



生合成マシナリー再構築による生理活性物質の生産と多様性創出機構の解明

北海道大学大学院理学研究院 及 川 英 秋

はじめに

筆者は、抗生物質バンコマイシン、抗がん剤タキソール、免疫抑制剤タクロリムスなど天然に見出される複雑で多様な構造を持ち驚異的な生理活性を有する化合物に魅了され、生物は如何にしてその複雑な構造を作り出すかに興味を持って研究を続けてきた。最近では単一の酵素だけでなく、天然物生合成酵素をまとめて扱うことが可能になり、経路の解明や物質生産のみならず経路の改変が実現しようとしている。

1. 世界初の Diels-Alder 反応を触媒する酵素の発見

最初に手がけたのは、有機化学者がその存在を指摘しながら、誰も証明に成功していなかった分子内 Diels-Alder 反応を触媒する酵素である。馬鈴薯夏疫病菌由来の植物毒素ソラナピロンの生合成経路に問題の酵素が関与することを実証し、最終的にそのソラナピロン合成酵素の性質を明らかにした。さらに分子間 Diels-Alderase としてマクロフォミン酸の骨格構築に関与する酵素の精製と立体構造に基づいた反応機構の解明に世界で初めて成功した (図1)。これらの酵素の発見を契機に多くの Diels-Alderase が見出されている。

2. ポリエーテル系抗生物質骨格構築機構の解明

天然物生合成の中でも、多数のエーテル環を有するポリエーテルの骨格構築機構は、反応性の高い複数のエポキシ環が開環と閉環を繰り返して一挙に構築される仮説が注目を集めながら、長年謎のままだった。標的を単純な抗生物質ラサロシドに定め、リスクの高い予想基質の合成と大量発現酵素 Lsd19 で、化学反応とは全く異なる選択性で連続反応を触媒する環化酵素活性の検出に成功した。人工基質が活性部位に取り込まれた環化酵素の立体構造を取得して、一組の酸化酵素 Lsd18 および環化酵素 Lsd19 が多数の環構築を行う汎用的な触媒機構を提唱した (図2)。最近、より構造が複雑なモノエンシンに関して研究を進めたところ、配列の類似した一対の環化酵素 MonBI/MonBII のうち、MonBI が触媒活性を持たない補助タンパク (天然変

性タンパク) であり、もう一方の酵素 MonBII との複合体が絶妙な調節を行いながら、一連の環構築を行うという新たな機構が提唱された。

3. 非リボソーム依存型ペプチド等の酵素的全合成

2000年代に入り、DNA シーケンス技術の革新によりゲノム解析が進んで酵素遺伝子の入手が容易になり、微生物の場合天然物の生合成遺伝子はゲノム上でクラスター化 (つまりクラスターは天然物の設計図) していることがわかった。さらに天然物生合成の概要が解明されるなど環境が整ってきたことから、複雑な天然物を酵素触媒の利用で全合成することに挑戦した。

全ての生合成酵素遺伝子を大腸菌に導入して合成する手法を開発し、ペプチド系抗生物質エキノマイシンの生産に成功するとともに、その遺伝子改変により類縁体の合成にも成功した。抗腫瘍性物質サフラマイシンの骨格構築にペプチド合成酵素 (NRPS) が関与し、単一の酵素 SfmC が7段階の反応を触媒することを見出した (図3)。一般に巨大酵素 NRPS は3種以上の触媒ドメインからなる一組で一つのアミノ酸の伸長を触媒するが、SfmC は特徴的な環化反応を繰り返して触媒するため、一挙に5環性骨格を合成可能という新たな機能を見出した。

4. 麹菌異種発現系を用いた汎用的天然物生産法の開発

大腸菌では生合成酵素の最適発現に精妙な条件設定が必要であった。しかし代表的な醸造用微生物である麹菌に対し、類似の方法論を適用したところ、驚くべき簡便性及び汎用性で糸状菌天然物が生産可能であることを見出した (図4)。農芸化学の麹菌研究者のご支援を頂きながら、数多くの天然物の生合成経路の解明とその酵素的全合成とも呼ぶべき生産に成功した。この単純なアミラーゼ誘導プロモーターを用いる発現系は、基本的に酵素の発現調節の条件検討が不要で、酵素遺伝子を宿主に導入して天然物の高生産株を選抜するだけである。危険な二次代謝産物生産能を持たず、高い薬物耐性能を有する麹菌は天然

