



Title	Studies on natural products containing nitrogen-nitrogen bond [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Choirunnisa, Atina Rizkiya
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第15779号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92006
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Atina_Rizkiya_Chairunnisa_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（薬科学） 氏 名 ホイルニサ アティナ リスキヤ

審査担当者	主 査	教 授	脇 本 敏 幸
	副 査	教 授	市 川 聡
	副 査	准教授	薬師寺 文 華
	副 査	講 師	松 田 研 一

学 位 論 文 題 名

Studies on natural products containing nitrogen-nitrogen bond
(窒素－窒素結合を含む天然物に関する研究)

博士学位論文審査等の結果について（報告）

窒素－窒素共有結合（N-N 結合）は多くの低分子医薬品に含まれる構造であり、薬理作用の発現に重要な役割を果たす。N-N 結合を含有する天然物はこれまで 300 種類以上発見されており、その多くが抗菌、抗腫瘍活性をはじめとする多様な生物活性を示す。1951 年にソテツ科植物から N-N 結合を有する初めての天然物 macrozamin が単離されて以来 60 年もの間、生体内における N-N 結合形成の分子メカニズムは不明であったが、2017 年のピペラジン合成酵素の発見を契機に、N-N 結合の形成を担う様々な酵素ファミリーが近年次々に発見されている。生合成メカニズムに関する知見の蓄積により、従来の化合物探索研究の過程で偶発的に発見されてきた N-N 結合含有天然物を、ゲノム情報に基づき選択的に探索することが可能になった。こうした背景のもと、著者は 2 種類の N-N 結合形成酵素に着目し、それらをコードする遺伝子を指標とした化合物探索研究を展開した。

アゾキシ基は高度に酸化された N-N 結合含有官能基であり、これを含む天然物は細菌、真菌、動物や植物等、幅広い生物種から 50 種類程度が発見されている。ごく最近、アゾキシ天然物の生合成メカニズムのひとつが明らかにされた。本経路ではアミノ酸に由来する 2 分子のアミンがヒドラジン合成酵素 VlmO の働きによりヒドラジンへと変換され、VlmB が触媒する連続的な酸化反応によりアゾキシ基へと変換される。著者は VlmO, VlmB に加え、それらのアミン基質の供給を担う VlmA, VlmH をコードする 4 つの遺伝子を

指標に、アゾキシ天然物の生合成遺伝子クラスターを探索した。公共のゲノムデータベースを探索した結果、800 個以上の推定アゾキシ天然物生合成遺伝子クラスターを放線菌ゲノム中に見出し、ネットワーク解析によりそれらにコードされるタンパク質ファミリーの多様性を明らかにした。推定生合成遺伝子クラスターを保有する放線菌株の代謝物を酸加水分解し、生じるヒドラジン N_2H_4 を *p*-dimethylaminobenzaldehyde で補足することで、実験室培養条件下でアゾキシ天然物を生産する菌株を選抜した。その結果、*Streptomyces* sp. A1C6 株の代謝物の酸加水分解によりヒドラジンの生成が確認されたため、ヒドラジン生成を指標に代謝物を分画した結果、本株は既知のアゾキシ天然物 azodyrecin 類を産生することが判明した。A1C6 株の azodyrecin 生合成遺伝子クラスターは、先行研究で明らかにされている *Streptomyces* sp. RM72 株の生合成遺伝子クラスターとは大きく異なり、オペロンの転座や遺伝子の挿入が見られたため、本研究により新しいタイプの azodyrecin 生合成遺伝子クラスターが明らかになった。著者は複数の azodyrecin 類縁体を単離し、それらの細胞毒性を検証した。その結果、azodyrecin 類の細胞毒性には、アゾキシ基に隣接する不飽和結合が必須であることが判明した。また不飽和結合の幾何異性は細胞毒性に影響しないことが判明した。

次に著者は異なる N-N 結合形成酵素ファミリーに着目し、関連する生合成経路の多様性を検証した。ATP 依存性ヒドラジン合成酵素は VImO とは全く異なる酵素ファミリーであるが、類似の反応機構により ATP 依存的にヒドロキシルアミンとアミノ酸からヒドラジンを生成する。生じたヒドラジンは様々な代謝変換を受け、酸化数や置換基の異なる N-N 結合含有官能基へと変換される。最近の研究により、生成するヒドラジンの多様性の一端が明らかにされつつあるが、その全容は明らかではない。著者らはアミノ酸基質を供給するヒドラジン合成酵素と、ヒドロキシルアミン基質を供給するフラビン依存性 N モノオキシゲナーゼ (NMO) の系統解析により、ヒドラジン合成経路の多様性を検証した。NMO の系統解析の結果、ヒドラジン合成に関わる機能未知の NMO サブグループを複数見出し、組換え酵素の機能解析によりこれらがオルニチン N^5 -水酸化酵素であることを明らかにした。またヒドラジン合成酵素の系統解析の結果、NMO とヒドラジン合成酵素の組み合わせは多様であり、原料となるヒドロキシルアミン・アミノ酸の組み合わせに大きな多様性があることが明らかになった。生物変換実験により複数のヒドラジン合成酵素を機能解析した結果、4 種類の新たなヒドラジンを発見した。本研究により微生物のもつヒドラジン合成経路の多様性が明らかになった。

以上のように、著者はこれまでに探索事例の少ない N-N 結合形成酵素遺伝子に着目して、ゲノム情報を指標とした化合物探索および酵素の機能解析を実施し、その多様性を明らかにした。これにより新規 azodyrecin 類生産菌の同定や細胞毒性における不飽和結合の重要性、新たなヒドラジン化合物の同定など、複数の成果を挙げ、今後のさらなる化合物探索研究・生合成研究の礎を築いた。よって著者は、北海道大学博士（薬科学）の学位を授与される資格あるものと認める。