

【目的】 メチオニンは生育に必須なアミノ酸の 1 つであり、タンパク質の合成や生体内反応に広く用いられる *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) の合成にも使用される。SAM はメチル化反応の基質として多用され、代謝産物の構造多様性の創出に重要な役割を果たしている。それゆえ、メチオニン生合成に関する新たな知見は、メチオニンや SAM、これらを基質として利用する化合物の発酵生産や抗菌剤開発の重要な基盤となる。*Streptomyces* 属放線菌は、土壤中に豊富に存在するグラム陽性の細菌であり、Avermectin, Streptomycin, Altemicidin 等の抗生物質を含む様々な二次代謝産物を生産する産業上重要な菌である。二次代謝産物の生合成において、SAM はメチル基供与体や骨格形成の基質として利用されることから、放線菌におけるメチオニンの生合成研究は多様な二次代謝産物の生産に重要な知見を与えると考えられる。これまでに、多くの *Streptomyces* 属放線菌のゲノムが解読されており、その遺伝子情報を解析すると、一般的なメチオニン生合成に利用される *metA* や *metX* 遺伝子を欠く菌が多く存在していた。抗菌物質である ϵ -poly-L-lysine を生産する放線菌 *Streptomyces albulus* NBRC14147 のゲノム情報の解析により、この菌は *metA* や *metX* 遺伝子だけでなく、植物型やメタン古細菌型の生合成遺伝子も欠くことから、新規なメチオニン生合成経路を有することが期待された。これまでに我々は、*S. albulus* NBRC14147 の遺伝子情報を解析することで、上流に SAM リボスイッチと推測される遺伝子領域を有し、下流に thiamine や L-cysteine などの生合成に関与する Sulfur-carrier protein と機能予測されるタンパク質をコードする遺伝子 (以降 *metO*) を有する遺伝子 (以降 *metM*) を見出し、このクラスターが *Streptomyces* 属に高度に保存されていることを見出した。そこで本研究では、それら遺伝子に着目し、破壊株の栄養要求性確認や組換え酵素・タンパク質を用いて酵素機能の同定を行うことで、放線菌における新規なメチオニン生合成経路の解明を目指した。

【方法】 *S. albulus* NBRC14147 のゲノムを鋳型に PCR を行い、目的断片をクローニングすることで、破壊株作製用と組換え酵素タンパク質発現用のプラスミドを作製した。破壊株作製用のプラスミドを接合伝達法により *S. albulus* に導入し、その後に抗生物質耐性の有無による選別を行い、homoserine dehydrogenase をコードする *hsd* と homoserine kinase をコードする *hk* と *metM* の各種破壊株 (Δhsd , Δhk , $\Delta metM$) を取得した。破壊株の生育試験には最少培地である M9 培地を用いた。組換え酵素の取得は、大腸菌を宿主として用いた。系統樹解析には MEGA11 を用いた。

【結果】 各種破壊株の生育試験の結果、*hsd* だけでなく *hk* と *metM* もメチオニン生合成に必須であることが判明した。組換え酵素・タンパク質を用いた実験から、MetO の C 末端に存在する 90-GGC-92 配列は Mec により C 末端の cysteine 残基が加水分解されること、これにより生じる MetO- Δ C は MetM と相互作用することが明らかにされた。MetM の機能解析により、これが MetO- Δ C のチオカルボン酸化体 (MetO- Δ C-thiocarboxylate) と *O*-phospho-L-homoserine から L-homocysteine を合成する酵素であることを示した。メチオニン生合成において *O*-phospho-L-homoserine を中間体として利用する経路は植物に知られるのみであり、微生物が利用することを初めて明らかにした。MetO- Δ C-thiocarboxylate のアナログを用いた実験結果から、MetM の反応機構を推定した。BLAST 検索とその系統樹解析から、古細菌や細菌の一部も MetM ホモログをコードする遺伝子を有することを示した。

放線菌における新規メチオニン生合成経路

