



放線菌線状プラスミドにコードされた抗生物質生成クラスターの
遺伝学的・生物有機化学的解析

広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学専攻 准教授 荒川 賢 治

はじめに

放線菌は微生物由来二次代謝産物の7割近くを生産する土壌微生物である。近年では抗生物質生成遺伝子の改変による非天然型抗生物質の創製も盛んに行われており、創薬の研究シーズとして期待される。放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4株は構造の異なる二つのポリケチド抗生物質ランカサイジン (LC) およびランカマイシン (LM) を生産し、それら生成遺伝子群は全長210 kbの巨大線状プラスミド pSLA2-L上にコードされていた (図1)。とくに LC は炭素-炭素結合による17員環構造を有しており、また骨格形成を司るポリケチド合成酵素 (PKS) は、その塩基配列から通常モジュール型PKSと異なる反応様式が示唆された。筆者らは pSLA2-L上にコードされた特異な抗生物質生成系および生産制御機構の総合的解明を目指し、LCの特異な分子構築機構の精密解析を中心として以下に示す成果を上げた。

1. LCの大員環形成機構解析

ポリケチド化合物の生合成研究に関しては世界中で数多くのグループにより研究が進められている。ポリケチド化合物にはしばしば大環状構造を有するものが見られるが、これらはいずれも分子内脱水縮合による大環状ラクトン・ラクタムであり、LCで見られるような炭素-炭素結合によるものはまだ例がなかった。筆者らはLCのC2-C18間の炭素-炭素結合が、アミ

ンの酸化によるN-アシルイミンの形成を鍵反応としていると考え、LCクラスター中に存在するアミノキシダーゼ遺伝子 *lkcE* の遺伝子破壊株を構築したところ、本株はC2-C18間の炭素-炭素結合が失われた線状中間体LC-KA05を蓄積した (図2)。これをLkcEとの *in vitro* 反応に賦したところ、アミンの酸化が確認でき、17員環閉環体が取得できた。以上の結果より、まず線状中間体のC-18位アミンが酸化されてN-アシルイミニウム中間体が生じ、これがC-2位エノラートから分子内求核付加反応を受けて17員環が形成される、という反応機構が示唆された (図2)。これにより従来のマクロライド生合成には見られない特異な炭素-炭素大員環生合成機構を提唱できた。

2. LC生合成を司るモジュラー・反復混合型PKSの解析

LCの骨格形成には8分子の酢酸の縮合が必要であるが、縮合に関与するケト合成酵素ドメインはLC生合成クラスター (*lkcA-lkcO*) 中に五つしか存在しておらず、モジュール・反復混合型PKSであると示唆された。LC生合成におけるモジュール・反復混合型PKSは、LCのほかには borrelidin, aureothin 生合成クラスターなどでも見だされており、国外の生合成研究グループでも盛んに研究がなされているが、鍵中間体の取得による実験的証明には至っていない。この仮説を証明するために、まず *Streptomyces lividans* での異種発現を行い、LCの骨格形成には *lkcA-lkcO* が必要十分であることを明らかにした。また、三つのマルチドメインPKS (LkcC, LkcF, LkcG) の翻訳融合実験および各PKSの変異解析を行ったところ、LkcF, LkcGはモジュラー型で機能し、LkcCが反復機能型PKSであ

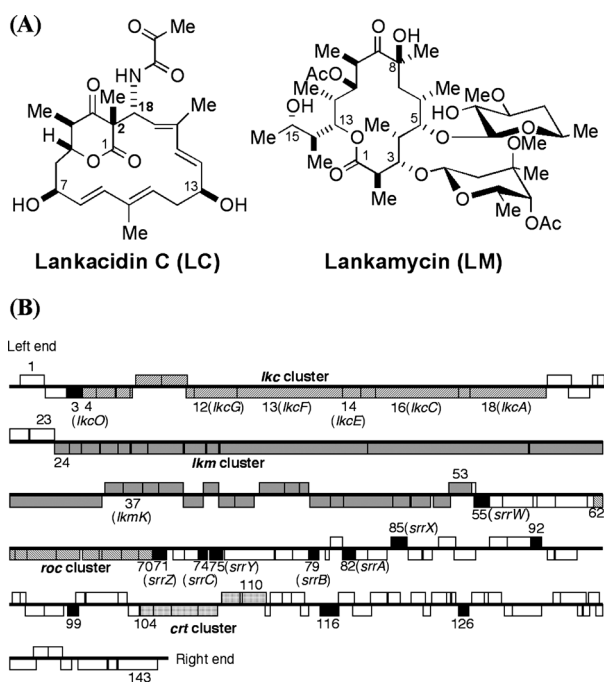


図1 (A) ランカサイジン (LC)・ランカマイシン (LM) の化学構造。(B) 線状プラスミド pSLA2-L の遺伝子地図。 *lkc*, LC生合成遺伝子クラスター; *lkm*, LM生合成クラスター; *roc*, タイプ2型ポリケチド生合成クラスター; *crt*, カロテノイド生合成遺伝子クラスター。

