



## 放線菌由来窒素含有天然生物活性物質の生合成に関する研究

東京大学大学院農学生命科学研究科 特任助教 浅水 俊平

はじめに

放線菌をはじめとする二次代謝産物生産菌は医薬・農薬の開発につながる生物活性物質の宝庫であり、現在も特に熱帯性の病原菌・病原虫や多剤耐性菌に対抗するための抗生物質の探索源として注目される有用な生物資源である。本研究ではこれら細菌が有する巧みな天然物合成機構を様々な有用物質生産のツールとして利用するために、以下に挙げる生合成反応機構を明らかにした。本生合成研究の成果が、アナログ生産はもとより次世代の物質生産ツール開発を目指した、新たな「ものづくり」への取り組みに貢献できることを期待している。またここに挙げるビスインドール生合成研究は富山県立大学大学院工学研究科・微生物工学講座において行った研究の成果であり、C7Nシクリトール生合成研究はオレゴン州立大学薬学部・Taifo Mahmud研究室において行った研究の成果である。

## 1. ビスインドール化合物の生合成

放線菌 *Streptomyces* sp. TP-A0274由来staurosporineや *Lechevalieria aerocolonigenes*由来rebeccamycin, グラム陰性細菌 *Chromobacterium violaceum*由来violaceinなどはインドール環が二つあることからビスインドール化合物と称される。Staurosporineは1977年に北里大学の太村智博士らが発見し、protein kinase Cの強力な阻害剤としてのちの生化学研究に多大な貢献を果たし、また抗がん剤のリードとしても注目されていた。これらの化合物にはトリプトファン(Trp)二分子に由来する密集した六環性構造やインドール環の1,2転位など特徴的な骨格形成機構が示唆され、研究開始時にはそれら生合成遺伝子群や、クロモピロリン酸(CPA)がインドロカルバゾール(ICZ)骨格の鍵中間体であることが報告されていた。

Staurosporine 生合成におけるStaDは既知ドメインなどが存在しない機能未知蛋白質であったが、*staD*遺伝子破壊株がCPA

を蓄積したことからその合成酵素であることを予想し、組換え酵素の解析を行った。その結果、StaDは分子量500 kDa(四量体)を超える新規ヘム含有酵素であり、Trpの酸化によって生じるインドールピルビン酸(IPA)イミン二分子からCPAを合成する酵素であることを明らかにした。また基質アナログであるIPAを用いた反応解析から非環化カップリング産物を同定し、StaDは恐らく二回の水素引き抜きによる酸化的なC-C結合形成反応を触媒し、その後のピロール環形成は非酵素的に起こりCPAが合成されることを明らかにした(図1)。

Violacein生合成ではインドール環の1,2転位反応が同位体取り込み実験から知られていた。この反応には*vioE*遺伝子の関与がオヴイエド大学(スペイン)のSalasらによる遺伝学的解析から示唆されていたが、VioEには既知蛋白質と相同性が全くなく、その反応機構はわからなかった。そこでVioEを組換え蛋白質として調製し、各種反応条件を検討した結果、StaD(またはVioB)とのタンデム反応によりインドール環の1,2転位産物が生成することを見出した。この結果から、VioEは真のStaD生成物である反応性の高いIPAイミンダイマーを基質とすることが示唆された(図1)。さらに理化学研究所・城生体金属科学研究室の城宜嗣博士、永野真吾博士らとの共同研究によりVioEの基質アナログであるフェニルピルビン酸との共X線結晶構造を明らかにし、その構造を基にしたアミノ酸残基変異解析を行った。その結果、VioEには補因子や明確な触媒残基が存在しないことが明らかになり、そのことからVioEは反応性の高いStaD生成物をその活性中心に捕え、基質の立体配座をコントロールすることによりインドール環転位反応を促進する機能を持つ蛋白質であるという興味深い性質を明らかにした。

StaDにより合成されたCPAは、P450酵素StaPが触媒するaryl-arylカップリング反応により六環性ICZ骨格に変換され、不安定なdicarboxy pyrrole中間体を生成することが永野真吾博士らとの共同研究によるX線結晶構造から強く示唆された(図1)。次の脱炭酸を伴う酸素添加反応には二種類のFAD依存型モノオキシゲナーゼホモログ(StaC及びRebC)によるそれぞれstaurosporineとrebeccamycin骨格への作り分けが示唆された。RebCの結晶構造がMIT(米国)のDrennanらにより報告されたことから、ピロール環の酸化状態を作り分ける機構を明らかにするために、活性中心のアミノ酸残基を一次配列のアラインメント情報を基に交換し、二つまたは三つのアミノ酸残基を入れ替えることでそれぞれの活性を逆転させることに成功した。

