



放線菌のもつ多様な二次代謝産物生合成機構の解析

東京大学大学院農学生命科学研究科 勝山陽平

はじめに

放線菌は実に多様な構造を持つ二次代謝産物を生産する。抗生物質であるバンコマイシン、免疫抑制剤であるタクロリムス、抗がん剤であるドキソルビシンに代表されるように、その多くは有用な生理活性を示すことから、放線菌の生産する二次代謝産物は古くから有用な医薬品資源であった。このような放線菌の物質生産能力は、進化の過程で多様な化学反応を触媒する酵素を放線菌が獲得してきたことを示している。今回、放線菌の持つ二次代謝産物生産能力を理解するために、私たちの研究室で取り組んできた最近の研究を紹介する。

1. 非リボソームペプチドの生合成機構の解析

非リボソームペプチドはリボソームではなく、非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) と呼ばれる酵素群により生産されるペプチドの総称である。NRPSは複数のドメインからなる巨大なタンパク質である。リボソームにおけるペプチド合成系とは異なり、多くの非タンパク質性アミノ酸を基質として利用することができ、実に多様な構造のペプチドを合成することができる。非リボソームペプチドの生合成機構を理解する上では非タンパク質性アミノ酸がどのように生合成されるか解析するとともに、NRPS本体の触媒機構を知ることが重要である。

Methylproline残基を持つ griselimycin, α -methyl-L-serine残基を持つ JBIR-34, -35, nitrotyrosine残基を持つ rufomycin の生合成機構を解析した。それにより、これらの持つ非タンパク質性アミノ酸の生合成機構を明らかにした (図1)。Methylproline は leucine の水酸化から始まる経路により生合成されることが明らかとなった。 α -methyl-L-serine は serine のメチル化ではなく D-alanine のヒドロキシメチル化を触媒する酵素 FmoH により生合成される。また、nitrotyrosine は NO を利用して tyrosine のニトロ化を触媒する cytochrome P450 により合成されることを示した。

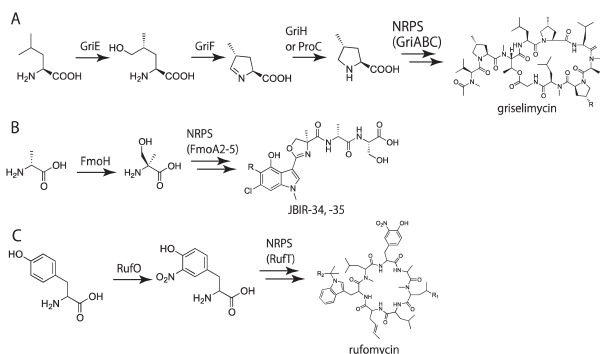


図1. 新たに明らかとなった非リボソームペプチドの生合成経路。A, griselimycinにおけるメチルプロリン生合成経路。B, JBIR-34, -35の生合成経路における α -methyl-L-serine生合成経路。C, rufomycinの生合成におけるニトロロチロシンの生合成経路。

また、JBIR-34, -35の生合成を担うNRPSについて詳細な機能解析を試みた。JBIR-34, -35は最終的にFmoA2, A3, A4, A5と名付けた4つのNRPSにより組み立てられる。そこで、これらの4つのアミノ酸の組換えたんぱく質を調製し、*in vitro*で解析を行った。4つのたんぱく質を用いて反応を行うことで、JBIR-34, -35の生合成経路を*in vitro*で再構成することに成功した。また、変異導入解析をすることで、ヘテロ環構築と α -methyl-L-serine認識メカニズムに関する知見を得た。さらにFmoA3のX線結晶構造解析に取り組み、Cy (環化)、A (アデニル化)、PCP (ペプチジルキャリアータンパク質)ドメインからなるNRPSの構造を明らかにすることに成功した。

2. ポリケタイド生合成機構の解析

ポリケタイドは酢酸ユニットが多数縮合した結果合成されるポリケトメチレン鎖由来の化合物群である。マクロライド化合物や芳香族化合物が知られており、二次代謝において重要な化合物群である。

