



天然化合物代謝に関わるユニークな酵素の発見と機能の解明

筑波大学生命環境系, 微生物サステナビリティ研究センター 熊野 匠人

はじめに

この度は名誉ある農芸化学会奨励賞をいただき誠にありがとうございます。これまでに私が行った研究について発表させていただく機会をいただきましたので、本発表で代表的な研究について紹介させていただきます。

1. 芳香族基質プレニル基転移酵素に関する研究

1-1. 寛容な基質特異性をもつプレニル基転移酵素

イソプレノイド由来のプレニル基が付加したプレニル化合物は天然から多数単離されており、ビールの生産に使用するホップやミツバチの巣から得られるプロポリス中にも多く含まれ、抗菌活性や抗腫瘍活性などの生理活性が知られる。しかし、天然の存在量は少なく十分に利用されているとは言えない。本研究では、放線菌が生産するテルペノイドとポリケタイドが融合したメロテルペノイドと呼ばれる化合物群(図1A)の生合成において鍵ステップであるポリケタイドにテルペノイドを付加する反応を触媒するプレニル基転移酵素を利用し、ナリンゲニン等のフラボノイドや、レスベラトロール等のスチルベンを酵素的にプレニル化することに成功した(図1B)¹⁾。

1-2. フラキノシン生合成に関する研究

フラキノシンは放線菌 *Streptomyces* sp. KO-3988 株が生産する抗腫瘍物質で、ナフトキノン骨格にゲラニルニリン酸(GPP)由来のテルペノイドが付加した化合物である(図1A)。その生合成遺伝子クラスター中には Fur7 というプレニル基転移酵素が存在したが、基質が不明であった。私は、*fur7* 遺伝子破壊株を作成し、その培養液に酵素 Fur7 を添加し、添加前

後の培養液上清を高速液体クロマトグラフィーで比較し、減少する化合物(基質)と増加する化合物(産物)を同定した²⁾。これにより、フラキノシン生合成の一部を解明することができた(図1C)。

2. リベロマイシン生合成に関する研究

リベロマイシンは放線菌 *Streptomyces reveromyceticus* 由来のI型ポリケタイド化合物で、破骨細胞選択的にアポトーシスを誘導し、骨粗鬆症治療薬等への応用が期待される化合物である。I型ポリケタイド化合物においてポストポリケタイド合成反応はポリケタイド化合物の構造多様性を創出する重要な段階であり、リベロマイシンの場合はプロピオニル側鎖の切断、スピロアセタール環の形成、サクシニル基の付加が予想されていた。本研究では、リベロマイシン側鎖の切断機構解明、およびスピロアセタール環形成反応の経時的解析を試みた(図1D)³⁾。ポリケタイド化合物の生合成を解明することは、生合成経路改変による多様な類縁化合物を合成する上で重要な知見となる可能性がある。

3. 微生物による天然化合物代謝に関する研究

3-1. 新規セサミン代謝酵素の発見

セサミンはヒトなど哺乳類では肝臓のCYP450酵素で代謝され抗酸化活性を示すことや、腸内細菌によって哺乳類リグナンといわれる化合物群に代謝されることが知られている一方で、ゴマ植物などから環境中に供給された場合、微生物によってどのように代謝され分解されるのかということとは不明であった。

