

氏名	秋山友了
学位(専攻分野の名称)	博士(バイオサイエンス)
学位記番号	甲第736号
学位授与の日付	平成29年3月20日
学位論文題目	<i>Microbacterium</i> sp. HM58-2株のヒドラジド代謝機構の解析
論文審査委員	主査 教授・博士(農学) 矢嶋俊介 教授・農学博士 吉川博文 教授・農学博士 新村洋一 博士(農学) 殿塚隆史*

論文内容の要旨

Introduction

ヒドラジン (H_2NNH_2) は有機合成化学の分野において、還元剤、求核剤として重要な化合物である。ヒドラジン誘導体のうち、ヒドラジンとカルボン酸が脱水縮合した構造をもつ化合物をヒドラジド ($\text{R}_1\text{C}(=\text{O})\text{NR}_2\text{NR}_3\text{R}_4$) と呼ぶ。マレイン酸ヒドラジドはマレイン酸 ($\text{C}_2\text{H}_2(\text{COOH})_2$) とヒドラジンによって合成され農薬や除草剤に用いられるが、逆反応により発生するヒドラジンに発がん性があるため食物に含まれるマレイン酸ヒドラジドの残留量に制限が設けられている。また isonicotinic acid hydrazide (pyridine-4-carbohydrazide) は安価で入手しやすい結核の治療薬として有名であるが、複数の副作用が引き起こされることが知られている。天然のヒドラジド誘導体としてはマッシュルーム *Agaricus bisporus* の有する agaritine (2-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]-glutamohydrazide) が知られている。しかし、これらの物質の生体における代謝や生合成については未解明な部分が多い。Isonicotinic acid hydrazide はラットの肝臓の P450 によって isonicotinic acid と hydrazine に分解されることや、ウサギが有する amidase により分解されることが示唆されているが、その詳細は明らかとなっていない。

2012年に C=N 結合をもつ化合物の分解が可能な酵素を見いだすためにヒドラジンやヒドラジドを資化できる微生物のスクリーニングが行われた。ヒドラジン誘導体のうち、4-hydroxybenzoic acid 1-phenylethylidene hydrazide (HBPH) を唯一の炭素源とした培地で生育可能な微生物、*Microbacterium* sp. HM58-2 株が単離された。更に、本菌が有するヒドラジド分解活性をもとに、HBPH を加水分解し 4-hydroxybenzoate (PHB) と

acetophenone hydrazone を生じる hydrazidase が単離、同定された。

現在、有機合成により様々な化合物が工業的に作られ医薬品・農薬・染料・塗料などに用いられているが、それらによる環境汚染が問題となる場合がある。一部の非天然化合物は難分解性であるため環境中に滞留しやすく、また、人体や野生動物に悪影響をあたえる環境ホルモンとして働く場合もあることが知られている。除草剤中に含まれ、塩化有機物を燃焼させた際にも発生するダイオキシン類は、発癌性、生殖毒性、免疫毒性などが危惧されている。また、殺虫剤として使用されている dichloro-diphenyl-trichloroethane (DDT) には発がん性があることや、環境ホルモンとして働くことから使用が制限されているが、すでに使用された DDT の残留が問題となっている。このような化合物を分解、無毒化して環境を修復する手法として、微生物や植物を利用する生物環境浄化(バイオレメディエーション)が試されている。このように生物の有する潜在的な能力を探索、解析することで、様々な応用につながる可能性がある。

ヒドラジド化合物は比較的合成が容易なことや、原料のヒドラジンやカルボン酸も入手が簡単なことから様々な利用されている。一方で、天然にはほとんど存在しないため、一般的には生物はヒドラジドを代謝する機構を持っていないと考えられる。これまでに、生物によるヒドラジドの分解についてはいくつか報告があるが、生物がどのようにヒドラジドを認識し、代謝しているかについてはほとんど知られていない。HBPH も人工的に合成されたヒドラジドであり、天然に存在しないと思われるため、*Microbacterium* sp. HM58-2 株がなぜ HBPH を炭素源に生育できるのか大変興味深い。また、本菌を

