



放線菌由来ヘテロ環含有抗生物質の生合成に関する分子生物学的研究

富山県立大学工学部生物工学科 講師 尾 仲 宏 康

ヘテロ環を含有する化合物は天然に広く分布しており、医薬品など広く利用されている。これらヘテロ環化合物がどのように生合成されるのかは重要な知見となるが、個々の化合物レベルでは未知の部分が多いのが現状である。本研究では放線菌由来ヘテロ環化合物のうち、類縁化合物を含めて生合成経路がいまだ明らかになっていない2種類の化合物、インドロカルバゾール系化合物と直鎖チオペプチド系化合物を研究対象とし、遺伝子工学、構造生物学的手法を用いてその生合成経路を同定した。前者の化合物内にはピロール環とインドール環からなるインドロカルバゾール環、後者にはチアゾール環とオキサゾール環構造が存在するが、これらヘテロ環形成に関与する酵素はいずれも既知のヘテロ環合成酵素群とは異なるユニークなものであった。さらにコンビナトリアル生合成により、両化合物合わせて46種類の化合物の醗酵生産を行った。

シキナーゼ阻害活性を有するために、細胞周期阻害を作用機序とする抗がん剤として期待されている。現在6種類のICZ化合物が医薬品として臨床試験中であることから、本化合物群の潜在能力の高さが伺いしれる。

天然物由来のICZの多くは土壤微生物である放線菌から発見されており、生合成に関しては主にSTAとレベッカマイシン13 (REB, 図1C) についての研究が日米欧で競い合っている。ICZ化合物は特徴的な6環化合物であるが、その生合成経路の詳細は未知であった。そこで、*Streptomyces* sp. TP-A0274 由来のSTA および *Lechevalieria aerocolonigenes* ATCC39243 由来のREB 生合成遺伝子群のクローニングを行い、両菌株の遺伝子破壊株を計18株作製した。これら破壊株が蓄積する生合成中間体を同定することによって、ICZ生合成経路を世界で初めて明らかにした(図1ABC)。さらに、組換え酵素の生化学的解析および結晶構造解析を行うことにより、その複雑でユニークな一連の触媒機構を明らかにした。

