



芳香族ポリケタイドの生合成研究と物質生産への応用

静岡県立大学食品栄養科学部食品生命科学科 准教授 鮎 信 学

はじめに

ポリケタイドは、酢酸やプロピオン酸を基本単位とする二次代謝産物の総称である。III型ポリケタイド合成酵素(III型PKS)は、伸長反応と閉環反応によってポリケタイドに構造多様性を賦与する。伸長反応とは、基質の縮合のことであり、III型PKSはこの種類および縮合回数を規定する。また、III型PKSは閉環反応において、ポリケタイド鎖の折りたたみの様式を制御する。

ゲノム情報のホモロジー検索に基づいた天然有機化合物の生合成研究を、ゲノムマイニングと呼ぶ。微生物や植物のゲノムを宝の山とみたとて、それを採鉱するという意味である。現在、データベースには、ゲノム解読などによって見出された無数のIII型PKS様配列が蓄積されている。本講演では、III型PKSのゲノムマイニングの成果と、III型PKSの触媒機能を利用した芳香族ポリケタイドの微生物生産について発表する。

1. III型PKS, RppAの発見および修飾酵素群の研究

放線菌*Streptomyces griseus*のRppAは、植物に特有な酵素、カルコン合成酵素(CHS)の相同蛋白質である。私は、RppAが1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene(THN)を合成する新規なポリケタイド合成酵素(PKS)であることを明らかにした(図1)。RppAはMalonyl-CoAのみを伸長反応に用い、脱炭酸を伴うClaisen縮合により閉環を行う。RppAの発見により、CHS相同蛋白質が微生物一般に分布するPKSであることが明らかになった。PKSはI型、II型、CHS型に分類されていたが、この発見が契機となり、現在、CHS型はIII型PKSと呼ばれている。

*S. griseus*のP-450melは、THNを酸化的にカップリングし、hexaperylenequinone(HPQ)を合成することを見出した。さらに、P-450melの遺伝子破壊株のUV感受性が上昇したことから、HPQは放線菌の新規なメラニンであることが明らかになった(図1)。この発見により、THNを介したメラニンの生合成が細菌にも分布していることが明らかになった。また、植物のIII型PKSがUV防御に関与する例は知られていたが、放線菌のIII型PKSも類似な機能を持つことが明らかになった。

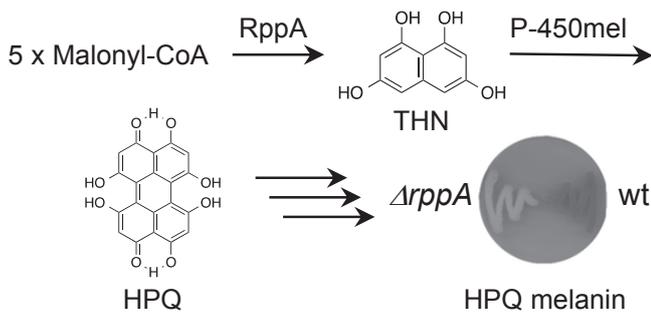


図1 RppAによるTHNの合成とHPQメラニン
rppA破壊株はアルビノ形態を示す。

2. 微生物におけるIII型PKSの生理機能の解明

窒素固定細菌*Azotobacter vinelandii*のI型ポリケタイド合成酵素ArsAD、二種のIII型PKS、ArsBおよびArsCの触媒機能を解明した(図2)。Ars酵素群は両親媒性のalkylresorsinolの合成を担う。alkylresorsinolは耐久細胞の一種である胞のうの膜成分であり、*arsB*の破壊株は正常な胞のうを形成できない(図2)。

また、放線菌*S. griseus*のIII型PKS・SrsA、メチル化酵素SrsB、酸化酵素SrsCの触媒機能を解明した。そして、Srs酵素群は放線菌の新たな膜成分phenolic lipidを生産すること、*srsA*遺伝子破壊株は細胞壁合成阻害剤に対する感受性が上がることを明らかにした。以上のように、微生物において、III型PKSが両親媒性のポリケタイドの合成を担い、その産物が細胞膜形成という生理的役割を有していることを明らかにした。