* 東京農工大学大学院 農学研究院 教授

利用することにより人工的に製造され、環境に蓄積したヒドラジド化合物の検出や浄化技術への応用の可能性も考えられる。そこで本研究では、*Microbacterium* sp. HM58-2株のヒドラジド代謝機構の解明を目指し、ヒドラジド代謝関連遺伝子の特定とその蛋白質構造機能解析を行った。

***Microbacterium* sp. HM58-2株のゲノム解析とヒドラジド応答**

Microbacterium sp. HM58-2株の有する hydrazidase 以外のヒドラジド代謝関連遺伝子を探索するために、*Microbacterium* sp. HM58-2株のゲノム配列解析をショートリード型のシーケンサーを用いて行った。その結果、*Microbacterium* sp. HM58-2株の約 3.46Mbp のドラフトゲノムを得ることができた。ゲノムのアノテーションを Microbial Genome Annotation Pipeline (MiGAP) version 2.19で行ったところ 3,565の遺伝子コード領域と、3つの rRNA 領域、45の tRNA 領域を推定することができた。遺伝子の大部分が *M. testaceum* StLB037の遺伝子で注釈付けられた。*M. testaceum* StLB037のゲノムは約 3.98Mb に 3,532の遺伝子コード領域があり、このことから HM58-2株のドラフトゲノムシーケンスは全長をほとんどカバー出来ていると推定した。Hydrazidase 遺伝子の前後に one component system 転写因子 IclR と ABC トランスポーターを構成するサブユニット遺伝子群が位置していた。これらの遺伝子発現の HBPH に対する応答を調べるため、培地の炭素源を HBPH、glucose それぞれに限定した際の遺伝子の発現量を RT-qPCR にて測定した。その結果、すべての遺伝子の発現が glucose 培地では抑えられているものの、HBPH を添加する事により遺伝子の発現が誘導された。これは *Microbacterium* sp. HM58-2株が hydrazidase とその上流と下流に位置する遺伝子を同様の機構により転写調節し、HBPH を代謝する際にはそれらを同時に利用していることが考えられた。そこで、*Microbacterium* sp. HM58-2株のヒドラジド代謝機構を解析するために IclR, hydrazidase, ABC トランスポーターの基質認識に関して、以降の解析を行った。

***Microbacterium* sp. HM58-2株由来 SBS の基質特異性**

Microbacterium sp. HM58-2株が HBPH を資化するためには、まず化合物を菌体内に取り込む必要がある。そのための仕組みとして hydrazidase とともに遺伝子発現が誘導される ABC トランスポーターが考えられ

た。そこで、ABC トランスポーターの構成要素のうち、基質の認識に最も重要であると考えられる基質結合サブユニット (SBS) について、その基質特異性を Biacore X100 を用いて測定した。SBS と HBPH の解離定数 (Kd 値) をアフィニティー解析により測定した。RU 値を縦軸に、アナライト濃度を横軸にとり、各濃度で測定した結果をプロットすると、良好なカーブフィッティングが描けた。ここから SBS と HBPH の Kd 値を算出すると 19.93 μ M であった。一方で、SBS と PHB の Kd 値について、HBPH をアナライトとした時と同様に測定したが SBS と PHB の Kd 値は算出できなかった。これは、SBS と PHB の Kd 値が大きすぎるためだと考えられる。このことから、この ABC トランスポーターは hydrazidase に分解される前の基質を特異的に輸送していると推察した。

Hydrazidase の立体構造と基質特異性

Microbacterium sp. HM58-2株のスクリーニングにあたっては、ヒドラジド化合物として HBPH が使用された。そこで、HBPH を分解する hydrazidase がどのような化合物を分解するのか、その基質特異性を明らかにするため、hydrazidase および S179A 変異体と 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (HBH) 複合体の結晶構造をそれぞれ 1.6Å と 1.8Å の分解能で決定した。野生型と変異体どちらもホモ 2 量体で構成されていた。Amidase signature enzyme family で高度に保存され特徴づけられた Ser-cisSer-Lys 触媒 3 残基は、野生型 hydrazidase の結晶構造でも S179-cisS155-K80 の 3 残基として確認された。Hydrazidase と 3 次構造の類似検索を行う Dali server から得られた amidase の構造とを重ね合わせたところ、これらの全体構造はよく重なったが、基質結合ポケットの周りの二つの領域で違いが見られた。これらの amidase のアミノ酸配列アライメントにおいて、この二つの領域は amidase signature では保存されていない C 末端に位置し、構造の多様性を生むことで酵素の基質特異性の違いを起していると思われる。変異体の構造中には HBH の電子密度が鮮明に確認された。HBH の 4 位の水酸基は水分子と水素結合を形成しており、その水分子はさらに H336 と別の水素結合を形成していた。また、水素結合が C129 のカルボニル酸素と HBH のアミド基との間で形成されていた。基質結合における H336 および C129 残基の役割を調べるため、C129A, C129S, および H336A 変異体の酵素活性を測定した。その結果 hydrazidase 活性は著しく低下し、野生型に比べてそれぞれ 10%, 30%, 1% となっ

