

第 32 回 (平成 16 年度) 研究奨励金受領者研究報告

真核生物版 Ames 試験開発のための研究

佐賀大学総合分析実験センター 片山 諭

緒 言

環境因子や食品・嗜好品内在性物質の安全性の問題およびそれに科学的根拠を与えうるリスク評価法が近年、生活安全上の重要なテーマとなっている。DNA に対し変異原性を有す因子等のアッセイを簡便かつ安全に実施可能で、その上高感度な真核生物系の一次簡易テスト法の開発は重要事項の一つである。そこで申請者が研究の対象としている分裂酵母のユビキチンリガーゼ SCFpof3 の遺伝子変異株の特徴を活用し、簡便で高感度な変異原試験法の開発を研究目標としている。

分裂酵母の SCFpof3 の特徴を列記すると①SCFpof3 は生育には必須でない。②SCFpof3 変異株の成長は遅く、ゲノム DNA が高頻度で脱落する。③細胞周期制御系の DNA チェックポイントが恒常的に活性化され、それが無い状態だと細胞は直ちに死に至る。この原因は本来はきちんと分解されている幾つかの DNA 代謝酵素が SCFpof3 のノックアウトにより分解されなくなり、過剰に蓄積した結果、ゲノム DNA の代謝バランスが損なわれた結果として生じたものであると考えられる。本申請課題では先に報告していた SCFpof3 変異株の DNA 損傷剤等への感受性試験のレンジを広げ、野生株のそれと比較、検討し、変異原試験のための有用株としての可能性を探ることを目的とした。

方 法

本研究で用いた各種の薬剤の条件をまとめると、HU (ヒドロキシウレア: DNA 合成阻害剤) 2.5 mM と 5 mM. Phleomycin (DNA 二重鎖切断 = DSB 剤) 15 μ g/ml. TsA (トリコスタチン A: ヒストン脱アセチル化阻害剤) 50 mg/ml と 25~200 J/m² の UV 照射 (チミン二量体誘導)。各試験は定法に従い 30 度にて行った。

結果とまとめ

SCFpof3 変異株の各薬剤に対する感受性は以下にまとめた。図 1 は HU と TsA に対する感受性を、図 2 は UV と DSB 剤への感受性とをそれぞれまとめた。

ここで、SCFpof3 変異株は DNA 複製停止、DNA 二重鎖切断、UV 照射等、広いレンジの薬剤処理に対して、野生型より常に高い感受性を示した。SCFpof3 は DNA 損傷

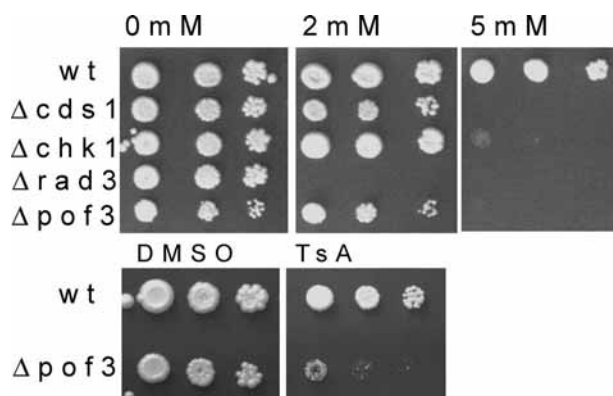
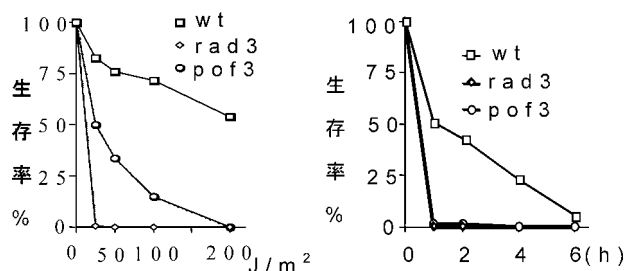


図 1 HU と TsA の感受性



A) UV 感受性テスト B) DSB 剤感受性

図 2 UV と DSB 剤への感受性

の修復に機能する Rad 遺伝子ではない。にもかかわらず、広いレンジに対し感受性を示したことより、未知の薬剤のスクリーニングにも活用できる可能性が高いことを意味する。とりわけ、HU 試験のときに用いた、プレート上でのスポットアッセイでも有意な差が検出できたことより、多種類の薬剤を同時にアッセイしたいケースが多く想定される一時スクリーニングの系には好適である。

また、SCFpof3 が DNA 二重鎖切断に対しては非常に高い感受性を示すこともわかった。このことから、未知の薬剤を試験するときに、感受性の強弱より、DNA 上にどのような損傷、修復が生じたか? といった、薬剤の効果がうまくに類推できる可能性があり、興味深い。さらには DNA 損傷剤のみならず、TsA といったヒストン修飾のコードを変換することでゲノムの基本構造に影響を与える薬剤に対しても感受性を示す (図 1 下段) ことより、広い薬剤レンジのスクリーニングにも適用可能である。

