

シネフンギン生産菌 *Streptomyces incarnatus* NRRL 8089 由来 アルギニン変換化合物「オルニチンラクタム」の同定

福田 康二・田村 隆・稲垣 賢二
(農芸化学コース)

Identification of Ornithine-lactam Converted from Arginine in *Streptomyces incarnatus* NRRL8089

Koji Fukuda, Takashi Tamura and Kenji Inagaki
(Course of Agrochemical Bioscience)

Sinefungin is a nucleoside antibiotic, in which a molecule of L-ornithine is linked to the 5' end of adenosine through a C-C bond. The antibiotic was isolated from the culture broth of *Streptomyces incarnatus*. For the purpose of detecting intermediate of sinefungin biosynthesis, resting cell suspensions were incubated with supplemental L-arginine, and L-ornithine. 50mM Arginine was converted to a compound X that has low polarity. 50mM ornithine was not converted and remained in reaction solution. Compound X was purified using HPLC, and analyzed using ¹H-NMR and FAB-MS. These analyses showed that a compound X is "ornithine-lactam" (Mw=114), which has a structure of circularized ornithine. These results indicated that *S. incarnatus* has an enzyme that converts arginine to ornithine-lactam. Such an enzyme has never been reported, and suggested that it may be relevant to sinefungin biosynthesis.

Key words : sinefungin, arginine, ornithine, *Streptomyces*

緒 言

シネフンギンはオルニチンとアデノシンが結合した構造を有する核酸系抗生物質でありこの抗生物質は放線菌 *Streptomyces griseolus*¹⁾と放線菌 *Streptomyces incarnatus* NRRL8089 の培養液中から個々に単離された²⁾ (Fig. 1). この抗生物質は抗真菌³⁾, 抗ウイルス活性を示し⁴⁾, 原虫, 寄生虫の生育を阻害する⁵⁾. シネフンギンはS-アデノシルメチオニン (SAM) のアナログとして機能し, SAM 依存メチル化転移酵素阻害剤として機能する事が知られる⁶⁾. このユニークな核酸系抗生物質の生合成機

構についてはその構造からオルニチンとアデノシンが前駆体であると推測された⁷⁾. 一方, ¹⁴C 標識前駆物質を使用した無細胞抽出液でのトレーサー実験からL-アルギニンと ATP から合成されることが推測された⁸⁾. しかしながら, その関連遺伝子, 関連酵素の詳細は抗生物質が最初に単離され30年以上経つ現在も明らかにされておらず, シネフンギン合成の全貌に極めて興味が持たれる.

本研究ではシネフンギン生産菌 *S. incarnatus* (Fig. 2) を用いた. シネフンギンの生合成は二次代謝制御遺伝子による厳格な制御を受けていると考えられ, 野生株によるシネフンギン生産は極微量に留まった. そこでこれまで培地, 培養日数, 緩衝液, 培養 pH など数多くの条件検討を行うと共に緩衝液により二次代謝を誘導する休止菌体反応を用いたシネフンギン生産性の研究を行ってきた. また RNA ポリメラーゼβサブユニットをコードする *rpoB* 遺伝子への A1340G 変異による二次代謝制御系破壊 (*rif* 変異) の研究によりシネフンギン高生産変異株を作成した.

ストレプトマイシン生合成 (*Streptomyces griseus*),

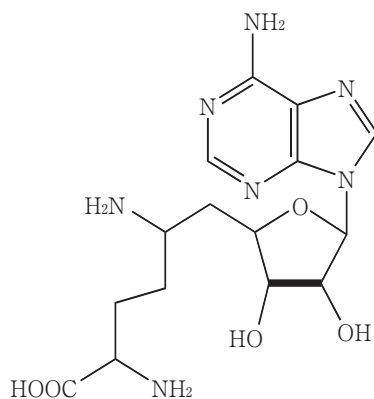


Fig. 1 Structure of sinefungin.