Streptazone Eはcyclopenta[b]pyridine環を持つポリケタイドである。その特異な環構造の形成メカニズムの解明を目指した。まず、この化合物の生合成遺伝子クラスターを同定し、その生合成機構を遺伝子破壊により解析した。その結果、この化合物は最終モジュールに還元ドメインを持つモジュラー型ポリケタイド合成酵素 (PKS) により生合成されることがわかった。また、破壊株に蓄積した中間体の構造解析を行うことでstreptazone Eの生合成経路を調べた。その解析からその生合成にはエポキシ環の開環と共役した炭素5員環形成という珍しい反応を触媒する新規酵素が関わることを示した (図2A)。

次に、イソフラノナフトキノン環を持つ芳香族ポリケタイドであるJBIR-76, -77の生合成機構を解析した。遺伝子破壊と酵素の*in vitro*解析実験から、この化合物はII型PKSにより生合成されることが、フラビン依存型のバイヤーベリガー酸化酵素により触媒されるC-C結合の切断がイソフラノナフトキノン環形成の鍵反応であることを示した (図2B)。

また、genome miningを利用して新規PKSの探索を試みた。Streptomyces antibiotic regulatory protein (SARP)ファミリー転写制御因子を網羅的に強発現し、野生株との代謝比較により新規な二次代謝産物を探索した。その結果、ポリエン部位を持つアミド、ishigamideを単離同定した。さらに、この化合

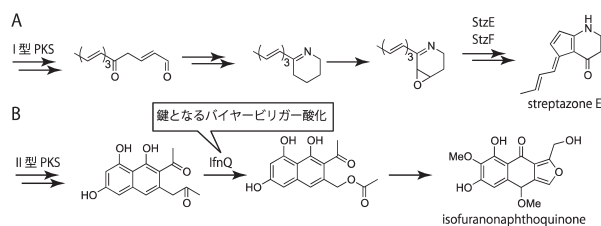


図2. Streptazone E (A) と isofuranonaphthoquinone の生合成経路

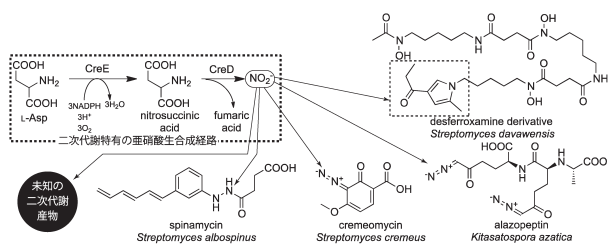


図3. 新たに見出された亜硝酸生成経路とそれにより生成されると考えられる二次代謝産物の例。

物の生合成に関わる酵素群を *in vitro* において解析した。その結果、ishigamide のポリエン部位は複数還元を触媒する新規な II 型 PKS により合成されることを示した。II 型 PKS は、ポリケタイド鎖の還元をほとんど触媒せず、芳香族化合物の生合成を担うことが知られている。そのため、この II 型 PKS をもとに高還元型 II 型 PKS という新たなサブファミリーを提唱した。

また、希少放線菌 *Actinoplanes* の II 型 PKS の機能解析を行った結果、この PKS が 3 つの fogacin 類を生合成することを示した。このうち 1 つはポリケタイド鎖の β 位がアルキル化された構造を持っていた。II 型 PKS により合成されるポリケタイドの β 位のアルキル化は、これまで知られておらず、本研究も II 型 PKS 機能の多様性の拡張に貢献するものである。