今後の展開

本試験の結果、分裂酵母 SCFpof3 変異株を用い、変異原性の簡便なアッセイができることがわかった。実際に未

知の因子等のスクリーニングを行なう際には、本変異株に加えて既知の修復経路が明らかな rad 変異株とも組み合わせることにより、より充実したアッセイが簡便に出来る

可能性があり期待される。

最後に、本研究を遂行するにあたり、研究奨励金を賜りました財団法人農芸化学研究奨励会に深謝申し上げます。

量子化学計算に基づく酵素の精密分子設計

岡山大学大学院自然科学研究科 田村 隆

20 世紀における最も重要な科学的発見は「遺伝子」と「量子」であったと云われている。遺伝子(=DNA)の発見により、極微量にしか存在しない蛋白質の大量調製が可能となり、アミノ酸残基を自在に変換する蛋白質工学も登場した。21 世紀においては「量子」がさらに大きなインパクトを生命科学にもたらすだろう。例えば、蛋白質内部で起こる化学反応を量子化学計算で定量的に予測できれば、望みの触媒能を持つ蛋白質の分子設計が可能となる。本研究では、市販のパソコンで実行可能な半経験的分子軌道計算(MOPAC)を用いて、律速段階に関わるアミノ酸残基に限定して触媒反応のシミュレーションを行い、その計算予測に基づく蛋白質の精密分子設計を行った。このようにして作製した変異酵素は酵素活性が 5~7 倍上昇し、化学反応予測に基づく酵素の分子設計が現実的に可能であることを示した。さらに、計算予測の精度を検討するために、変異酵素の活性化エンタルピー($\Delta H^\ddagger$)と計算で求められた $\Delta H^\ddagger$ 値を比較した。

研究の背景

チオレドキシン還元酵素(TrxR)は NADPH を消費して、基質チオレドキシン(分子量 10 kDa)を還元する FAD 含有酵素である(図 1)。ほ乳類の TrxR はカルボキシル基末端から 2 番目にセレノシステイン残基(SeCys)を

持つセレン酵素である¹⁾。本酵素の反応機構において還元当量は $\text{NADPH} \rightarrow \text{FAD} \rightarrow \text{活性中心ジスルフィド}$ に渡され、もう一方のサブユニット C 末端配列(-Gln-Gly-Cys-SeCys-Gly)の Cys-SeCys の S-Se 架橋を還元し、セレノール基が基質チオレドキシンを還元する。大腸菌で発現させるために SeCys を Cys に置換した Cys 型酵素の活性は野生型酵素の 0.1% 以下になる。これは、Cys のチオール基($\text{pK}_a = 8.5$)が SeCys のセレノール基($\text{pK}_a = 5.5$)よりも解離性に乏しいためとされている。そこで Cys498 の空間的近傍にある Gln494 を塩基性アミノ酸(His, Arg, Lys...)に置換して Cys498 のチオール基の解離を促進すれば、Cys 型酵素でも酵素活性を回復できると考えた。

1. モデルペプチドを用いた律速段階の反応シミュレーション

チオレドキシン還元酵素の C 末端配列を参考にしてモデルペプチド *N*-Acetyl-Ser-Ile-Leu-Gln-Ala-Gly-Cys-Cys-Gly(end)を Chem3D 上で構築した。下線部 Cys 残基が SeCys $\rightarrow$ Cys への変異箇所に対応する。このモデルペプチドを MM2 計算でおおまかに構造最適化を行ってから WinMOPAC(富士通)に取り込んで量子化学計算を行った。C 末端から二番目の Cys 残基と立体的に近傍にある Gln 残基を様々なアミノ酸に置換したモデルペプチドを作り、分子内で起こる Cys 残基の解離反応をハミルトニアン AM1, PM3, PM5 を用いて計算した。その結果、Q494R や Q494H などのアルギニン残基やヒスチジン残基が 4 kcal/mol 程度の低い活性化エネルギー($\Delta H^\ddagger$)で Cys 残基を解離させることが予測された(図 2)。

His 残基のイミダゾール環には Cys498 と相互作用可能な窒素原子が二つある上にイミダゾール環へのプロトン付加による解離、非解離の状態にも影響されるのでこれらの可能性を網羅して検討した。このような検討を進める中で、導入された His 残基の 3 残基上流にある Ser 残基が His 残基に引き寄せられ、その水酸基の N^{III} への配位によりイミダゾール環の塩基性が弱められる可能性も示唆された。そこで Ser 残基を Ala 残基に置換した S491A/Q494H の二重変異体についても反応予測を行った結果、水酸基の除去が His 導入効果をさらに高めると予測された。

計算に用いたハミルトニアン AM1, PM3, PM5 の中で AM1 がもっとも遷移状態に解が収束しやすく、基準振動解析で虚数が一つだけ出ると、反応経路(IRC)解析は難な