Received October 1, 2009

岡山大学大学院自然科学研究科

(The Graduate School of Natural Science and Technology,
Okayama University)

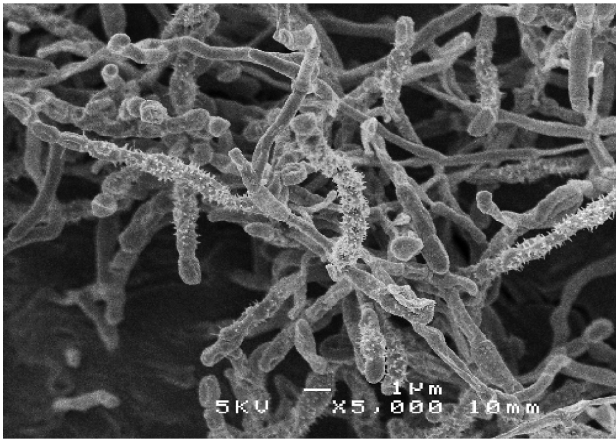


Fig. 2 Scanning electron microscopy of *Streptomyces incarnatus*.

クラブラン酸生合成 (*Streptomyces clavuligerus*) に代表されるように放線菌の抗生物質生合成は二次代謝として制御され、ひとつの抗生物質生合成遺伝子群を形成し複数の酵素により段階的に合成されることが広く知られる^{9,10}。 *S. incarnatus* によるシネフンギン生合成も同様に抗生物質生合成遺伝子群を形成し数段階の反応により行われることが推測されるので、シネフンギン生合成経路に含まれる中間体を同定出来れば、生合成酵素を精製し、*N*末アミノ酸配列を決定することにより遺伝子クローニングが可能となる。

本研究では今回これまでに確立したシネフンギン高生産系に前駆体と推測されるアルギニン、オルニチンを加えて経時的に休止菌体反応液の変化を追跡し、シネフンギン生合成に関わる中間体の探索を行った。

1. 菌株と培養条件

S. incarnatus NRRL 8089 は米国農務省 ARC culture collection より譲渡された。胞子懸濁液を 5 ml GYM 培地 (1% グルコース, 1% 乾燥酵母エキス, 1% 麦芽エキス) で 30°C, 48 時間前培養後, 100 ml GYM 培地へ 1 ml を植え 30°C, 48 時間, 150 rpm で培養を行った。遠心分離して得られた菌体を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6) へ懸濁し, 2 回洗浄を行った。同緩衝液 50 ml へ再懸濁したものを休止菌体反応液とした。

2. 前駆物質の投与と経時変化の分析

終濃度 10 mM, 50 mM L-アルギニンと 10 mM, 50 mM L-オルニチンを休止菌体反応液中に投与した。これらの前駆体を含む溶液はあらかじめ pH 6 に調整した。0, 3, 9, 24, 48, 72 時間で 1 ml をサンプリングした。凍結乾燥で濃縮し TLC (Kieserger F254) に 0.5 μl をアプライし, エタノール:28% アンモニア水 = 5:2 で展開を行った。展開後ニンヒドリン発色によりアミノ酸の分析を行った。

3. アルギニン由来化合物の精製 (HPLC)

アルギニン由来化合物の精製には HPLC を使用した。強カチオン交換カラム (CAPCELL PAK SCX column, 4.6 mm I. D. × 150 mm, 資生堂) を用い, 溶離液には 125 mM ギ酸アンモニウム (pH 4) を使用, 流速 1 ml/分とした。1 ml ごとに画分を回収し凍結乾燥を使用し濃縮後 TLC で分析を行った。目的化合物が含まれる画分を同 HPLC へと供し, 流速 0.5 ml/分で 0 - 4 分は 1 ml ごとに回収, 4 - 6 分は 4 滴ずつ回収し, 7 - 10 分は 1 ml ごとに回収した。これらを凍結乾燥し, 20 μl 水へ濃縮後 TLC (エタノール:28% アンモニア水 = 5:2) で分析を行いニンヒドリン発色により分析を行った。