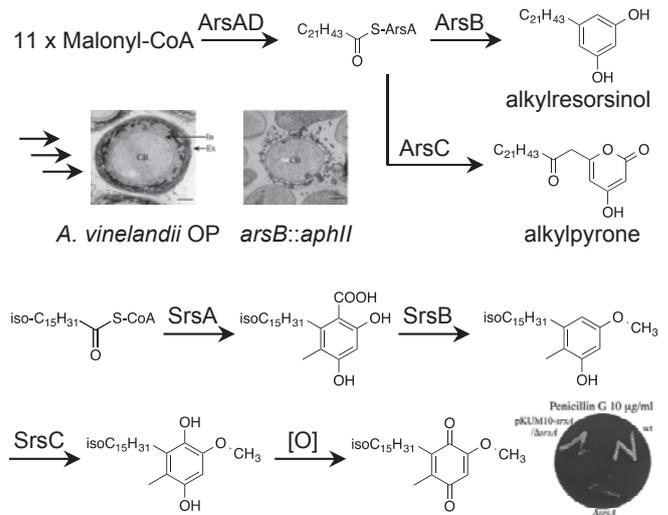


図2 III型PKSによるphenolic lipidの生合成

*A. vinelandii*におけるalkylresorsinolの生合成には、I型PKS、ArsADとIII型PKS、ArsBCが関与する。ArsADにより C_{22} の脂肪酸前駆体が生合成される。ArsBCはArsAのドメインに共有結合している前駆体を直接基質とし、Malonyl-CoAを3分子縮合することでalkylresorsinolを合成する。SrsAは二種の伸長鎖基質の縮合順序が制御されている特異なIII型PKSである。*S. griseus*におけるalkylquinoneの生合成には、SrsABCが関与する。メチル化酵素SrsBは基質の脱炭酸を伴うメチル化を触媒する。酸化酵素SrsCにより生じたhydroquinoneは自然酸化を受けalkylquinoneに変換される。alkylquinoneは*S. griseus*の膜画分に存在し、*srsA*破壊株は細胞壁合成阻害剤Penicillinに対し親株より感受性になる。

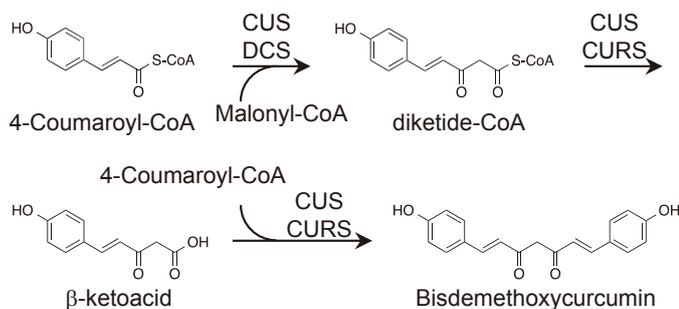


図3 クルクミノイドの合成を触媒するⅢ型PKS

CUSは図中全反応を、DCSとCURSは、diketide-CoA合成までをDCSが、それ以降をCURSが触媒する。CUSは開始基質を2分子用いる特異なⅢ型PKSである。また、CUSおよびCURSはβケト酸を伸鎖鎖基質にする特異なⅢ型PKSである。

3. クルクミンの合成を触媒するⅢ型PKSの発見

クルクミノイドはウコン *Curcuma longa* などに特異なポリケタイドである。私たちは、イネ *Oryza sativa* のゲノム情報からクルクミノイドの合成を触媒するⅢ型PKS, Curcuminoid synthase (CUS) を発見した(図3)。イネからクルクミノイドが単離された例はなく、イネはクルクミノイドを生産しないと考えられるが、そのゲノムにはクルクミノイドを合成する潜在能力が眠っていたことが明らかとなった。また、ウコン *C. longa* からCurcumin synthase (CURS) と Diketide synthase (DCS) を見出した(図3)。イネのCUSは単独でクルクミノイドを合成するのに対し、ウコンではDCSがdiketide-CoAを合成し、CURSがジアリルヘプタノイド骨格を形成することを明らかにした(図3)。

4. 植物ポリケタイドの微生物生産

フェニルプロパノイド経路の3酵素、CHSおよびカルコンイソメラーゼ(ナリンゲニカルコンをナリンゲニンに異性化する)を大腸菌で発現させ、芳香族アミノ酸からフラボノイドが生産した。Ⅲ型PKSにより合成される植物ポリケタイドの多くは、4-Coumaroyl-CoAなど、フェニルプロパノイド経路の生成物を前駆体とする(図4)。そのため、Ⅲ型PKSの種類を変えることで様々な植物ポリケタイドを生産することができる。フェニルプロパノイド経路の組換え大腸菌において、CHSの代わりにスチルベン合成酵素(STS)またはCUSを共発現するとResveratrolまたはBisdemethoxycurcuminを生産できる(図4)。