1. インドロカルバゾール化合物の生合成経路の解明

スタウロスポリン 12 (STA, 図1B) をはじめとするインドロカルバゾール (ICZ) 骨格を有する化合物群は強力なプロテ

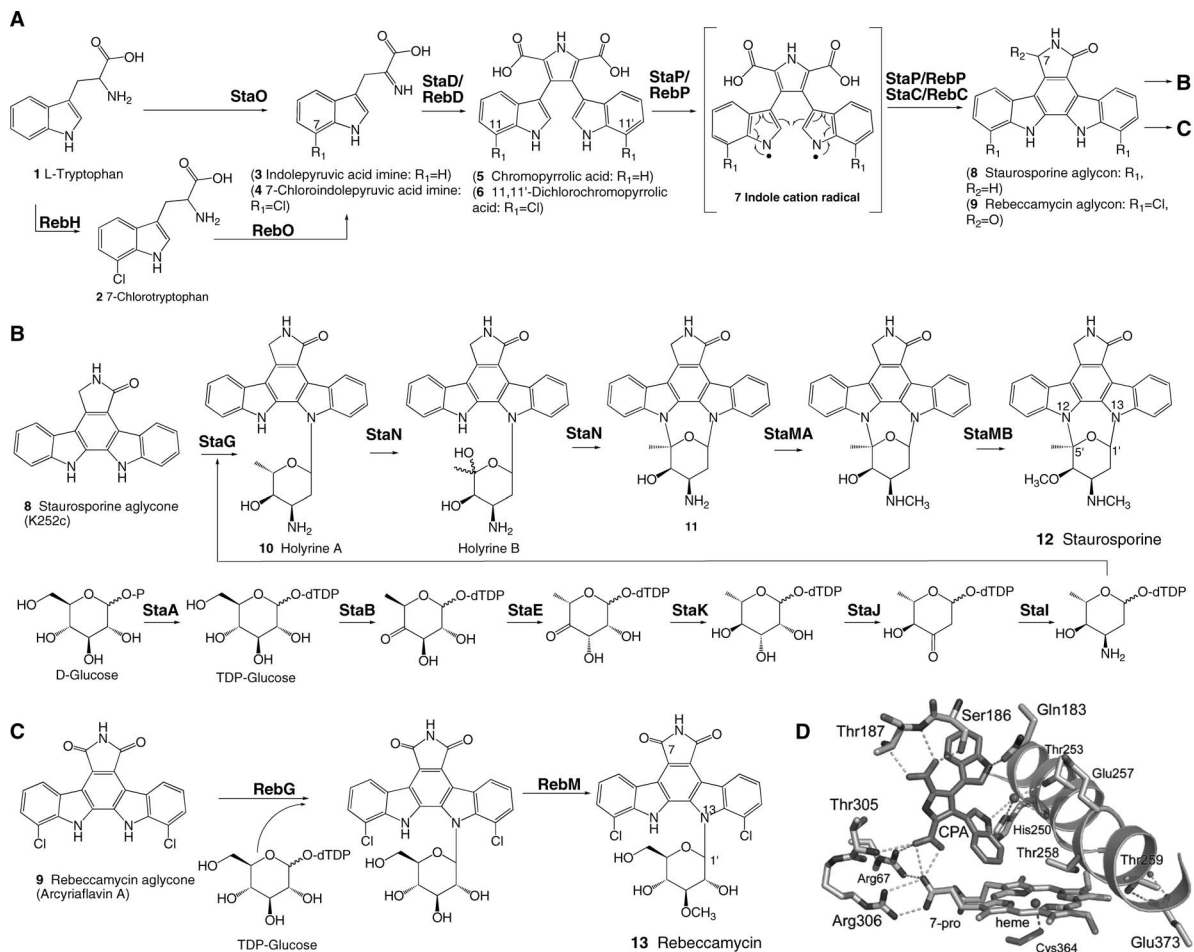


図1 本研究により明らかになったインドロカルバゾール生合成経路 (A, B, C) と StaP 立体構造 (D)

(1) ICZ 生合成経路の同定

ICZ 生合成経路は REB 生合成遺伝子の破壊実験により同定した。その骨格合成には四つの酵素が必要であり、REB の場合は RebO, RebD, RebP, RebC からなり、STA の場合は StaO, -D, -P, -C からなる。まず、アミノ酸オキシダーゼ・RebO により、7-クロロ化トリプトファン **2** が脱水素して、7-クロロインドールピルビン酸イミン **4** に変換される。次いで 2 分子の **4** が RebD の触媒で縮合反応し、ジクロロクロモピロリン酸 **6** となる。最後に P450RebP によって、**6** が ICZ 骨格へ変換される。この際の脱炭酸に関しては、RebP のみでは、十分に触媒反応をコントロールすることができず、ピロール環の酸化状態の異なる 3 種の化合物が生じるが、酸化酵素・RebC が共存すると酸化状態が制御されて、REB アグリコンのみが **6** より生合成されるようになる。STA においても同様の経路で ICZ が生成し、図 1B の経路で STA となることを明らかにした。

クロモピロリン酸 **5** (CPA) は ICZ 生合成における鍵中間体であることが、本破壊株実験によって初めて明らかにされたが、実は CPA は同じくビスインドール化合物であるピオラセイン (VIO) を生産する *Chromobacterium violaceum* よりすでに単離されていた。さらに *rebD* 酵素遺伝子は唯一、*C. violaceum* よりクローニングされた VIO 生合成遺伝子・*vioB* とのみ 36.6% の相同性を有しており、生産菌が全く異なる ICZ と VIO の生合成が分子進化的には類似していることが示唆された。

(2) 巨大ヘム酵素・StaD の生化学的解析

CPA 合成に関与する RebD, StaD は ICZ 生合成における鍵

酵素であるが、VioB 以外に類似酵素はなく、触媒反応の詳細は不明であった。そこで、StaD を大腸菌組換えタンパク質として発現し、酵素活性を測定した。その結果、StaD は 4 量体を形成し、複合体の分子量は 500 kDa にもなる巨大ヘムタンパク質であり、**3** を NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 存在下で CPA へと変換する、ほかに例を見ない酵素であった (図 1A)。