た。このことから、これらの残基は hydrazidase の基質認識に重要な残基であると考えられた。

アポ体と想定していた野生型 hydrazidase の活性部位に鮮明な電子密度が見られた。実験中に使用している試薬に電子密度に合致する化合物はなかった。また、電子密度の形状は環状化合物が触媒残基の S179 と共有結合していることを示していた。変異体 S179A に結合していた HBH と同様に、この化合物は C129 と水素結合を形成し、さらに水分子を介して H336 とも相互作用していた。これらのことから、hydrazidase において C129 と H336 はその基質特異性の決定に重要であると考えられた。本研究で使用されている hydrazidase は、人工合成基質 HBPH を加水分解するが、酵素の天然の基質は同定されていない。また、結晶構造から 4-hydroxybenzoate を基質の部分構造として持つことが必要であると考えられた。野生型の hydrazidase に結合していた未知の化合物は *Microbacterium* sp. HM58-2 株が本来利用している基質の候補かもしれないが、さらなる解析が必要である。

***Microbacterium* sp. HM58-2 株由来 IclR (Mi-IclR) の立体構造解析**

Microbacterium sp. HM58-2 株では、培地への HBPH 添加により hydrazidase や ABC トランスポーターの遺伝子発現が誘導された。これらの遺伝子上流に位置している IclR ファミリーの転写因子は、one component system として、基質を受容し転写制御を行うことが知られており、この転写因子がヒドロジド代謝の遺伝子制御に関わっていると考えた。そこでまず、Mi-IclR の基質特異性を明らかにするために、Micro Scale Thermophoresis を用いて HBPH 及び 4-hydroxybenzoate (PHB) との Kd 値を測定した。その結果、それぞれの Kd 値は 60-200 μ M, 152 μ M と算出された。さらに、Mi-IclR が基質を受容した際の構造変化を調べるため、アポ体と Mi-IclR/PHB 複合体 (ホロ体) の X 線結晶構造解析を行い、それぞれ 2.1 Å と 2.0 Å の分解能で構造を決定した。Mi-IclR のサブユニット構造は Protein Data Bank に登録されている他の IclR と同様に、N 末端側の helix-turn-helix (HTH) 型 DNA 結合ドメイン (DBD, 残基 Met1-Leu67) と C 末端側の基質結合ドメイン (SBD, Ser79-Trp250) が短いリンカーヘリックス (Gly68-Gly78) で連結されていた。ホロ体においては、SBD の基質ポケットにおいて、基質である PHB の電子密度がはっきりと確認できた。PHB は N127, L128, S141, S142 と直接水素結合を形成し、S142, I196 (主鎖) とは

水を介して水素結合していた。また、ベンゼン環は L135, I196, V220 の疎水性残基と疎水結合していた。アポ体とホロ体でドメインごとに大きな構造変化はなかったが、基質結合ポケットの近くで僅かに変化が見られた。R130 から R134 にかけての領域はアポ体ではループ構造をしていたが、ホロ体では β シート構造をしていた。これは、ループ上に位置する L135 が基質を認識することで、ループ構造ごと基質ポケットに引きつけられ、その結果構造変化が起きたためと考えられる。アポ体とホロ体は同様にリンカーヘリックスの部位で 2 量体の各サブユニットが交差する X 型の全体構造をとっていたが、両者ではドメインの相対的位置が大きく変化していた。アポ体とホロ体の各 A 鎖の DBD を重ね合わせてみると、B 鎖の DBD はよく重なるが、SBD はリンカーヘリックスを軸に約 105 度回転していた。リンカーヘリックスと SBD の間の Gly78 がヒンジの役割をし、この位置で屈折し、SBD が回転していた。アポ体とホロ体の DBD, SBD はそれぞれきれいに重なるため、DBD と SBD はともに剛体として動いていることが解った。さらに、ホロ体では DBD と SBD の位置関係を決定するような水素結合が、DBD のループに位置する D24 と SBD の R130 の間で見られた。この水素結合はアポ体では R130 の位置が定まらず形成出来ないと推察され、基質が結合することによって生じる Mi-IclR の DBD と SBD の位置関係が変わる構造変化の要因になっていると考えられた。基質が結合したホロ体の DBD, SBD を含む全長構造は今回の Mi-IclR で初めて明らかとなったが、IclR family 間の構造比較により、このような構造変化は共通していると考えられ、基質が結合した際に転写活性を変化させる要因になっていると考えられた。