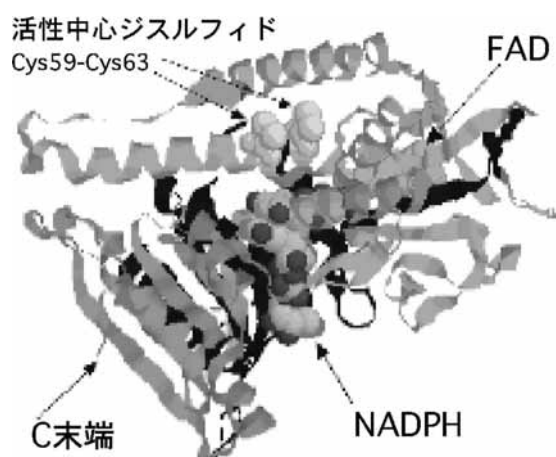


図 1 チオレドキシン還元酵素

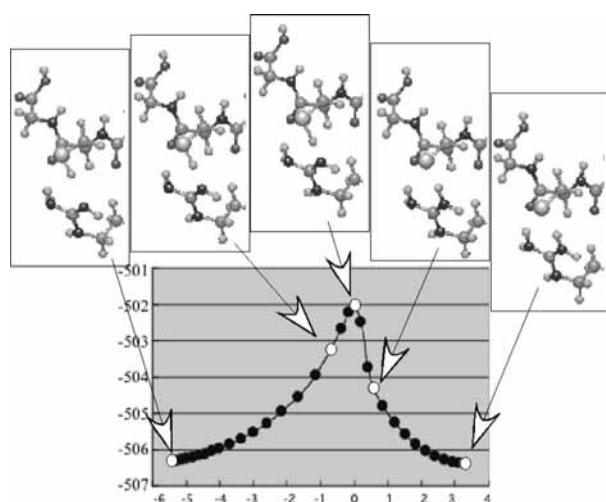


図2 Arg-Cys 残基間のプロトン授受反応予測

く得られた。ところがPM3は、共役系を構成する窒素の電荷を過大評価するという「くせ」があるためにArg, Hisの計算で遷移状態構造が得られないケースが多かった。そのような場合、水分子を一つ窒素周辺に配置してやれば、電荷のバランスがうまく取れるためか遷移状態が求められることが分かってきた²⁾。このあたりは、コンピュータ任せの機械的作業というよりは「実験化学者としての勘」と「ねばり強い試行錯誤」の積み重ねの中から得られる実験ノウハウが必要で、計算化学も実験のひとつと云われる所以である。

2. TrxR 発現系の確立

計算結果を酵素反応として検証するために大腸菌によるTrxR 発現系を確立した。この遺伝子中には大腸菌のレアコドンが22個含まれていたため、*E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus を宿主として検討した結果、レアコドンの補強により発現量が1.6倍向上した。TrxR1の遺伝子はpET32a発現ベクターに挿入してTrx タグとの融合蛋白質として調製した。また本酵素を可溶性画分に多く回収するために低温(18℃)かつ長時間(22 h)での発現誘導条件を確立した。発現した蛋白質にはTrx-His-Tagが付いているので、Ni キレートカラムで精製した後に、エンテロキナーゼでタグを切断してTrxR1を得た。これにより2005 mlの培養液から2~3 mgの目的蛋白質を調製できる。Gln494への変異導入はTOYOBOのKODplusをポリメラーゼとして用いることにより7.4 kbの発現プラスミド中に3塩基置換まで難なく調製することができた。

3. 活性型酵素の活性評価

Q494HとQ494Rの両変異酵素は、それぞれ比活性が変異導入前の酵素の約5倍、約7倍に上昇していた。計算に基づく分子設計どおりCys498チオール基の活性化に

成功したと思われる。またS491A-Q494Hは約6.8倍の活性増加が認められた。この結果もSer491残基によるH494への干渉が消失したことによりさらに活性化に成功したことを示している。また、pHディクソンプロットを比較した限りでは、どの変異酵素も同様のpH感受性を示しており、反応機構そのものに大きな変化はないと考えられる³⁾。

4. アレニウスプロットによる活性化エンタルピー計算

活性が回復した変異型酵素Q494R, Q494H, S491A/Q494Hについてアレニウスプロットから酵素反応の活性化エンタルピー($\Delta H^\ddagger$)を求めた。酵素反応の活性化エンタルピー値は、分子軌道計算で算出した $\Delta H^\ddagger$ 値と直接比較できるので計算の予測精度を判断する材料となる。Q494Rの変異酵素については、変異導入前のX498Cよりも活性化エンタルピー($\Delta H^\ddagger$)は低下しており、分子軌道計算による予測値と近い値を得ることが出来た(表)。rg残基の導入については、かなり精度良く蛋白質の分子設計が可能であるという興味深い結果となった⁴⁾。

5. His 残基導入効果

His置換型の酵素の予測はArg型酵素よりも複雑な問題を抱えている。イミダゾール環には塩基として働く可能性のある窒素原子が二つあり、 β -CH₂に近い内側の窒素原子N^IがCys498に相互作用すると、Ser491がHisに干渉する立体構造が予想された。 β -CH₂から遠い外側の窒素N^{III}が塩基となる相互作用では、N^Iへのプロトン付加によって塩基性が大きく変わる。水溶液中ではイミダゾール基へのプロトン付加は平衡状態にあるので、分子軌道計算による活性化エンタルピーの予測値は2.09から34.19 kJ/molの範囲内となる。実験値18.45 kJ/molをその範囲内を納めることはできたもののArg型酵素ほどの予測精度は得られなかった。このようなHisの挙動を統一的に予測するための計算ノウハウやハミルトニアンを選択については現在も検討を進めている。

さらに、調製したQ494Hは酵素活性の再現性が低く、酵素を調製するたびに比活性や $\Delta H^\ddagger$ が大きくばらついた。ほかの変異酵素はこのようなロット差が少ないので、これはQ494H変異酵素に特有の現象である。計算で網羅したようにHis残基の相互作用が異なる複数のコンフォメーションが混在していると考えられるので、実験サイドの再現性の問題を解決した上で、あらためて計算予測値と比較検討を進めたい。

6. 近似計算としての有用性と汎用性

本研究は、量子化学計算に基づく蛋白質の分子設計として初めての成功例である。蛋白質分子内で起きる化学反応を量子化学計算で予測して蛋白質を設計することが、意外

にも市販のパソコンによる計算で可能であることを実証しつつある。現在、計算化学に携わる専門家達は「溶媒としての水分子群をどう扱うのか」という課題を解くべく、天文学的な量の計算に取り組んでいる。しかし、これをともに扱う限り量子化学計算を現実の蛋白質化学に応用できる日は遙かに遠く、ワープロを扱うほどの簡便さがなくては一般的な生化学の実験室に普及させるだけの波及効果も乏しい。本研究では、律速段階に関わるアミノ酸だけに限定した非水系の近似計算でも、現実的に有用な結果が得られるのではないかと示している。量子酵素化学新時代の幕開けは案外早い時期に到来するのではないだろうか。