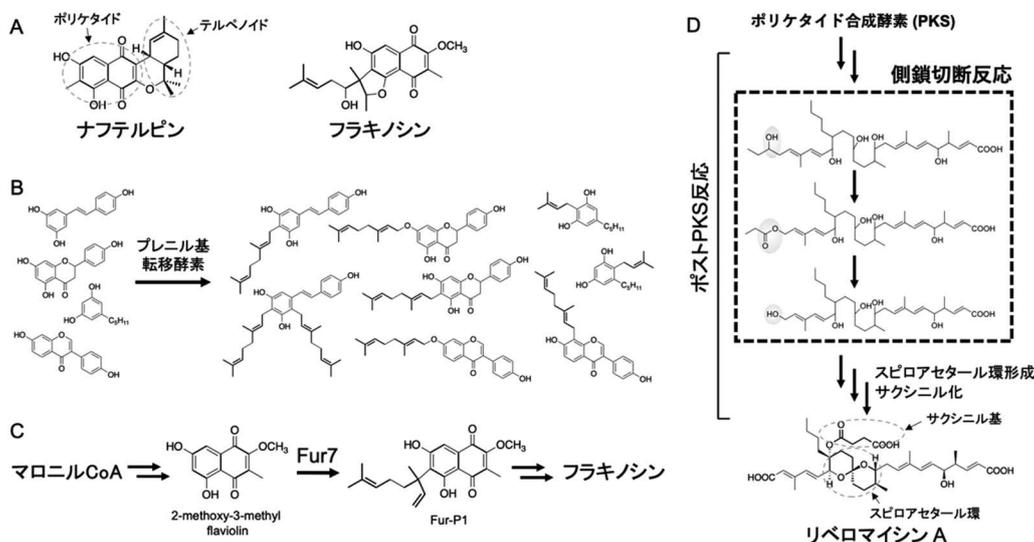


図1. 芳香族基質プレニルトランスフェラーゼおよびリベロマイシン生合成に関する研究

A メロテルペノイドの構造, B プレニル化合物の酵素合成, C フラキノシン生合成経路, D リベロマイシン生合成経路

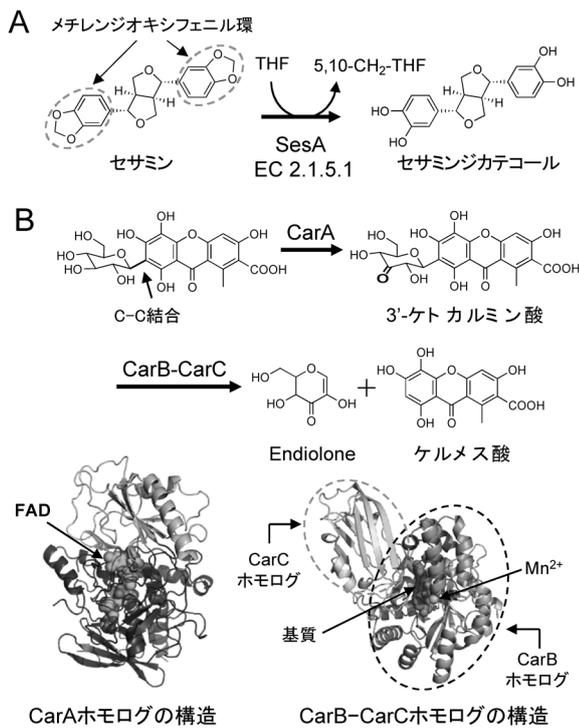


図2. セサミンおよびカルミン酸代謝に関する研究
A セサミン代謝酵素, B カルミン酸代謝酵素

そこで、本研究ではゴマ栽培土壌からの微生物スクリーニングによりセサミン資化細菌を取得し、セサミン代謝経路の初発酵素として、セサミンのメチレンジオキシフェニル環のメチレン基をテトラヒドロ葉酸 (THF) に転移させる新規酵素を同定することができた (図2A)⁴⁾。本酵素は THF にメチレン基を転移する初めての酵素であったため、新規酵素 (EC 2.1.5.1) として認定された。