4. ¹H-NMR による分析

精製サンプルを 2 回凍結乾燥後, 500 μl の重水に懸濁し ¹H-NMR (Varian VXR-600) 分析を行った。

5. FAB-MS による分析

精製サンプルを凍結乾燥後, 100 μl メタノールに溶解し, FAB-MS (日本電子 JEOL JMS-SX102A) を使い Positive mode で解析を行った。

休止菌体への前駆体投与

休止菌体反応液へ前駆体と推測されるアルギニン, オルニチンを投与した。その結果 10 mM アルギニンは 9 時間以内, 50 mM アルギニンは 24 時間以内にスポットが消失 (R_f = 0.2) した。50 mM アルギニン投与反応液では 3 時間以降, 化合物 X (R_f = 0.4) が経時的に蓄積された。また 24 時間以降オルニチン (R_f = 0.12) が化合物 X に比べて微量であるが確認された (Fig. 3 B)。一方, オルニチン投与反応液では 10 mM, 50 mM 共に反応液中にオルニチンが残存した (Fig. 3 A)。

本結果からアルギニンが *S. incarnatus* により極性の低い化合物 X へと変換されたことが示された。またアルギニンをオルニチンに変換するアルギナーゼを本菌株は有するが, 化合物 X の合成活性が強く, 投与したアルギニンのほとんどが化合物 X の合成に使われたと考えられた。アルギニンが尿素回路内で一次代謝酵素アルギナーゼによりオルニチンに代謝されることは多くの生物で共通であり, *S. incarnatus* にも存在するが, それ以上に化合物 X への変換が優位な状態にあると言える。またメタノール処理により細胞内の経時変化も調査した結果, 細胞内に化合物 X の蓄積が認められた。*S. incarnatus* が細胞外酵素によりアルギニンを変換後細胞内へ取り込んだ, 或いはアルギニンを細胞内で変換後に細胞外へ化合物 X を放出した可能性が高い。オルニチンは化合物 X へと変換されず, アルギニン特異的に化合物 X 変換反応が生じる事が示唆された。

HPLC による化合物精製

HPLC により化合物 X の精製を行った。流速 1 ml/分

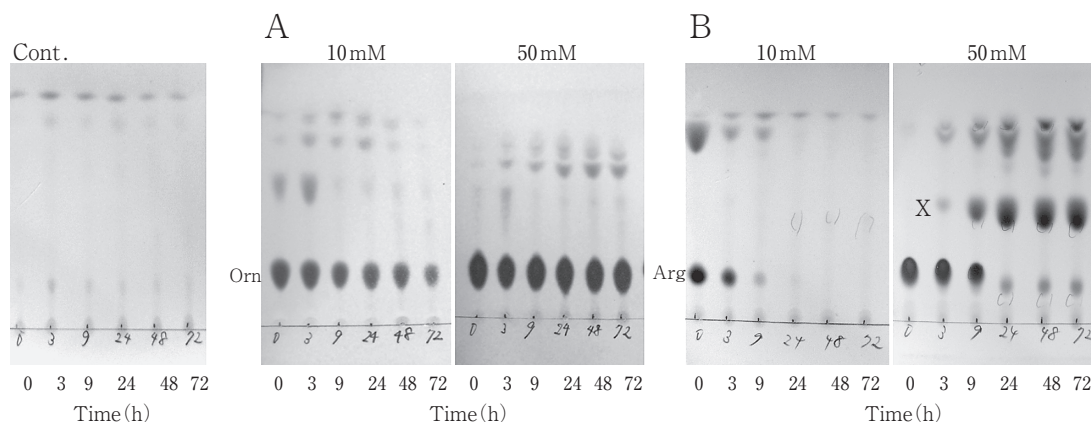


Fig. 3 Time dependent change of precursor in resting cell system.

