適 pH が 7.0、至適温度が 30°C であり、EDTA により阻害され、MnCl₂ により若干上昇した。さらに、4-アミノ-4-デオキシアラビニトールからネクトリシンへの変換反応は菌体から抽出後に *in vitro* で主に起こっていることを示した。そして、ネクトリシンの醗酵生産にあたっては、基質だけでなく NecC も活性を維持した状態で抽出されなければならないことを提言した。

第4章では、ネクトリシン生合成遺伝子を取得し、その機能を解析するとともに、遺伝子組換え大腸菌によるネクトリシン生産を検討した。

NecC 部分アミノ酸配列から設計した縮重プライマーで *necC* 遺伝子断片を取得、クローニングし、さらに *T. discophora* のゲノムライブラリーをスクリーニングすることで *necC* 遺伝子全長のクローニングに成功した。

残りのネクトリシン生合成遺伝子もゲノム上で *necC* 遺伝子座周辺にあると予想し、解析した結果、アミノトランスフェラーゼとコリンキナーゼに相同性を示す配列 (*necA* と *necB*) が見つかった。上記で推定された生合成経路がアミノ化と脱リン酸化反応を含むことから、これら 2 つの遺伝子がネクトリシンの生合成遺伝子の候補と考え、その機能を検証した。*necA* 遺伝子を破壊すると 4-アミノ-4-デオキシアラビニトールとネクトリシンの生産が観察されなくなり、*necA* 破壊株に *necA* を相補するとその生産が回復したことから、*necA* はネクトリシン生合成遺伝子であることが示された。*NecB* 遺伝子を破壊すると、ネクトリシンの生産は親株より顕著に減少したものの認められた。また、*necA* と *necC* を共に発現する組み換え大腸菌は、ネクトリシンを生産したことから、*necB* はネクトリシンの生合成に関係しているが必須ではないと推測され、*NecB* を代替し得る酵素の存在が考えられた。なお、*necC* 遺伝子についても破壊と相補によりその機能を検証したところ、*necC* が 4-アミノ-4-デオキシアラビニトールをネクトリシンへ変換する反応を担っていることが確認できた。

以上より、*NecA*、*NecB* により 4-アミノ-4-デオキシアラビニトールが生じ、*NecC* によりネクトリシンが生成すると推定された。この推定生合成経路は、アミノ化、脱リン酸化、酸化の各反応を含んでいる点がデオキシノジリマイシンの推定生合成経路と類似していた。しかし、これら 3 つのネクトリシン生合成酵素は、対応するデオキシノジリマイシンの推定生合成酵素との相同性がいずれも低かったため、新規性が高い酵素であることが示唆された。

そして、*necA/necB/necC* または *necA/necC* の共発現ベクターを導入した組み換え大腸菌は、ネクトリシンを生産できることを示した。

第5章では、総括と今後の展望について述べた。

今回得られたネクトリシンの生合成遺伝子の情報を活用することで異種発現によるネクトリシンの直接生産が可能になった。今後、遺伝子工学や代謝工学の手法を用いてその生産性を向上させることが期待される。また、本研究で得られた遺伝子情報を利用して天然物またはデータベース上の遺伝子を探索することで、他のイミノ糖の生合成機構の解明にも役立つのではないかと期待している。また、元株を利用することもできる。検討の結果、元株の菌株改良と培地改良によりネクトリシン生産量を当初の 65 倍に増加させることができた。そして、上記で得られた基本的知見を生かして 6 kL スケールでの大量製造プロセスを確立し、CS-1036 の製造原価低減を達成した。