(3) P450StaP の立体構造解析

CPA を ICZ 骨格へと変換する StaP は P450 に分類されるが、酸素添加反応を行う通常の P450 反応を考えると StaP の触媒反応は説明できない。そこで、StaP の X 線結晶構造を解き、StaP と CPA の結合状態を明らかにした (図 1D)。その結果、本反応は P450 反応としてはたいへん珍しい電子引抜き反応を行う酵素であることが明らかとなり、インドールカチオンラジカル **7** が生じ、C-C カップリング、脱炭酸反応へと進むことで **8** を生成する経路を明らかにした。

(4) 糖部位とアグリコンを結合する P450StaN の機能解析

STA は 2 本の C-N 結合によって糖部位がアグリコンに結合しているが、このうち、12N-5'C 間の結合は通常の糖転移反応では説明のつかない unusual な結合である。本結合が P450 StaN によって **10** から **11** へと触媒されることを *staN* 破壊株の解析により明らかにした (図 1B)。

2. 直鎖チオペプチド系化合物・ゴードスポリンの生合成経路の解明

(1) 放線菌の二次代謝と形態分化を促進するゴードスポリンの発見

ゴードスポリン (GS) は放線菌 *Streptomyces* 属に対して孢子

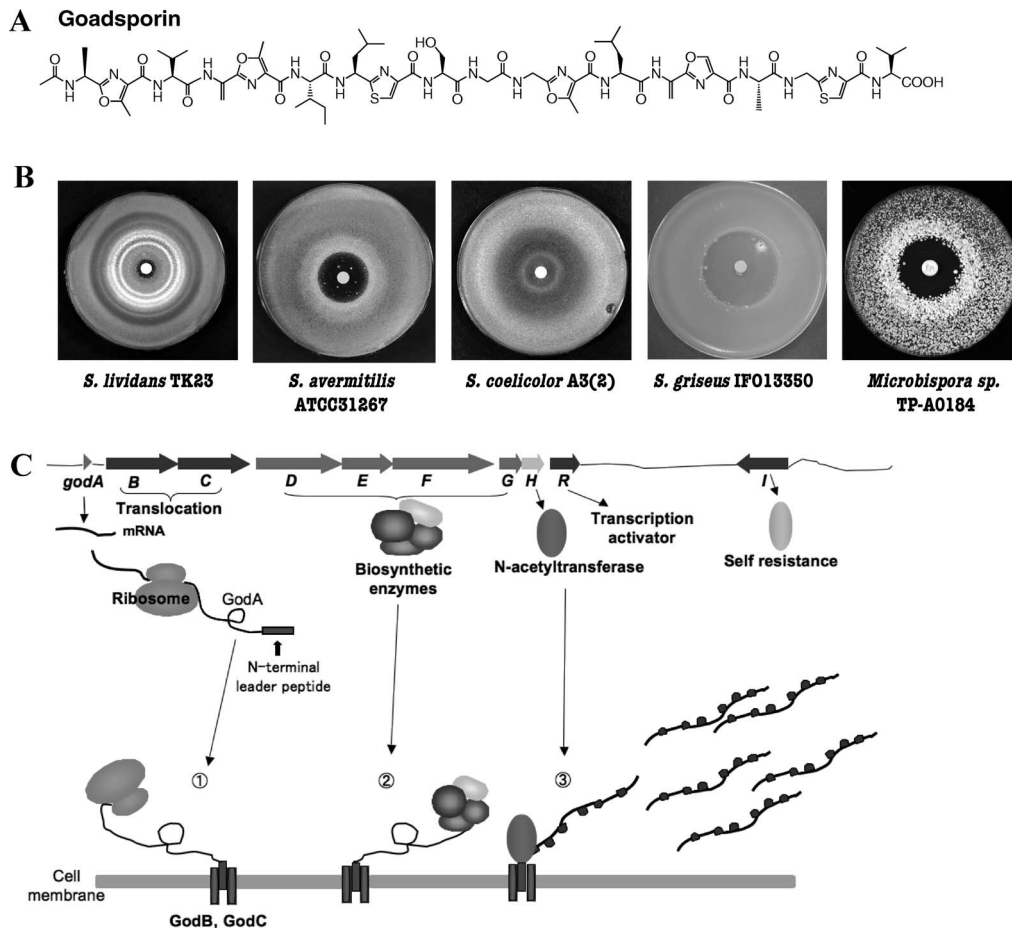


図 2 ゴードスポリンの構造 (A) および生理活性 (B), 推定生合成経路 (C)