## 2. C7Nシクリトールの生合成

*Streptomyces hygroscopicus*が生産するC7Nシクリトール化合物validamycin Aは、trehalase拮抗阻害剤としてイネ紋枯病菌 *Rhizoctonia solani*の生育を阻害し、東アジアを中心に作物保護剤として利用されている。C7Nシクリトールはペントース-リン酸回路の中間体sedoheptulose 7-phosphate (SH7P)を前駆体とし、

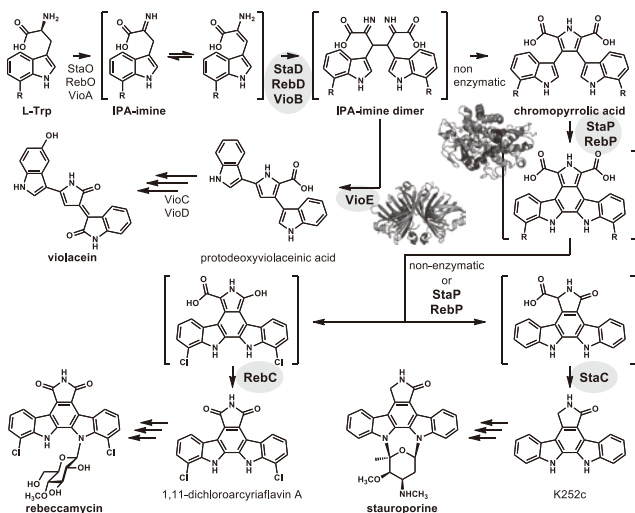


図1 ビスインドール化合物の生合成経路

validamycin Aや*Actinoplanes* sp. SE50/110由来のII型糖尿病治療薬acarboseの生合成遺伝子群などが既に報告されていたが、最も重要なシクリトールのC-N架橋構造がどのように形成されるか、わかっていなかった。

validamycin Aの生合成中間体validoxylamine Aがtrehaloseの構造ミミックであったことから、trehalose 6-phosphate (T6P)生合成をミミックした経路を予想し、validamycin A生合成遺伝子群に存在したT6P生合成に関連性のある酵素遺伝子*vldB*, *vldE*, *vldH*に注目した。VldB, VldE, VldHと有機合成により調製した推定基質を用いて生合成経路の*in vitro*再構成を試みた結果、GTP, valienol 1-phosphate, 及びvalidamine 7-phosphateを基質としたときにvalidoxylamine Aを生産することに成功した(図2)。このことからVldEは「糖」ではなくcyclohexene母核を、結合の立体保持したまま転移反応を触媒する極めてユニークな新規酵素であることを示した。このようなpsuedosugarの転移反応を触媒する酵素群をPseudoglycosyltransferase (PsGT)と命名し、将来的な新規酵素触媒として糖を模倣した化合物の生産に応用することを期待している。

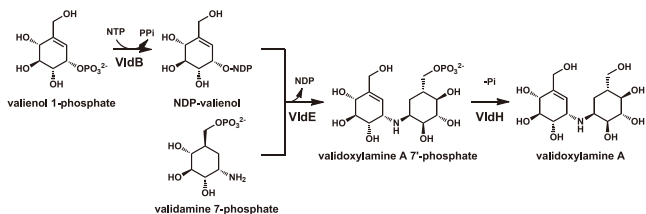


図2 PsGT (VldE)によるtrehalose生合成をミミックしたvalidoxylamine Aの合成

次にVldEをプローブとしたゲノムマイニングを行ったところ、多様な細菌類にVldEホモログが存在することを見出した。その中で放線菌*Actinosynnema mirum*などに見出されたVldEホモログの近隣領域には、予想に反してシクリトール生合成初発のSH7P環化酵素である2-*epi*-5-*epi*-valiolone synthase (EEVS)がなく、よりシキミ酸経路の一次代謝酵素3-dehydroquinate synthase (DHQS)に分子系統学的に似ている遺伝子産物 (Amir\_2000)が存在した。そこでこの蛋白質の触媒機能を明らかにするために、大腸菌組換え蛋白質として発現し*in vitro*での反応解析を行った。その結果、Amir\_2000はEEVSの基質SH7Pからその生成物EEVのジアステレオマー2-*epi*-valiolone (EV)を合成する新規酵素EVSであることを発見した(図3)。また遺伝子破壊株と野生株の代謝産物の比較メタボロミクス解析から、Amir\_2000が存在する遺伝子群が新規経路でvalidoxylamine Aを生合成することを明らかにした。

