

研究区分	教員特別研究推進（独創・先進的研究）
------	--------------------

研 究 テーマ	独自の新規酵素探索法を活用したゲノムマイニングで見出した機能未知酵素の機能解析				
研究組織	代 表 者	所属・職名	食品栄養科学部・助教	氏名	千菅 太一
	研究協力者	所属・職名	食品栄養科学部・准教授	氏名	中野 祥吾
		所属・職名		氏名	
		所属・職名		氏名	
	発 表 者	所属・職名	食品栄養科学部・助教	氏名	千菅 太一

講演題目	
新規 FAD 依存酸化酵素の機能構造解析	
研究の目的、成果及び今後の展望	
多剤耐性菌の出現により新たな抗生物質が求められており、創薬シーズとなる新規天然物の探索が進められている。データベースに登録されるアミノ酸配列をもとに新規天然物を探索するゲノムマイニングには、探索起点となる新規酵素のアミノ酸配列が重要である。しかし一般に、新規酵素の発見は難しく、これに伴いゲノムマイニングによる新規天然物発見も容易ではない。そこで我々は、アミノ酸配列中の共変異に基づく独自の酵素探索プログラムで新規酵素を見出し、そのアミノ酸配列を探索起点とするゲノムマイニング法の開発に取り組んでいる。本研究では、本法で見出した新規酵素の機能を解明し、この新規酵素を起点としたゲノムマイニングによる新たな天然物発見の実現可能性を探る。 微生物由来の新規酵素 (Hyp) は推定 FAD 依存酸化酵素である。Hyp、およびそのホモログをコードする遺伝子は、宿主微生物のゲノム上で L-リシン酸化酵素 (LysO) をコードする遺伝子と隣接して存在していた。そのため、Hyp と LysO が協働する L-リシン代謝系の存在が示唆された。そこで、Hyp の <i>in vitro</i> 酵素機能解析に取り組んだ。大腸菌異種発現にて Hyp、および LysO の組み替えタンパク質を発現させ、ニッケルアフィニティクロマトグラフィーで各精製酵素溶液を調製した。精製 Hyp 溶液は黄色を呈しており、補因子として FAD が結合した活性型であることが示唆された。L-リシン、Hyp、LysO を混合した酵素反応液を紫外可視分光光度計で分析した結果、Hyp の酵素反応生成物 (化合物 X) に由来する波長 340 nm の吸光度変化が観察された。化合物 X の化学構造決定に向けて、酵素反応液から各種クロマトグラフィーで化合物 X を単離し、NMR 分析、質量分析を行った。その結果、化合物 X は新規環状アミノ酸であることが分かり、Hyp はこれまで報告例のない反応を触媒する新規酵素であることが明らかとなった。 Hyp の触媒反応機構について知見を得るため、X 線結晶構造解析に着手した。種々の条件検討の結果、Hyp と基質模倣化合物との複合体結晶構造を分解能 1.7 Å で決定することに成功した。結晶構造に基づき、基質結合様式を推定し、活性中心近傍に存在するアミノ酸残基を対象とした部位特異的変異解析の結果も併せて、Hyp の触媒反応機構を提唱することができた。 新規環状アミノ酸合成酵素 Hyp のアミノ酸配列を参照としたゲノムマイニングの結果、Hyp と LysO ホモログの遺伝子を含む多様な遺伝子クラスターが見出された。今後、これら遺伝子クラスターの解析によって、新規環状アミノ酸に由来する新たな天然物の発見が期待される。	 化合物X (新規環状アミノ酸)