C₆₀ の光増感性を利用した抗菌マテリアルの創製

カリフォルニア大学サンタバーバラ校 山越葉子

目的

比較的長波長の光により励起するフラーレンの光増感性を利用し、抗菌マテリアルとして利用可能なポリマーの合成を試みた。

C₆₀ などのフラーレンは図 1 に示すように共役した sp² 炭素のみからなるカゴ型の化合物であり、(1) 光増感性、(2) 多様な化学反応性、(3) 超電導性などの電気電導性、(4) 金属内包性などの物理化学的特性を有することが報告されている。本奨励金受領者のグループでは、C₆₀ の光増感性に基づく生物活性に着目し、これまで光 DNA 切断活性、光抗菌性、光溶血作用などの報告を行ってきた。C₆₀ は非常に疎水性の化合物であるため、上記の実験を行う上では、C₆₀ を水に溶解するために界面活性剤 poly(vinylpyrrolidone) との複合体を調製し、この水溶性複合体を生物活性試験に用いた。また、活性発現のメカニズムを調べ、強力な活性酸素種であるスーパーオキシドやヒドロキシルラジカルの生成を EPR を用いた実験で証明した。

以上のような C₆₀ の特性は、C₆₀ が抗菌マテリアルの活性分子となる可能性を示唆している。本研究においては、

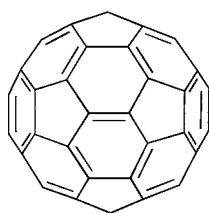


図 1 C₆₀ の構造。

本研究にご理解、ご援助を頂きました(財)農芸化学研究奨励会に深く感謝いたします。

- 1) T. Tamura & T. C. Stadtman: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 1006–1011 (1996).
- 2) 田村 隆, 鮫島圭一郎, 田中英彦, 稲垣賢二, 分子軌道計算に基づくチオレドキシン還元酵素の分子設計. 日本農芸化学会 2004 年度大会 (広島, 2004. 3).
- 3) 堀江敬一, 田村 隆, 田中英彦, 稲垣賢二, チオレドキシン還元酵素 Gln494 への変異導入効果. 日本農芸化学会 2004 年度大会 (広島, 2004. 3).
- 4) 堀江敬一, 田村 隆, 中山恵美, 稲垣賢二, 量子化学計算に基づくチオレドキシン還元酵素 C 末端配列の分子設計と蛋白質工学. 平成 16 年度日本農芸化学会中四国支部大会 (徳島, 2004. 9).

こうしたマテリアルの創製のため、構造中に C₆₀ を含有するポリマーを合成することを目的とする。

方法および結果

1. フレロピロリジンの合成: 分子内にビニル基あるいはスチレン部分を有する C₆₀ 誘導体を合成し、ポリマー合成の原料となるモノマーとすることとした。このモノマーを合成する原料として、最初に分子内に二級アミンを有する活性型 C₆₀ 誘導体フレロピロリジンの合成を行った。図 2 のスキームに示す通り、C₆₀ および対応するアルデヒド、アミノ酸をジクロロベンゼンあるいはトルエン中で加熱攪拌した。得られたフレロピロリジンの収率は図 2 に示すようにジフェニル体 **2d** で高収率を得たが、溶解性が低く、反応原料として扱いにくいいため、ジメチル体 **2a** を次の反応の原料として用いることとした。

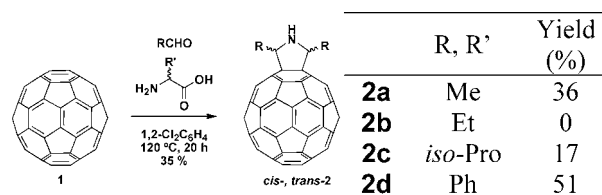


図 2 フレロピロリジンの合成。

2. モノマーの合成: ジメチルフレロピロリジンを用い、モノマーの合成を行った。検討の結果分子内にビニル基を有するモノマー **3** に関しては酸クロライド (図 3) を、スチレンを有するモノマー **4** に関してはヤマガチ試薬 (図 4) を用いる方法を適用した。結果として図 3 および図 4 に示す収率でモノマーを得ることに成功した。

3. ポリマーの合成: モノマー **3** および **6** を用いてポリマーの合成を試みた。ラジカル開始剤としては、アゾビスイソブチロニトリル (AIBN) を用い、トルエンあるいはジ

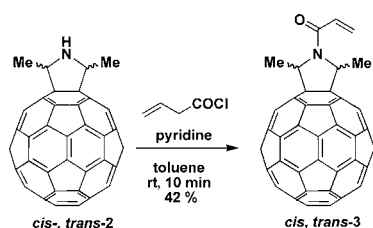


図 3 モノマー 3 の合成.

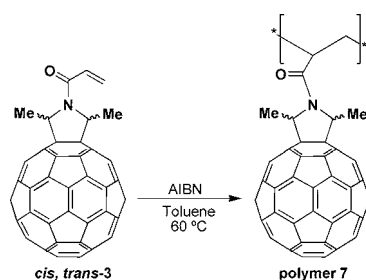


図 5 ポリマー 7 の合成.

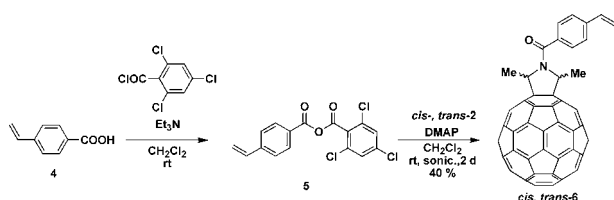


図 4 モノマー 6 の合成.

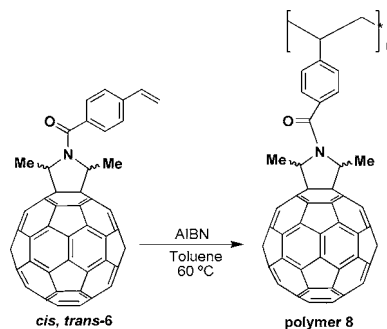


図 6 ポリマー 8 の合成.