形成、二次代謝生産の誘導をする直鎖のチオペプチドである。本化合物は *Streptomyces* sp. TP-A0584 より発見したもので、内部に 6 個のヘテロ環（チアゾール環とオキサゾール環）を含有する（図 2A）。GS はユニークな構造を有しており、直鎖のポリペプチドで内部にヘテロ環を含有する化合物の報告例は GS が唯一である。また、同様の活性をもつ化合物もほかに例がなく、構造、作用両面に特徴的である。図 2B は放線菌に対する GS の作用を paper disc assay で見たものであり、約 8 割の放線菌に対して GS は同様の生理作用を示した。しかしながら、放線菌以外には活性を示さないことから、GS は放線菌に特異的に存在する分子メカニズムに作用すると考えている。

### (2) GS 生合成遺伝子の解析

GS の生合成をその遺伝子解析より推定した。図 2C に示す 10 個の遺伝子からなる *god* クラスターにより GS が生合成されることを *S. lividans* を用いた GS の異種発現により明らかにした。①GS 前駆体ペプチドはリボゾームによって合成され、膜にアンカーされる、②ヘテロ環合成酵素により GS 前駆体にヘテロ環が修飾される、③N 末がアセチル化され膜から切り出され菌体内に蓄積する、の 3 段階で GS が生合成されると予想した。これらのうち、ヘテロ環合成に関与する *godD, E, F, G* は既知のタンパク質と全く異なる新規なものであり、新規ヘテロ環合成反応が予想される。

### 3. ヘテロ環化合物生合成経路を利用した「ものづくり」

生合成遺伝子に遺伝子操作を加えることにより新規類縁化合物を 46 種類醗酵生産した。ICZ 生合成においては遺伝子破壊株をベースに両生合成遺伝子を組み換えることにより新たに 15 種類の誘導体を創製し、ICZ 化合物のコンビナトリアル生合成への道を拓いた。GS においては構造遺伝子・*godA* の改変により 31 種類の新規誘導体を作製した。そのうちの 1 種の抗菌スペクトルを変化させることに成功した。

### おわりに

放線菌は抗生物質をはじめとした多様な二次代謝産物を作ることで知られており、天然物の宝庫である。本研究では放線菌の 2 種の新規生合成経路を明らかにしたが、どちらも未知の酵素反応の連続で化合物を生合成しており、二次代謝の多様性を裏づける結果となり興味深い。また、本研究で創製した化合物のうち 34 種類は新規構造であり、新規化合物を求める手法として、コンビナトリアル生合成は天然物のスクリーニングに匹敵する技術になりうることを 2 化合物を例に示すことができたと考えている。

本研究は富山県立大学工学部生物工学研究センター有用生物探索工学部門（現、生物工学科微生物工学講座）において行われました。研究を進めるにあたり、終始温かいご指導とご支援を賜りました富山県立大学工学部教授・古米 保先生に心より御礼申し上げます。また、同研究室で多大なご協力とご指導いただきました准教授・五十嵐康弘先生に厚く御礼申し上げます。ICZ 生合成に関する研究は欧米の研究者との熾烈な競争となり、終始緊張感の続くものでしたが、研究室の皆様のご協力により成し遂げることができました。心より御礼申し上げます。共同研究者として本研究の遂行に多大なご協力をいただきました北里大学教授・池田治生先生、富山県立大学准教授・大利 徹先生、同准教授・加藤康夫先生、理化学研究所主任研究員・城 宜嗣博士、同専任研究員・永野真吾博士に厚く御礼申し上げます。また、大学生時代の恩師であり、現在に至るまで温かいご支援をいただいている東京大学農学部醗酵学研究室教授・別府輝彦先生、同教授・堀之内末治先生ならびに研究室 OB の皆様にもこの場を借りて厚く御礼申し上げます。最後に、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会中部支部長・前島正義先生ならびに富山県立大学工学部生物工学科の諸先生方、ご支援賜りました皆様に厚く御礼申し上げます。