世界初の Diels-Alder 反応の触媒機構の解明

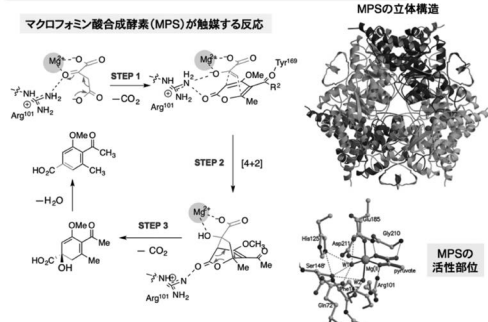


図1. 分子間 Diels-Alderase マクロフォミン合成酵素の骨格構築機構及びその立体構造

ポリエーテル環構築酵素の触媒機構の解明

酵素反応機構の解明は、多様性創出機構の解明に不可欠
ポリエーテル型天然物の詳細な環化機構の解明は、長年の有機化学上の課題



図2. ポリエーテル環の骨格構築酵素の立体構造とその触媒機構

17 遺伝子導入による生合成マシナリー構築による物質生産

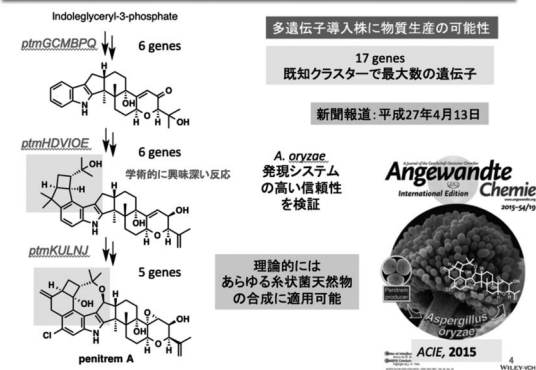


図5. インドールジテルペン系天然物ペニトレムの酵素的全合成

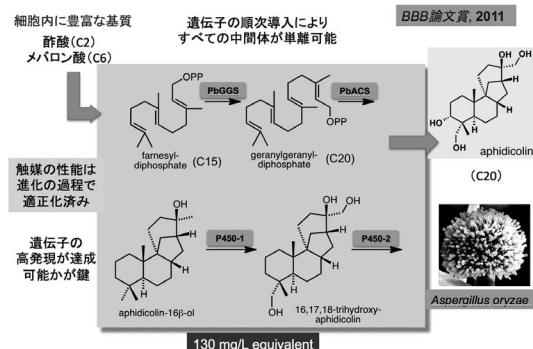


図4. 麹菌異種発現系を用いたテルペンの酵素的全合成

物の生産に好適であつた。

4-1. インドールジテルペン類の汎用合成法の開発

代表例としてインドールジテルペンと呼ばれる殺虫活性を有する天然物について説明する。普遍的な骨格を持つバキシリンに関して、まず6種の遺伝子導入で基本生合成経路(C20側鎖の導入; エポキシ化; 環化; 酸化修飾など)を確立し、類縁体の生産に使用可能なプラットホーム株を調製した。次いで多数遺伝子同時導入法を開発し、さらに修飾の進んだアフラトレムに関し、2回の形質転換で7種の遺伝子導入することにより物質生産を達成した。ペニトレムでは糸状菌では最大級の17種の遺伝子導入による複雑骨格を構築する方法論を確立し(図5)、全ての中間体の単離と興味深い鍵反応の*in vitro*解析にも成功した。本方法論により、100を超える全ての同族体に適用可能な汎用的合成法の開発を達成したことになる。

4-2. 多様な糸状菌生物活性天然物の異種生産

本方法論は設計図となる生合成遺伝子の同定さえ正確にできれば、基本的には化合物種に依存せず、生成物不明のクラスターの発現も可能なはずである。これを検証するため、ポリケタイドの生産、糸状菌初のリボソーム依存型ペプチドの生合成経路の解明、複雑な骨格を持つC25/C20テルペンの合成(図4)など多様な天然物の合成が可能であることを確認した。最近、長年解明されずにいた糸状菌における植物ホルモンのアブジジン酸の生合成経路では、従来とは全く異なるテルペン合成酵素

で骨格が構築され、しかも植物の場合と異なり、たった4種の酵素で合成可能であることを見出した。さらにキノコはカビの類縁種であるが、スプライシング機構が若干異なるためゲノム配列を使った物質生産は困難とされていた。最近これも若干の改良を加えることで麹菌に適用可能なことがわかった。

おわりに

天然物生物合成は、2010年代に入って新たな展開が可能になった。そこでこの分野の発展を加速するため、農芸化学を中心に理工薬の関連研究者の参加を得て、新学術領域研究“生合成マシナリー”(2010~2014)を立ち上げた。本プロジェクトでは設計図探索法の開発、異種発現系の構築やそれを使った物質生産で優れた成果が達成されたため、さらに5年の継続が認められ、メンバーを替えて現在もさらなる発展を続けている。筆者が行ってきたのは、有機化学分野と発酵分野の融合領域の研究であり、この分野は1990年代まで天然物を利用した医薬品開発の一翼を担ってきた。この長い年月を掛けて淘汰された顕著な生理活性を持つ天然物の設計図は、生物ゲノム上に多数存在しながら、その多くが未利用である。画期的な探索法と生産法さえあれば、北里大大村先生のようにノーベル賞の対象となる物質を世に送り出すことも可能である。これまで筆者が推進してきた設計図を使った物質生産は、本質的には遺伝子情報の上に依存するため、作業の自動化が実現すれば、数多くの物質の供給が可能となる。以上のように農芸化学が得意とする生理活性物質、酵素、微生物や植物を利用したものづくりを扱う研究分野の今後さらなる発展を祈念する次第である。

謝 辞 本研究は北海道大学大学院農学研究院生物機能化学分野生物有機化学研究室，同大学大学院理学研究院化学部門有機反応論研究室で行った研究であり，ともに困難な研究に挑戦して頂いた両研究室の教員，学生一同には，心より感謝致します。学生時代に天然物化学の面白さをご教示頂いた坂村真雄先生，有機化学の研究手法を叩き込んで頂いた故市原耿民先生には衷心より御礼申し上げます。また新しい方法論を取り入れるたびに懇切丁寧に伝授して頂いた共同研究者の皆様にも深く感謝致します。