3. 二次代謝産物生合成に特有の亜硝酸生成経路の発見とその機能解析

いくつか放線菌はジアゾ基を持つ二次代謝産物を生合成することが知られている。しかし、ジアゾ基の生合成機構はこれまで不明であった。そこで、*Streptomyces cremeus* の生産するジアゾ基を持つ二次代謝産物、cremeomycin の生合成機構を解析することでジアゾ基生合成機構の解明を目指した。その結果、ジアゾ基の遠位の窒素は CreE (アスパラギン酸を酸化しニトロコハク酸を合成する) と CreD (ニトロコハク酸から亜硝酸の脱離を触媒する) と名付けた 2 つの酵素によりアスパラギン酸から合成される亜硝酸由来であることが示された (図 3)。この亜硝酸生成経路は土壌における窒素循環の経路と異なり二次代謝産物を生産するために独自に放線菌が獲得したものであると考えた。実際この亜硝酸生成経路遺伝子 (*creE*, *creD* のホモログ) は数百種の放線菌のゲノム上において、二次代謝産物生合成関連遺伝子の近傍に存在した。また、これらのうちいくつかの機能解析を試みたところ、それらはいずれも *in vitro* で亜硝酸を合成した。遺伝子破壊等を用いた実験から、spinamycin (*Streptomyces albospinus*) と desferrioxamine 誘導体 (*Streptomyces davawensis*)、alazopeptin (*Kitasatospora azatica*) の生合成にこの亜硝酸生成経路が用いられていることが強く示唆された。また、CreD 及びそのフマル酸との複合体の構造を X 線結晶構造解析により明らかにし、亜硝酸の脱離を促すために Arg が一般酸触媒として働いていることを示した。

4. その他の二次代謝産物に関する機能解析

Benzastatin 類はアミノ安息香酸とゲラニル二リン酸より生合成される化合物であり、インドリン環、キノリン環などの骨格を持つものが報告されている。本研究ではこれらの生合成機構の解析に取り組み、インドリン環、キノリン環合成において新規な環構造形成機構を明らかにした。この環形成には BezJ と BezG による *N*-アセトキシ基の形成、そして特異な cytochrome P450 (BezE) が触媒するニトレン形成とニトレンの二重結合への転移及び OH-または Cl-の求核付加を介して起こると考えられる。ニトレン転移を触媒する cytochrome P450 は自然界から見出されていないため、BezE は極めて興味深い酵素である。また、希少放線菌 *Actinoplanes* 由来のインドールとテルペン融合化合物、3-hydroxy-6-dimethylallylindolin-2-one 生合成機構を解析しプレニルトランスフェラーゼとトリプトファンナーゼが共同してプレニルインドールを合成することを示した。

おわりに

放線菌の生産する様々な二次代謝産物生合成研究に取り組み、これまで未知であった二次代謝産物の生合成機構を多数明らかにすることに成功した。また、それと同時に、過去に報告のない反応を触媒する酵素も複数同定することができた。遺伝子組換え技術の進歩に伴い、有益な化合物を生産する微生物を人工的に構築することで既知の微生物では作れない、あるいは作ることが難しい化合物の微生物生産が可能になりつつある。このような方法論は今後も発展を続け、将来的には現在製造を石油に依存している燃料・化成品をバイオ生産プロセスへと置き換えることを可能にすると期待される。本研究で発見された生合成システムはこのような合成生物学を利用したものづくりの有用なツールとなることが期待される。そのため、放線菌の持つ多様な物質生産能力を理解することは、基礎研究、応用面においても重要となるであろう。

謝辞 本研究は主に東京大学大学院農学生命科学研究科醱酵学研究室で行われたものです。学部時代から博士課程まで、ご指導をいただき、東京大学教授 故堀之内末治先生に厚く御礼を申し上げます。東京大学教授 大西康夫先生には醱酵学研究室に教員と着任してからも様々な場面でご助言とご指導を賜りました。厚く御礼を申し上げます。ドイツ留学時代は Saarland 大学、Rolf Müller 博士のもとで研究に励ませていただきました。感謝を申し上げます。本研究の多くは産業総合研究所 新家一男先生、X 線結晶構造解析に関しては高エネルギー加速器研究機構の千田俊哉先生との共同研究により行われました。両先生及びご協力を賜りました多くの共同研究者のみなさまに心より御礼申し上げます。また、本研究は醱酵学研究室に在籍した多くの学生と研究員の努力の賜物であり、あらためて感謝の意を表明します。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦してくださった日本農芸化学会関東支部長 東京大学教授 浅見忠男先生に感謝を申し上げます。