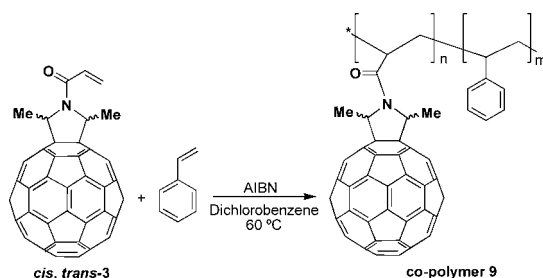


図 7 コポリマー 9 の合成.

クロロベンゼン中で 60℃ にて加熱撹拌した. まず, モノマー 3 を用いて重合反応を行った. AIBN の量を 0.01 等量から 1.0 等量まで変化させたとこ、モノマーの溶解性の高いジクロロベンゼン中で比較的高濃度のモノマー溶液を用い, AIBN を 1.0 等量用いた反応系においてポリマー 7 が不溶性の沈殿として得られた. 通常重合反応においては, AIBN の量は触媒量用いられるが, 本反応においては, フラーレンのラジカル消去能の影響により, AIBN の活性が弱められるため, 比較的多量の AIBN を必要としたと考えられる. また, モノマー 6 を用いて, 同様の反応を行った. その結果, 同様にポリマー 8 が不溶性沈殿として得られた. 次に, スチレンとのコポリマーの合成を行った. モノマー 3, スチレンおよび AIBN を 1:100:20 の割合で混合し, ジクロロベンゼン中で 60℃ にて加熱撹拌した. その結果, クロロホルムに可溶なコポリマー 9 を得た.

考察および展望

分子内にビニル基あるいはスチレン骨格を有するフラーレンをモノマーとして, AIBN によるラジカル重合反応を行い, C₆₀ ポリマーの合成を行った. その結果各のモノマーから不溶性沈殿としてポリマーが得られた. ポリマーの溶解性を上げるために, スチレンとのコポリマーの合成も試みた. その結果, クロロホルム等の有機溶媒に可溶なコポリマーが得られた. 将来的にはこのコポリマーをプラス

チックやガラス等の単体の表面にコートして抗菌マテリアルとして用いることを目指している. 現在は, このコポリマーを用いたスーパーオキシド生成能や抗菌性の検討を行っているところである. また, コポリマーの作成におけるモノマーの種類をスチレンからほかのモノマーに換えることで, 種々の溶解性のポリマーの合成も可能であると考えられる. 将来的には, この手法を用いて, 水溶性ポリマーの合成を行い, 抗菌マテリアルあるいはガンの光線力学療法剤などとしての応用が考えられる.

植物根分泌型タンパク質構築用ベクターの開発に向けた根分泌型タンパク質の解析

北海道大学 創成科学共同研究機構 和崎 淳

植物は移動することができないため、根からの分泌物質などを通してストレス条件に適応している。根粒菌の誘引に関わるフラボノイド類、 Al^{3+} の解毒と難溶性リンを可溶化する有機酸、有機態リンを分解する酸性ホスファターゼが代表的な根分泌物質として挙げられる。本研究では、これらの分泌物質のうち、タンパク質の分泌に着目した。分泌型のタンパク質は、活性を持つ領域の上流に分泌シグナルペプチドを有する。この分泌シグナルペプチドの特徴を明らかにし、その配列を有用タンパク質の上流につなぐことによって、疎水性が高くなれば有用タンパク質の分泌が可能になるものと考えられる。これと併せて根特異的発現プロモーターを利用することにより、有用タンパク質を根で発現させて効率的に分泌させたり、高純度に回収できたりすることが期待される。そこで本研究は、植物根からの有用タンパク質の分泌を実現する分泌型タンパク質発現ベクターの開発を目的とした。

発現プロモーターの解析

これまでに根からの酸性ホスファターゼの分泌能が強いマメ科植物のルーピンから根分泌型酸性ホスファターゼ遺伝子 *LASAP2* を単離した。Real Time PCR による発現解析の結果、*LASAP2* のホモログ *LASAP1* および *LASAP3* は全ての器官で発現することが確認されたが、*LASAP2* はリン欠乏条件下で生育する場合に根のみで強い発現が認められた。このことから、*LASAP2* プロモーターは有用タンパク質の発現制御を行うために有望であると判断された。現在、プロモーター領域の Deletion Series を作成して必要部分の特定を進めている。

分泌型タンパク質の解析

モデル植物として配列データベースの構築が進んでいるイネを標準リンおよびリン欠乏条件で水耕栽培した。根から可溶性タンパク質を抽出するとともに、培養液を回収・濃縮して分泌型タンパク質とした。これらのタンパク質を2次元電気泳動に供した。根の可溶性タンパク質は数百、分泌型タンパク質は百程度のスポットが確認された。スポットの出現パターンが異なることから根から積極的なタン

表 1 推定イネ分泌型タンパク質

タンパク質	個数	推定シグナルペプチド長
Acid phosphatase	2	19~24
Peroxidase	2	19~23
Invertase	5	22~28
Ribonuclease	10	20~33
Others	4	19~29

パク質分泌が行われていることが確認された。可溶性タンパク質の発現変動の結果より、リン欠乏条件で育つイネ根においては、解糖系の促進や核酸モノマーの合成維持が起きていることが示唆された。現在、分泌型タンパク質の各スポットについて MALDI-TOF-MS によるペプチドマッピングを進め、データベースの構築を継続している。