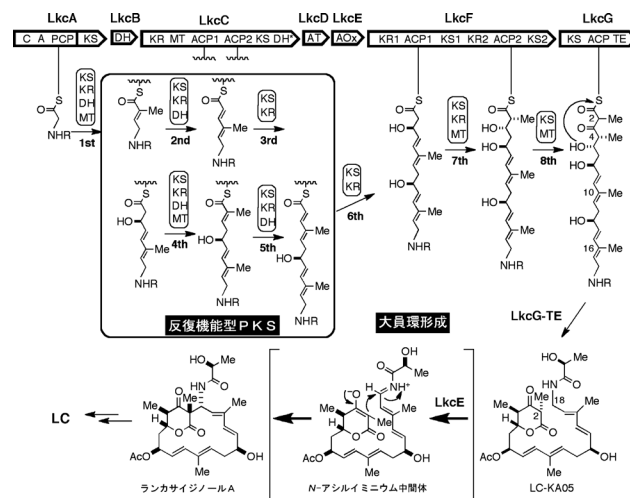


図2 ランカサイジンの推定生合成経路 (模式図)

C, condensation domain; A, adenylation domain; PCP, peptidyl carrier protein; KS, ketosynthase; DH, dehydratase; KR, ketoreductase; MT, C-methyltransferase; ACP, acyl carrier protein; AT, acyltransferase; AOx, amine oxidase; TE, thioesterase. R = CH₂CH(OH)C(=O)-.

ることが強く示唆された。現段階ではモジュール・反復混合型 PKS の直接証明につながる鍵ポリケチド中間体の単離には成功していないが、世界に先駆けてモジュール・反復混合型 PKS の分子認識機構を明らかにしたいと考えている。

3. LM 生合成経路の全容解明

14員環マクロライド化合物 LM は臨床医学上重要な抗生物質エリスロマイシンと化学構造が類似しており、創薬の研究ツールとして期待される。重水素標識アミノ酸の合成および取り込み実験を行い、LM ポリケチドのスターユニットはイソロイシン起源であることを明らかにした。また、LM 生合成クラスターに存在するタイプ 2 型チオエステラーゼ遺伝子 *lkmE* に注目し、遺伝子破壊株の代謝産物解析を行ったところ、13 位分岐炭素鎖が一つ短い 15-nor-LM 誘導体が取得できた。このことより *LkmE* は、loading module に誤って導入されたバリン由来スターユニットを加水分解して除去することが示唆された。また、P450 水酸化酵素遺伝子 *lkmF*, *lkmK* および糖転移酵素遺伝子 *lkmI*, *lkmL* 破壊株の代謝産物構造解析を行い、8,15-dideoxylankanolide → *LkmK* (15 位水酸化) → *LkmL* (3 位 *O*-グリコシル化) → *LkmF* (8 位水酸化) → *LkmI* (5 位 *O*-グリコシル化) → LM という post-PKS 生合成経路を明らかにした。

4. 抗生物質制御カスケードの解析とシグナル分子の構造決定

Streptomyces 属放線菌の二次代謝は、*Streptomyces griseus* の A-factor に代表されるシグナル分子を介した制御カスケードに調節されており、pSLA2-L 上にもこれらのホモログ (シグナル分子 SRB 合成遺伝子 *srrX*; *tetR* 型リプレッサー遺伝子 *srrA*, *srrB*, *srrC*; SARP 型アクティベーター遺伝子 *srrY*, *srrZ*, *srrW*) がコードされていた (図 1)。候補者は遺伝子破壊などにより制御遺伝子群の網羅的解析を行い、図 3 に示す抗生物質制御カスケードの存在を明らかにした。また複数のリプレッサー遺伝子解析から、*srrB* 変異による抗生物質大量生産株の取得にも成功した。これは潜在的二次代謝産物のゲノムマイニングにつながる成果であり、工業微生物としての放線菌の有用性を改めて示すことができた。