更にEEVSをプローブとしたゲノムマイニングを行った過程で、極めて興味深いことに脊椎動物(魚類, 両生類, 爬虫類, 鳥類)のゲノム中にホモログ遺伝子を発見した。またその近傍領域にメチル化酵素(MT)と脱水素酵素(Ox)の二つのドメインを持つ蛋白質を発見した。Zebrafish (*Danio rerio*)由来のEEVSホモログと

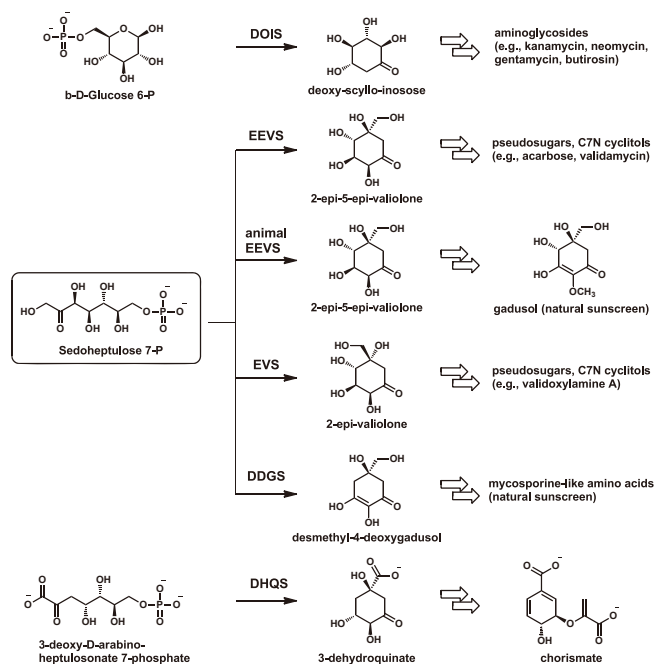


図3 リン酸化糖環化酵素群. Sedoheptulose 7-phosphateを前駆体として様々な天然物が生合成される

推定MT-Ox融合蛋白質を、合成遺伝子を用いた大腸菌組換え発現により取得し、これらの遺伝子産物がSH7Pからgadusol(天然のUV保護剤)を合成することを明らかにした(図3)。

終わりに

天然物生合成の基礎研究は、私が携わっていたほんの十数年で大きく進展しており、蓄積した知見を動員して実際の「ものづくり」への応用にギアを入れ替える段階にあると考えている。現在世界的に直面している様々な感染症などの問題に対抗するために天然抗生物質の果たす役割は疑いないと考えており、これからもこの分野の発展に少しでも貢献できたらと思う。

謝辞 現在筆者は東京大学大学院農学生命科学研究科・微生物潜在機能探索寄付講座に所属しております。学生時代から現在まで多くのご指導を頂いている東京大学・尾仲宏康先生に深く感謝申し上げます。ポスト研究においてご指導を頂きましたオレゴン州立大学・Taifo Mahmud先生に深く感謝申し上げます。また学生時代より激励を頂いている富山県立大学・古米保先生、葭田隆治先生、五十嵐康弘先生に感謝申し上げます。本研究における共同研究でお世話になりました理化学研究所の城宜嗣先生、永野真吾先生らに感謝申し上げます。ここに謝意を申し上げたい全ての方のお名前を挙げることは出来ず残念ですが、富山県立大学の先生方そして微生物工学講座の方々、オレゴン州立大学の先生方そしてMahmud研の方々、東京大学微生物潜在機能探索寄付講座、醗酵学研究室の方々、から多くのことを学び、それ無くして研究を続けることは出来ませんでした。ここに深く感謝申し上げます。