イネは完全長 cDNA が多数単離され、そのデータベース化が進められた。このデータベースを利用し、分泌型タンパク質の候補の抽出を試みた。タンパク質局在性推定プログラム PSORT, Target P を用いた場合に確実性 0.5 以上で細胞外に局在すると推定されたタンパク質は 23 種類存在した (表 1)。これらのタンパク質の推定シグナルペプチドは 19~33 残基からなる。これらのうち 14 個は Met の次に Ala が配置されていた。推定シグナルペプチドは Ala と疎水性の高い Val, Leu の出現頻度が高く、これら 3 種類のアミノ酸だけで 25~75% を占めた。これらのタンパク質の中に Alternative Splicing を起こす遺伝子も含まれた。このことは、タンパク質の細胞内局在性に Alternative Splicing が関与することを示唆するものかもしれない。

本研究の推進により、根特異的発現プロモーターの解析と根分泌に関わるシグナルペプチドの情報の蓄積が進んだ。これらの結果をもとに、根分泌型タンパク質形質転換ベクターを構築しつつある。これまでに、植物における有用タンパク質等の発現に基づく「食べる医薬」の開発に向けた試みがいくつかなされているが、食品として社会的コンセンサスを得られているとは言い難く、現状では発展性が厳しいと言わざるを得ない。しかし、根から分泌される場合には元来のタンパク質と同等のものを精製することが可能である。将来、医薬分野等への応用の可能性を検討していきたい。

最後に、本研究の推進に援助頂いた財団法人農芸化学研究奨励会に謝意を表します。

大腸菌を用いた Nonribosomal peptide synthetase によって生合成される天然物および非天然型化合物生産のためのモデル生合成システム構築

南カリフォルニア大学薬学部 渡辺賢二

1. Echinomycin 全生合成遺伝子のクローニング

Echinomycin 全生合成遺伝子は *Streptomyces lasaliensis* の全 DNA より作製されたコスミドライブラリーをスクリーニングすることによって得られた。それぞれ異なった 2 個の挿入断片を含むコスミドの解析から、本生合成遺伝子クラスターの全長は約 40 kb からなることがわかった。相同性検索の結果、primer unit である quinoxaline-2-carboxylic acid (QC, 2) は *ecm2*, -3, -4, -8, -11, -12, -13, -14 によって生合成されることが、また 1 の二量体型ペ

チド骨格は *ecm1*, -6, -7 および *fabC* によって形成され、最後に *ecm17* および -18 によって特徴的な thioacetal 構造へと変換されると予測された。このほか本クラスターには耐性遺伝子等を加え、合計 17 個の機能予測可能な open reading frame (ORF) と 1 個の機能不明 ORF および 1 個の不活性タンパク質をコードした遺伝子を含んでいた (Table 1)。

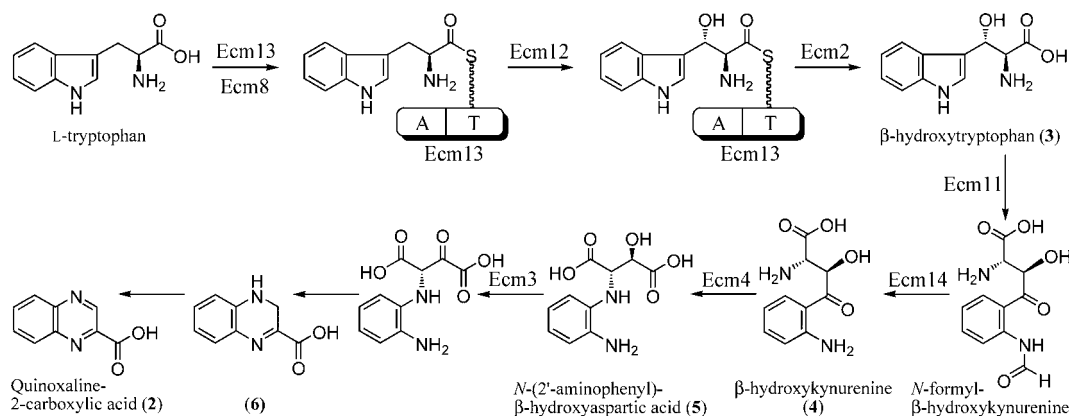
2. QC 生合成経路および QC 遺伝子発現ベクターの構築

QC 2 の生合成経路は相同性の高い酵素遺伝子の機能に基づき、Scheme 1 に示したように予想した。まず出発基質である L-tryptophan が一旦 adenylation され、aminoacyl thioester 酵素中間体が形成された後、hydroxylation, 加水分解により 3 へと変換される (*Ecm2*, -8, -12, -13)。続いてインドール環の酸化開裂、アミドの加水分解により β -hydroxykynurenine (4) を与える (*Ecm11*, -14)。

Table 1. Deduced function for the open reading frames of the echinomycin biosynthetic gene cluster.

ORF	Amino Acids	Sequence Homolog	Putative Function
<i>ecm1</i>	527	Peptide arylation enzyme <i>entE</i>	QC activation
<i>ecm2</i>	248	Type II thioesterase <i>grsT</i>	QC biosynthesis
<i>ecm3</i>	362	Isopropylmalate dehydrogenase <i>leuB</i>	QC biosynthesis
<i>ecm4</i>	472	FAD-dependent oxidoreductase <i>ubiH</i>	QC biosynthesis
<i>ecm5</i>	n.a.	Transposase (inactive)	Unknown
<i>ecm6</i>	2608	Nonribosomal peptide synthetase <i>teiC</i>	Peptide synthesis modules 1-2
<i>ecm7</i>	3135	Nonribosomal peptide synthetase <i>acmC</i>	Peptide synthesis modules 3-4
<i>ecm8</i>	70	MbtH-like protein <i>mbtH</i>	Unknown
<i>ecm9</i>	181	DNA-binding response regulator <i>ompR</i>	Regulation
<i>ecm10</i>	252	TetR family transcriptional regulator <i>pip</i>	Regulation
<i>ecm11</i>	220	Tryptophan 2,3-dioxygenase <i>tdo2</i>	QC biosynthesis
<i>ecm12</i>	395	Cytochrome P450 oxidase <i>cypX</i>	QC biosynthesis
<i>ecm13</i>	598	Mannopeptimycin peptide synthetase <i>mppB</i>	QC biosynthesis
<i>ecm14</i>	402	Erythromycin A esterase <i>ereB</i>	QC biosynthesis
<i>ecm15</i>	285	Helix-turn-helix transcription regulator <i>marR</i>	Regulation
<i>ecm16</i>	806	Excinuclease ATPase <i>uvrA</i>	Self resistance
<i>ecm17</i>	313	Thioredoxin reductase <i>trxB</i>	Disulfide formation
<i>ecm18</i>	224	SAM-dependent methyltransferase <i>smtA</i>	Thioacetal formation
<i>fabC</i>	82	Fatty acid synthase acyl carrier protein <i>acpP</i>	QC carrier protein