Resting cell suspensions were incubated with 10mM, 50mM L-Arginine, and 10mM, 50mM L-Ornithine, and analyzed using TLC (EtOH : 28%NH₄OH = 5 : 2). A) Time dependent change of L-ornithine, B) Time dependent change of L-arginine.

で極性の高い化合物であることから強カチオン交換カラムを使用した。最初の精製でアルギニン、オルニチン、化合物Xを分離する事が出来た。しかしながら保持時間2-3分に化合物Xと極性の低い化合物が混在した(Fig. 4 A)。そこで流速 0.5ml/分で再度同条件 HPLC に供し、4滴ずつ分画を行い、凍結乾燥後 TLC で分析を行った。その結果保持時間7-8分に化合物Xを単離することが出来た (Fig. 4 B)。これを精製サンプルとし、NMR, MS 分析を行った (Fig. 4 C)。

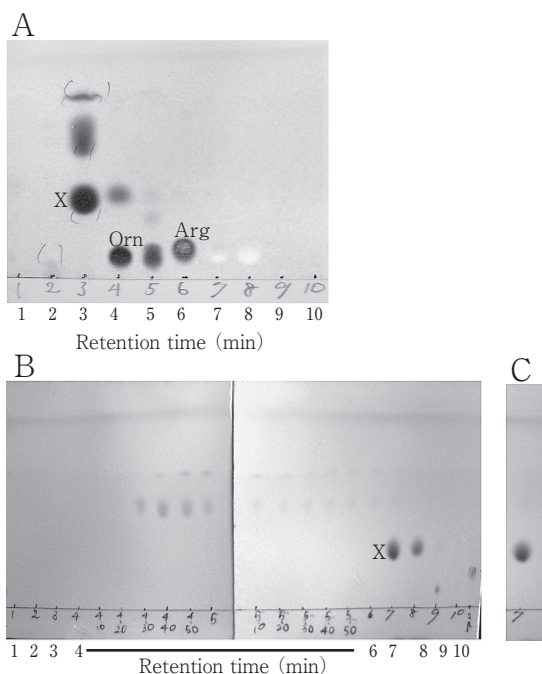


Fig. 4 Purification of a compound X using HPLC.

A) First purification using HPLC flowed 1 ml/min, B) Second purification using HPLC flowed 0.5ml/min, C) Purification sample of a compound X.

¹H-NMR, FAB-MS による化合物の構造決定

¹H-NMR による分析を行った。シネフンギン構造に含まれるアデニン、リボース由来のプロトンは観測されなかった。しかしながらアミノ酸骨格の α , β , γ , δ プロトンと推測されるスペクトルが観測された。このデータからアルギニンもしくはオルニチンの環状ジペプチド、もしくは環状モノペプチドであると推測した (Fig. 5)。

また FAB-MS のポジティブモードで、サンプルにグリセロールを加え分析を行った結果、 $m/z=115$ [M+H]⁺, $m/z=207$ [M+グリセロール]⁺ のマススペクトルが観測された。この結果より分子量114の化合物であると推定された (Fig. 6)。

¹H-NMR, FAB-MS の結果から、化合物Aはオルニチンが分子内脱水した環状モノペプチド「オルニチンラクタム」であることが示唆された (Fig. 7)。オルニチンラクタムはオルニチン高血症患者の血漿中に観測されるが、近年までその分析方法が確立されておらず生理学的な役割は不明である¹¹⁾。一次代謝でこのような反応の報告はなく、放線菌特有の二次代謝関連酵素であるかもしれない。また有機合成によりオルニチンからオルニチンラクタムを合成出来るという報告があるが¹¹⁾、今回の研究結果からオルニチンからは合成されず、アルギニン特異的にアルギニンから尿素が解離されオルニチンラクタムが合成されるこれまでに報告のない新規の酵素の関与が示唆された。