Mi-IclR の結晶構造はアポ体の時に 4 量体、ホロ体で 2 量体を形成していた。この構造変化が結晶のパッキングによる影響かどうかを調べるため、溶液中の PHB の有無による Mi-IclR の量体形成をゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより測定した。その結果、PHB を含まない溶液中では 4 量体を、PHB を含む溶液中では 2 量体を形成しており、結晶構造と一致した。Mi-IclR のアポ体は SBD の DBD と反対側にある α ヘリックスを界面にし、2 量体を単位として結合している。しかし、ホロ体ではこの α ヘリックスが構造変化によりペアを組むダイマーと近接出来なくなっていた。そのため、アポ体とホロ体で量体形成に違いが出たと考えられる。

細菌の遺伝子発現制御においては、いくつかの superfamily を含む多くの例が知られている。そこで、

Mi-IclR に基質が結合した際の構造変化について IclR family 以外の one component system 転写因子との比較を行った。One component system 転写因子のうち、tetracycline repressor (TetR), lactose operon repressor (LacI), LysR type transcriptional regulators (LTTRs) について詳細な研究がされている。Mi-IclR との比較の結果、これらの転写因子は family によってそれぞれ異なる構造変化により転写活性を制御していた。その中で基質を結合することで DBD を軸に SBD が回転し、2 量体構造や量体形成を変化させる Mi-IclR の構造変化は他のシステムとは異なる、新しい転写調節のメカニズムである可能性が考えられた。

最後に

Microbacterium sp. HM58-2 株ゲノム配列から明らかとなったオペロン遺伝子のタンパク質について、X 線結

晶構造解析を主要な手段として用い、その基質特異性の解析を含めヒドラジド代謝機構の解明を行った。これらの結果から、本菌は ABC トランスポーターで取り込んだ HBPH を hydrazidase により分解し、分解産物である PHB を転写因子である IclR が受容することでオペロン遺伝子の発現を促進していると考えられた。また、ゲノム解析の結果から本オペロンの近傍に benzoate 代謝パスウェイが存在することも確認でき、生じた PHB がこのパスウェイを介して資化されると考えられた。*Microbacterium* sp. HM58-2 株が自然界でどのような化合物を代謝するためにこれらの遺伝子を用いているかについては、さらなる解析が必要である。一方で、本研究で明らかとなったヒドラジド代謝関連遺伝子を制御することで、*Microbacterium* sp. HM58-2 株を用いたヒドラジド化合物のセンサーや浄化システムの開発が期待される。

審査報告概要

本研究では、非天然物化合物であるヒドラジド化合物を唯一の炭素源として生育可能な、*Microbacterium* sp. HM58-2 株におけるヒドラジド代謝機構の解明を行った。ゲノムシーケンスによる代謝関連遺伝子の同定、X 線結晶構造解析による代謝関連蛋白質の立体構造解析の結果から、基質認識メカニズムなどを明らかにした。特に、one component system 型転写因子である IclR について、基質結合による構造変化を初めて捉えることに成

功した。これらの結果から、化合物の取り込みから分解、資化にいたるまで、代謝およびその制御メカニズムを明らかにした。

主査および副査から審査報告がなされ、専攻内可否を審議した。その結果、学位請求論文の研究内容や発表会での質疑応答が十分であることが認められた。よって、審査員一同は博士（バイオサイエンス）の学位を授与する価値があると判断した。