n.a.: not applicable.



Scheme 1. Predicted pathway for quinoxaline-2-carboxylic acid biosynthesis.

さらに非常に珍しい酸化的アミノ基転移を経て **5** を与えた後、酸化的脱炭酸、環化が生じ **6** に変換され、最終的に空気酸化により QC を生合成する (Ecm3, -4). 現在いくつかの推定中間体を合成し、この変換反応の詳細を検討中である.

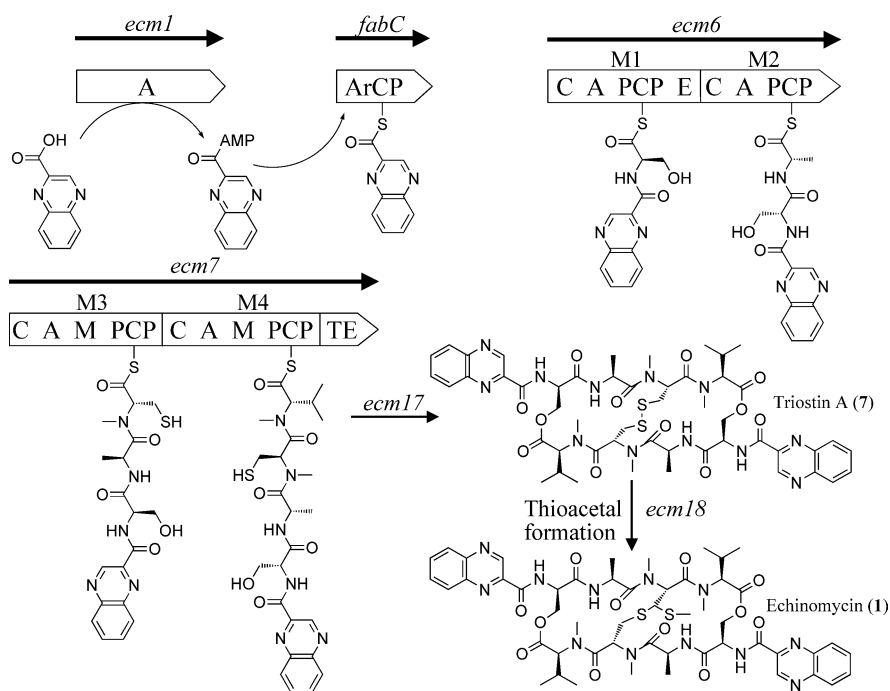
次いで QC 生合成遺伝子 *ecm2*, -3, -4, -8, -11, -12, -13, -14 の発現を検討した. まずはじめに、これら生合成遺伝子をそれぞれ単独でベクターに組み込み、8 個すべての生合成遺伝子の発現を確認した. 次に大腸菌を用いて QC を生産させるため、上記 8 個の QC 生合成遺伝子それぞれに T7 promoter, ribosome binding site および T7 terminator を連結し、T7 promoter による制御下で発現する multiple gene polycistronic 発現ベクター A を構築した. これまでに多くの PKS および NRPS の塩基配列が決定されてきたが、その多くは放線菌由来の GC 含量の高い塩基配列であることが知られている. そこでこれら生合成遺伝子が大腸菌で高発現させるために大腸菌において翻訳頻度が低いコドンに対応する tRNA をコードした領域を上記発現システムに加え、これらを転写させることで生合成遺伝子をさらに高発現させる発現ベクター B を用いた.

3. Echinomycin 生合成における octadepsipeptide 骨格生合成遺伝子および echinomycin 耐性遺伝子発現ベクターの構築

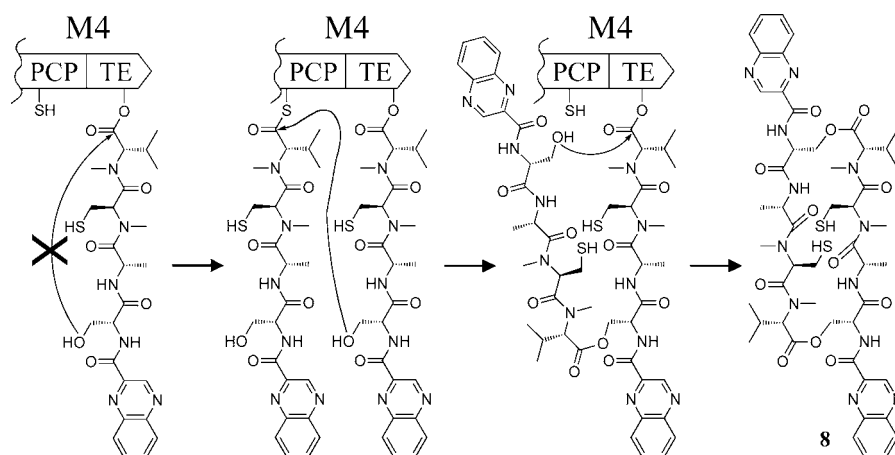
Echinomycin 骨格生合成の詳細な経路は、Scheme 2 に示したように予想した. NRPS の A ドメインと高い相