3-2. 自然界における C-配糖体代謝酵素の発見

C-配糖体は糖の炭素がアグリコン (配糖体の糖以外の部分) に直接 C-C 結合した化合物である。一般的な配糖体である O-配糖体は加水分解によって分解されるのに対し、C-配糖体の分解酵素は研究開始当初は同定されていなかった (図2B)。そこで、カルミン酸という、食品、医薬品、化粧品の赤色色素として広く使用されている C-配糖体に着目し、スクリーニングにより土壌からカルミン酸資化細菌 5-2b 株を取得することに成功した。5-2b 株はカルミン酸の糖を 2 段階の反応で脱離した。さらに、本反応を詳細に解析した結果、1 段階目は FAD 依存性の糖酸化酵素 (C-配糖体の糖の 3 位を酸化する新規オキシダーゼ)、2 段階目はヘテロダイマーを形成し、既知の酵素ファミリーとは相同性を示さない新規酵素であることが判明し、前者の酵素を CarA、後者の C-C 結合切断酵素を CarB-CarC と名付けた^{5,6)}。また、データベース検索の結果、各々のホモログ酵素が多様な微生物に存在することを見出し、そのうち CarA ホモログ 2 種、CarB-CarC ホモログ 3 種について遺伝子クローニングし機能解析も行った。さらに、CarA、CarB-CarC ホモログのそれぞれ 1 種において結晶構造解析も行い詳

細な反応機構を提唱することができた。本研究により、CarA、CarB-CarC による糖切断反応が、自然環境中において C-配糖体代謝を担っている可能性を明らかにした。

おわりに

天然に存在する様々な化合物の生合成、分解経路を解明することは、新規酵素や新規代謝産物の発見・応用につながることも新たな生理活性物質の発見も期待される。さらに、セサミン等の植物が生産する二次代謝産物を微生物が代謝するという現象は、生物間の化合物を介した相互作用の一種であると考えられる。将来的には二次代謝産物の生態系における役割を解明したいと考えている。

(引用文献)

- 1) Kumano, T., Richard, S.B., Noel, J.P., Nishiyama, M. & Kuzuyama, T., Chemoenzymatic syntheses of prenylated aromatic small molecules using *Streptomyces* prenyltransferases with relaxed substrate specificities. *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 8117 (2008)
- 2) Kumano, T., Tomita, T., Nishiyama, M. & Kuzuyama, T., Functional characterization of the promiscuous prenyltransferase responsible for furquinocin biosynthesis: Identification of a physiological polyketide substrate and its prenylated reaction products. *J. Biol. Chem.*, **285**, 39663 (2010)
- 3) Takahashi, S., Toyoda, A., Sekiyama, Y., Takagi, H., Nogawa, T., Uramoto, M., Suzuki, R., Koshino, H., Kumano, T., Panthee, S., Dairi, T., Ishikawa, J., Ikeda, H., Sakaki, Y. & Osada, H., Reveromycin A biosynthesis uses RevG and RevJ for stereospecific spiroacetal formation. *Nat. Chem. Biol.*, **7**, 461 (2011)
- 4) Kumano, T., Fujiki, E., Hashimoto, Y. & Kobayashi, M., Discovery of a sesamin-metabolizing microorganism and a new enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 9087 (2016)
- 5) Kumano, T., Hori, S., Watanabe, S., Terashita, Y., Yu, H. Y., Hashimoto, Y., Senda, T., Senda, M. & Kobayashi, M. FAD-dependent C-glycoside-metabolizing enzymes in microorganisms: Screening, characterization and crystal structure analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2106580118 (2021)
- 6) Mori, T., Kumano, T., He, H., Watanabe, S., Senda, M., Moriya, T., Adachi, N., Hori, S., Terashita, Y., Kawasaki, M., Hashimoto, Y., Awakawa, T., Senda, T., Abe, I. & Kobayashi, M. C-Glycoside metabolism in the gut and in nature: Identification, characterization, structural analyses and distribution of C-C bond-cleaving enzymes. *Nat. Commun.*, **12**, 6294 (2021) [*equal contributed]

謝辞 ここに示した研究成果だけでなく、これまで研究を進めてこられたのは、多くの先生、学生のおかげです。その中で、卒論からお世話になり、研究の楽しさを教えていただきました東京大学大学院農学生命科学研究科の葛山智久先生、西山真先生、ポスドクとして受け入れてくださりご指導いただきました理化学研究所の長田裕之先生、高橋俊二先生、精力的に研究を進められておられる中で助教として迎えていただきました筑波大学生命環境系の小林達彦先生、橋本義輝先生には特に感謝申し上げます。今後もより多くの方々と研究を共に進めていくことを願っております。