オルニチンラクタム合成とシネフンギン合成との関連

今回の結果からオルニチンラクタム合成酵素とシネフンギン生合成の関連性に最も興味を持たれた。これまでに *S. incarnatus* 中でシネフンギンはオルニチンでなくアルギニンが前駆体として生合成されるとトレーサー実

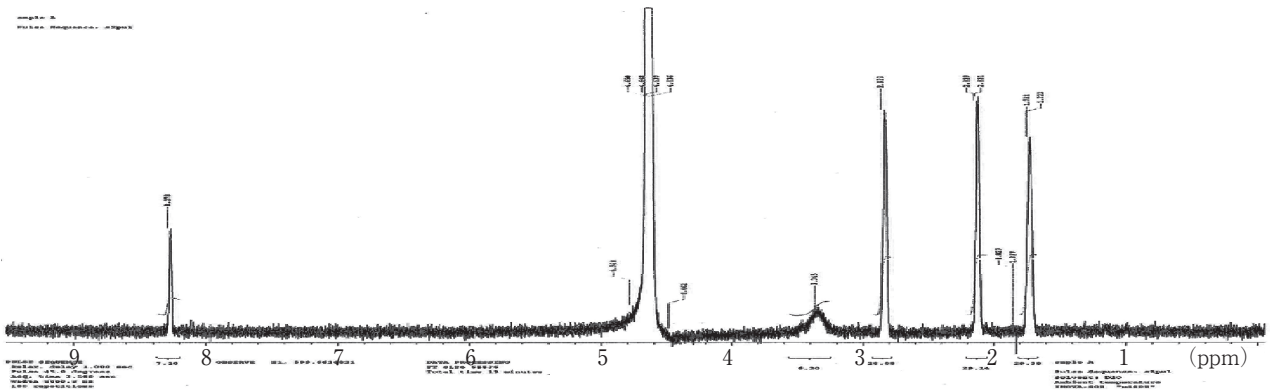
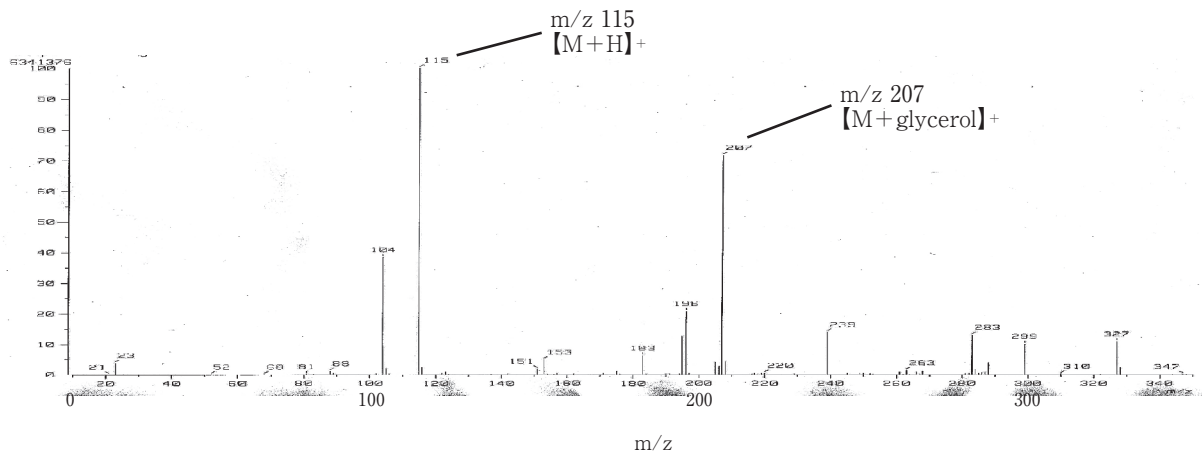
Fig. 5 $^1\text{H-NMR}$ for compound X.

Fig. 6 FAB-MS for compound X.