同性を示す Ecm1 によって QC が adenylation され活性化された後、ArCP と aryl thioester 酵素中間体を形成する. 次いで 2 個の NRPS モジュール (M1, M2) で構成される Ecm6 によって L-Ser および L-Ala が縮合される. この際 M1 には L-Ser 由来の不斉中心をエピメリ化する E ドメインが含まれている. 続いて 2 個の NRPS モジュール (M3, M4) で構成される Ecm7 によって L-Cys および L-Val が順次縮合される. この場合も M3, M4 には *N*-メチル化を触媒する M ドメインがそれぞれ 1 個ずつ存在した. 必要な構成成分がすべて揃ったペプチド鎖は Scheme 3 に示す機構により thioesterase (TE) ドメインの触媒作用で二量体化および環化により **8** を与える. 酸化酵素 Ecm17 によりジスルフィド結合が形成されて triostin A (**7**) に変換された後、メチル化酵素と予想される Ecm18 の作用で *S*-メチル化後、sulfonium ylide を経由して thioacetal が生成されると予想した (Scheme 4).

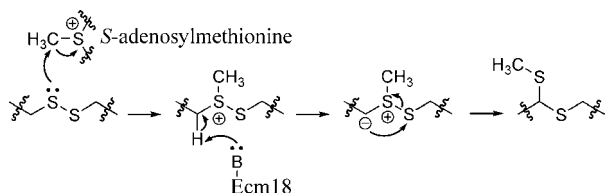
NRPS が酵素活性を持つためには PCP ドメインが phosphopantetheinyl 基によりによって holo 化される必要があるが、大腸菌にはこの基を導入する酵素がないため他の菌由来の酵素遺伝子 (*sfp*) を導入することにした. また、echinomycin 生合成遺伝子クラスターには *Streptomyces peucetius* 由来 daunorubicin 生合成遺伝子の一部としてクローニングされた耐性遺伝子 *drrC* と高い相同性を示す *ecm16* を確認した. 大腸菌菌体内で生合成された echinomycin の DNA 結合活性による宿主大腸菌の死滅



Scheme 2. Predicted pathway for echinomycin biosynthesis and the modular organization of the echinomycin NRPS.



Scheme 3. Proposed mechanism of dimerization and cyclorelease of the quinoxaline-tetrapeptide intermediates by the TE domain.



Scheme 4. Proposed mechanism for the conversion of the disulfide bond to thioacetal bridge in echinomycin biosynthesis.

を防ぐことを目的として、*ecm16* も合わせて発現ベクターに組み込むことを試みた。そこで上記生合成遺伝子を *ecm1*, -16, -17, -18, *fabC*, *sfp* と *ecm6*, -7 の二つのグループに分け、QC 生合成遺伝子発現ベクター A と同様に multiple gene polycistronic 構造を持つ、2 個の異なる発現ベクター C および D を構築した。得られた合計 4 個の発現ベクターを一つの細胞中で安定に複製し遺伝子発現させ生合成産物を得るため、それぞれ 4 種の異なる複製開始点および薬剤耐性遺伝子を持つ発現ベクターによる発現システムを構築した。

4. QC 生合成酵素の精製

得られた発現ベクターを用い形質転換大腸菌を培養することで、QC 生合成酵素の精製を試みた。大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換し、得られた菌体を用い 8 個の発現タンパク質を Ni-NTA カラムクロマトグラフィーによって部分精製した。

5. echinomycin 生合成遺伝子の発現, echinomycin および triostin A の酵素的全合成

最後に echinomycin 生合成遺伝子の発現による

echinomycin (**1**) および triostin A (**7**) の生産を試みた。まずはじめに、生合成遺伝子 *ecm1*, -6, -7, -16, -17, -18, *fabC* に関しそれぞれ単独での発現を検討した。その結果、7 個すべての生合成遺伝子の発現が確認された。そこで Ni-NTA カラムクロマトグラフィーを用い 7 個すべての発現タンパク質を精製した。さらに上記 4 個の発現ベクターを BL21 (DE3) で共発現し、ファーマンターを用いた培養で 2 L の培養液から生合成産物 0.3 mg を分離精製した。本化合物は ESI-MS より分子量 1139 [M+K]⁺, 1123 [M+Na]⁺, 1101 [M+H]⁺ および 1053 [M-SCH3]⁺ を与え、¹H-NMR より **1** と確認され、発現された合計 16 個の生合成酵素は天然に存在するタンパク質と同じ機能を持ち、大腸菌によって **1** を生産可能であることが証明された。さらに、thioacetal の形成に必須と予測された *ecm18* を含まない triostin A 生合成遺伝子発現ベクターの作製を行った。これを上記と同様に発現させ、ファーマンターを用いた培養で 2 L の培養液から生合成産物 0.5 mg を分離精製した。本化合物は ESI-MS および ¹H-NMR より **7** と確認された。従って、*ecm18* は特異な S-メチル化および転移反応により **7** から **1** へと変換する酵素遺伝子であることが証明された。この結果大腸菌を用いた発現システムを持つ利点によって簡便に“Rational Design”を可能にすることが立証された。

以上今回我々は echinomycin 生合成の全過程を分子レベルによる変換反応として詳細に解析することを可能とし、一つの複雑な構造を有する生物活性天然物の全生合成遺伝子を発現することで、有機合成化学による全合成とは全く異なる方法論を用いた天然物供給の可能性を示した。