放線菌のシグナル分子は nM オーダーで抗生物質生産を誘導するが、その生産量はごく微量であり、単離・構造決定は困難

を極める。*S. griseus* の A-factor, *Streptomyces virginiae* の *virginia butanolide* などのシグナル分子は、いずれも γ -ブチロラク톤を共通骨格としていた。しかし近年 *Streptomyces coelicolor* からフラン骨格を有するシグナル分子 *methylomycin furan*, *Streptomyces avermitilis* からブテノライド型分子 *avenolide* が発見され、*S. rochei* が生産するシグナル分子 SRB の構造に興味もたれた。そこで筆者らは本菌を大量培養 (160 リットル) し、ゲルろ過・シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより SRB 画分を精製した (250 μ g)。なお SRB 活性画分は、*srrX* 破壊株の LC, LM 生産性回復により検出した。精製した活性成分の高分解能質量分析を行ったところ、二つの化合物 (SRB1, SRB2) の存在が確認でき、分子式はそれぞれ $C_{16}H_{26}O_5$, $C_{15}H_{24}O_5$ であった。それらの構造を各種二次元 NMR で解析したところ、図 3 記載の構造であることが決定でき、いずれも 2,3-二置換 4-ヒドロキシブテノライド骨格を有する新規シグナル分子であった。また、分岐鎖の C-1' 位水酸基の立体化学は最終的に化学合成により (*R*) と決定し、SRB の誘導活性は 40 nM であることがわかった。本化合物は従来のシグナル分子と構造が異なっており、放線菌シグナル分子の構造多様性を示すことができた。

おわりに

筆者らは、微量代謝産物の単離・構造決定・化学合成などの有機化学的手法と遺伝子変異解析を組み合わせたアプローチにより、放線菌 *S. rochei* 線状プラスミドにコードされた抗生物質生合成系・制御系の一部を明らかにすることができた。LC, LM はともにタンパク質合成阻害剤として作用するが、イスラエル・ワイズマン研究所 Ada Yonath 教授との共同研究により、前者はペプチド合成の活性中心、後者は隣接した合成ペプチドの排出部に結合して抗菌シナジー効果を示すことが明らかとなった。本菌が構造の異なる二つの抗生物質を生産し、それらの生合成が同一プラスミド上にコードされ、かつ同一の制御カスケードでコントロールされることは、放線菌の生存戦略や生物進化の観点からもたいへん興味深い。今後も未解明の生合成機構や制御カスケードの解析、さらには制御因子の多面発現制御によるゲノムマイニングなどにも積極的に取り組み、化学の視点から放線菌生命現象を追究していきたいと考えている。

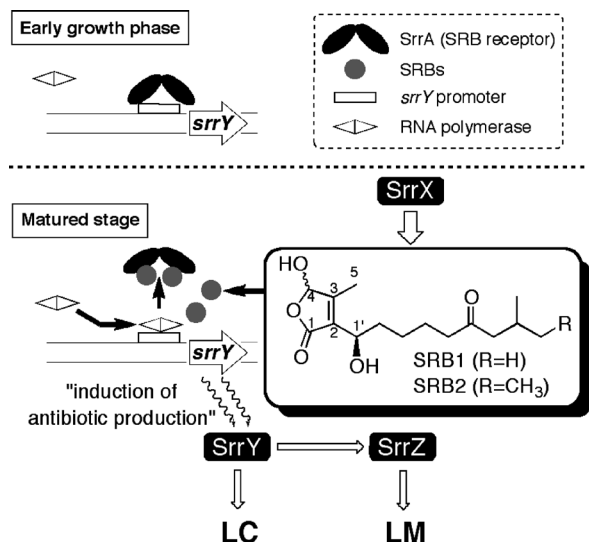


図 3 *S. rochei* 抗生物質生産制御カスケードおよびシグナル分子 SRB の化学構造。

謝辞 本研究は広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学専攻・細胞機能化学研究室において行われたものです。本研究開始当初から終始多大なご指導ご鞭撻を賜り、本奨励賞にご推薦いただきました木梨陽康先生 (広島大学名誉教授) に深甚なる感謝の意を表します。また、研究遂行に多大なご協力をいただいた広島国際学院大学教授・新川英典先生に感謝いたします。本研究を行うにあたり、常に懇切丁寧なご助言をいただいた広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学専攻および日本農芸化学会中四国支部の諸先生方に厚く御礼申し上げます。放線菌生合成研究を開始する機会を作っていただいた米国ワシントン大学名誉教授・Heinz G. Floss 先生に感謝いたします。また、研究の手ほどきをしていただいた学生時代の恩師である東京工業大学教授・(故)柿沼勝己先生、同教授・江口 正先生に深く御礼申し上げます。本研究は多くの共同研究者ならびに研究室メンバーの皆様のご協力によって成り立っており、最後にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。