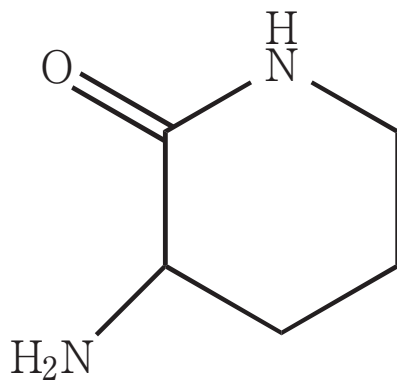


Fig. 7 Structure of ornithine-lactam.

験から推測されている⁸⁾。オルニチンラクタム合成反応もまたオルニチンではなくアルギニン特異的な反応であることを明らかにした。

シネフンギンはその構造中にグアニジノ基を持たず、シネフンギン生合成経路中にはアルギニン由来グアニジノ基解離反応が含まれると推測される。我々はこれまでにアルギニンと ATP が C-C 結合する第一反応が起こり、その後にグアニジノ基が解離する 2 段階反応を経てシネフンギンが合成されるという仮説を立てていた。しかしながら今回発見したオルニチンラクタムがシネフンギン合成中間体であれば、最初にアルギニンが尿素を解離し、その後 ATP との C-C 結合が起こる新たなシネフンギン合成経路の仮説が導かれる (Fig. 8)。この経路が正しければオルニチンラクタム合成酵素を精製し、N 末端配列を決定し、シネフンギン生合成遺伝子をクローニングするという新しいアプローチが可能となる。現在オルニチンラクタム合成酵素の精製を行っており、今後はシネフンギン生合成との関連性を明らかにしていきたい。

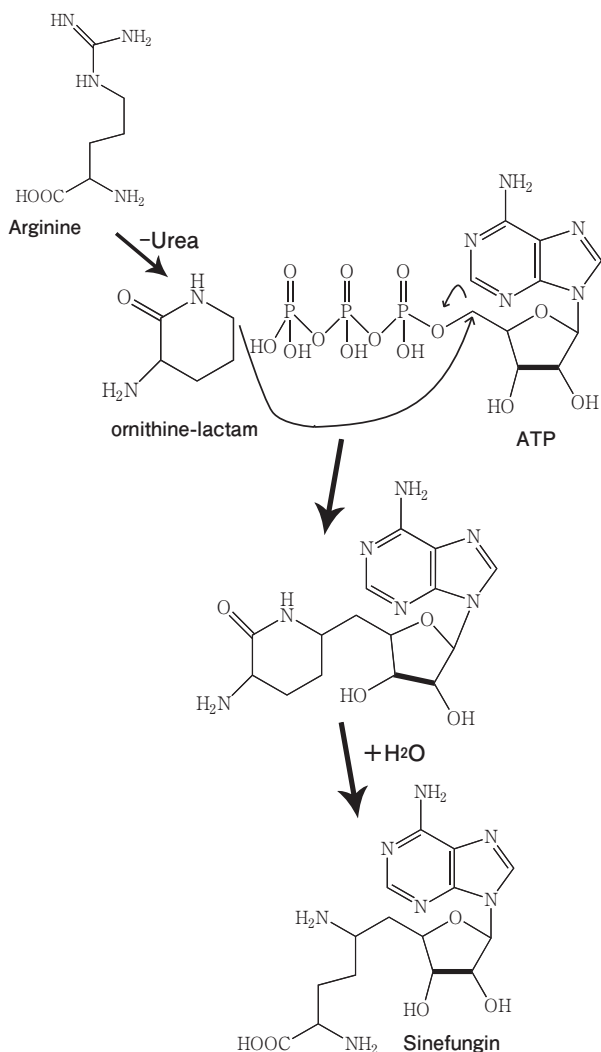


Fig. 8 Hypothetical pathway of sinefungin biosynthesis.