5. 「非天然型」植物ポリケタイドの微生物生産

微生物を用いて植物ポリケタイドを生産するメリットは、不自然な構造をした天然有機化合物、「非天然型」天然有機化合物が生産できることにある。植物ポリケタイドは、フェニルプロパノイド経路、Ⅲ型PKSおよび修飾酵素により合成される。私はこれらの経路の基質特異性が寛容であることを利用し、新規の植物ポリケタイドの生産に成功した(図4)。具体的には合成経路を再構築した組換え大腸菌に基質アナログを投与することで、非天然型の植物ポリケタイドを100種類以上生産することに成功した。前駆体アナログは本来の合成前駆体と競合する可能性があるため、フェニルプロパノイド経路を持たない大腸菌は非天然型ポリケタイドの生産に適した宿主である。

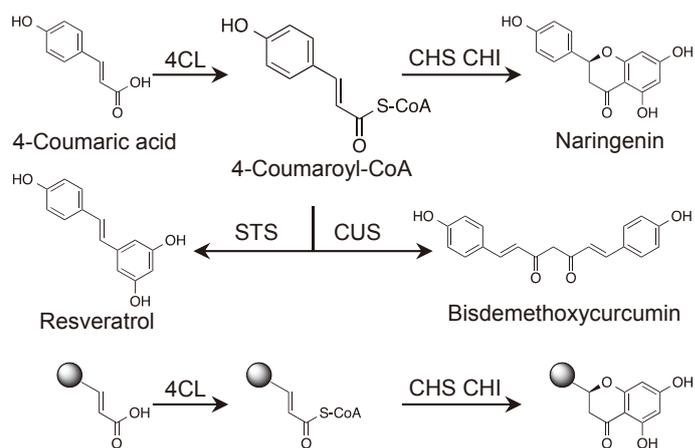


図4 植物ポリケタイドの微生物生産

4-Coumaric acidは、Phenylalanineからフェニルプロパノイド経路により合成される。4-Coumaric acidの代わりにアナログを前駆体に用いることで、アナログの構造が反映された最終産物が生産できる。

代わりに

私は、Ⅲ型PKSの探索研究と、その機能解析を行ってきた。また、新規な化学構造を有する植物ポリケタイドの化合物コレクションの生産系を構築した。

有用遺伝子を「試薬」、微生物を「フラスコ」と見立てると、遺伝子を微生物に形質転換することは、あたかも試薬をフラスコに入れるかのようである。将来、有機合成化学のように、組換え微生物を用いて、好きな天然有機化合物やそのアナログを自由自在に生産させることができるようになるかと信じている。今後、試薬のより一層の充実と、より良いフラスコ造りが農芸化学の一分野として重要であると考えている。

謝辞 本研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科、応用生命工学専攻、醗酵学研究室と静岡県立大学食品栄養科学部、ケミカルバイオロジー研究室で行われたものです。終始、万物をご指導頂き、私の中に大切なものを遺して頂いた醗酵学研究室故・堀之内末治教授に心から御礼申し上げます。また、学生時代より今日まで多大なご指導頂き、理化学研究所 吉田稔主任研究員、慶應義塾大学薬学部 須貝威教授、東京大学大学院農学生命科学研究科 大西康夫教授に深く御礼申し上げます。常日頃から激励と暖かいご助言をいただきました。東京大学大学院農学生命科学研究科 西山真教授、葛山智久准教授、尾仲宏康教授、筑波大学大学院生命環境科学研究科 小林達彦教授に心から御礼申し上げます。また、共同研究者として多大なご助力を頂きました。東京大学大学院薬学研究科 海老塚豊名誉教授、北里生命科学研究科 池田治生教授、ハウス食品株式会社ソマテックセンター 喜多智子様をはじめ、皆様に御礼申し上げます。東京大学醗酵学研究室および静岡県立大学ケミカルバイオロジー研究室において、多くの先輩、同僚、後輩、学生と共に研究を行って参りました。東京大学醗酵学研究室 勝山陽平講師をはじめ、皆様に心から感謝致します。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました理化学研究所 長田裕之主任研究員に厚く御礼申し上げます。