要 約

シネフンギンは抗真菌、抗マラリア活性を有する核酸系抗生物質であり、放線菌 *S. incarnatus* により生合成される。シネフンギンはアデノシンとオルニチンがC-C結合した構造であり、無細胞抽出液での取り込み実験からL-アルギニンとATPから生合成されると推測される。L-アルギニン、L-オルニチンを *S. incarnatus* の休止菌体反応系への投与を行いシネフンギン中間体の探索を行った。その結果50 mMアルギニンは24時間以内に低極性化合物へと変換された。一方50 mMオルニチンは変換されず反応液中に残存した。HPLCで化合物を精製し、¹H-NMR, FAB-MSでの分析の結果オルニチン環状モノペプチド、「オルニチンラクタム」(分子量114)であることを明らかにした。この結果は *S. incarnatus* がアルギ

ニンからオルニチンラクタムへの変換酵素を有する事を示唆する。このような酵素の報告例はこれまでになく、二次代謝酵素であることが示唆され、シネフンギン生合成との関連性に興味を持たれる。

謝 辞

本実験を行うにあたり機器を使用させていただいた、農学部質量分析室に感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Hamil, R. L. and M. M. Hoehn : A9145, a new adnine-containing antifungal antibiotic. I. discovery and isolation. *J. Antibiot.* (Tokyo), **26**, 463-465 (1973)
- 2) Florent, Y., Y. Lunel and D. Mancy : Nouvelle substance antifonginique, sapreparation et les compositions qui la contiennent, Fr. 7611141, Apr. 15 (1976)
- 3) Gordee, R. S. and T. F. Butler : A9145, a new adenine-containing antifungal antibiotic. II, Biological activity. *J. Antibiot.* (Tokyo), **26**, 466-470 (1973)
- 4) Pugh, C. S., R. T. Borchardt and F. O. Stone : Sinefungin, a potent inhibitor of viron mRNA (guanine-7N)-methyltransferase, mRNA (nucleoside-2'-)-methyltransferase, and viral multiplication. *J. Biol. Chem.*, **253**, 4075-4077 (1978)
- 5) Bachrach, U., L. F. Schnur, J. El-On, C. L. Greenblatt, E. Pearlman, M. Robert-Gero and E. Lederer : Inhibitory activity of sinefungin and SIBA (5'-deoxy-5'-S-isobutylthioadenosine) on the growth of promastigotes and amastigotes of different species of Leishmania. *FEBS Lett.*, **121**, 287-291 (1980)
- 6) Trager, W., M. Tershakovec, P. K. Chiang and G. L. Cantoni : Plasmodium falciparum : antimalarial activity in culture of sinefungin and other metylation inhibitors. *Exp. Parasitol.*, **50**, 83-89 (1980)
- 7) Parry, R. J., I. Y. Arzu, S. Ju and B. J. Baker : Biosynthesis sinefungin on the on the mode of incorporation of L-orntine. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 8981-8982 (1989)
- 8) Malina, H., C. Tempete and M. Robert-Gero : Biosynthesis of sinefungin by cell-free extract of *Streptomyces incarnatus* NRRL 8089. *J. Antibiot.* (Tokyo), **40**, 505-511 (1987)
- 9) Egan, S., P. Wiener, D. Kallifidas and EM Wellington : Transfer of streptomycin biosynthesis gene clusters within streptomycetes isolated from soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **12**, 5061-5063.
- 10) Elkins, J. M., I. J. Clifton, H. Hernández, L. X. Doan, C. V. Robinson, C. J. Schofield and K. S. Hewitson : Oligomeric structure of proclavaminic acid amidino hydrolyase : evolution of a hydrolytic enzyme in clavulanic acid biosynthesis. *Biochem. J.*, **366**, 423-434 (2002)
- 11) Martens-Lobenhoffer, J., A. Becker, H. Freude and SM Bode-Boger : Identification and quantification of the atypical metabolite ornithine-lactam in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, **877**, 2284-2289 (2009)