



東北大学大学院薬学研究科 尾崎 太郎

## 酸化酵素を中心とした生物活性天然物の構造多様性創出機構に関する研究

## はじめに

糸状菌や放線菌等の微生物が生産する天然物は、医農薬資源として重要な化合物群である。天然物の魅力は生物活性の源となる化学構造の多様性にあり、それを生み出す生合成機構の解明は重要な研究課題である。各生合成酵素の機能を明らかにできれば、酵素反応を利用した物質生産への展開も期待できる。例えば、異種宿主で生合成酵素群を発現して生合成経路を再構築することで複雑な天然物を供給することも可能となる。筆者は、生物が複雑で多様な化学構造の天然物を如何にして作り出すかという点に興味を持ち、微生物が生産する生物活性天然物を対象として研究を行ってきた。特に、基本骨格が構築された後の生合成経路終盤で機能し、転位や環化を伴う反応によって天然物に特有の化学構造を構築する酸化酵素など、化学的に興味深い反応を触媒する生合成酵素に着目して研究を進めてきた。以下に成果の概要を紹介する。

## 1. 麹菌異種発現系を用いた天然物生産法の効率化

筆者らは、麹菌を宿主として様々な糸状菌由来天然物の生合成経路を解析してきた。物質生産能に優れた麹菌を宿主とすることで、生合成中間体や最終産物を単離しながら、生合成経路を明らかにすることが可能となる。一方で、従来の発現法では高生産株を得るためには多数の形質転換体をスクリーニングする必要があり、この点が研究の律速段階となっていた。筆者らは過去の研究で高収量を与えた麹菌形質転換体のゲノム解析から外来遺伝子の挿入位置を同定し(図1A)、これらの位置(Hot spot (HS) と名付けた)にゲノム編集技術CRISPR/Cas9を利用して遺伝子を導入するHS-ノックイン法を提案した(図1B)。非同源末端結合に関わる *ligD* 遺伝子が欠損した麹菌 NSPID1 株に本法を適用することで、擬陽性クローンがほぼ出現せず、上述のようなスクリーニングを必要としない形質転換を可能とした。

## 2. 担子菌由来天然物の生合成研究

担子菌は、いわゆるキノコとして知られる糸状菌を含む一群であり、生物活性天然物の生産者としても知られている(図1C)。近年、多くの担子菌ゲノムが解析され、遺伝子情報を指標として生物活性天然物を探索することも可能になりつつある。大腸菌や酵母などの汎用宿主を用いて生合成酵素を機能解析する際には、各遺伝子に存在するイントロンを除く必要がある。しかし、cDNA を調製して標的遺伝子を増幅する場合、培養条件で転写されている遺伝子しか対象とすることができない。また、Augustus等の予測ツールを用いた遺伝子構造の予測も完全とは言えないため、解析対象には制限があった。

筆者らは、pleuromutilin 生合成遺伝子や担子菌のゲノム上に見出した合計30種のセスキテルペン合成酵素遺伝子を麹菌内で発現して解析することで、担子菌由来の生合成遺伝子で

あっても、多くの場合麹菌内で適切にスプライシングされることを見出した。既知遺伝子構造との比較や予測ツールの併用により一部の残存したイントロンの位置についても論理的に推定可能であり、その部分に修正を加えることで生成物を同定することができた。

さらに、*Hericium erinaceus* (ヤマブシタケ) が生産する神経成長因子生合成促進物質 erinacine に着目し、麹菌内で生合成経路を段階的に再構築することで、その生合成経路を解明した。Erinacine の生合成遺伝子クラスター (BGC) には、機能未知の酸化還元酵素が多数存在し、シトクロム P450 還元酵素の機能を相補するものなど当初予期しない機能を示すものもあったが、それらの機能解析には HS-ノックイン法が特に有効であった。最終的に、天然物として知られる erinacine Q を麹菌で異種生産することに成功した。

以上の結果から、麹菌が担子菌由来生物活性天然物の異種生産や生合成酵素の機能解析における優れた宿主になることを示すことができた。

## 3. 天然物の生合成における特異な酸化酵素の解析

生物活性天然物の生合成では、ポリケチド合成酵素やテルペン合成酵素などにより基本骨格が構築された後、酸化をはじめとする様々な修飾を受けることで生物活性を持つ天然物が作られる。シトクロム P450 (P450) や非ヘム鉄 (II)・ $\alpha$  ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ ( $\alpha$ KGD) 等の酸化酵素は、基質の不活性な  $sp^3$  炭素を酸化することができる。酸化には水酸化やエポキシ化などの基本的な反応に加えて、骨格の転位や環化を伴う反応が知られており、これらは生物活性天然物に特有のユニークな化学構造を生成するうえで重要である。

筆者らはインドールジテルペン的一种・lolutrem B の生合成

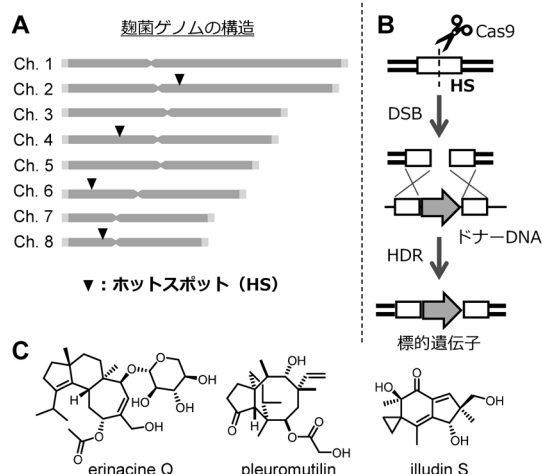


図1. 麹菌ゲノム上のHSの位置(A)とHS-ノックイン法の概要(B)及び担子菌由来天然物の例(C)

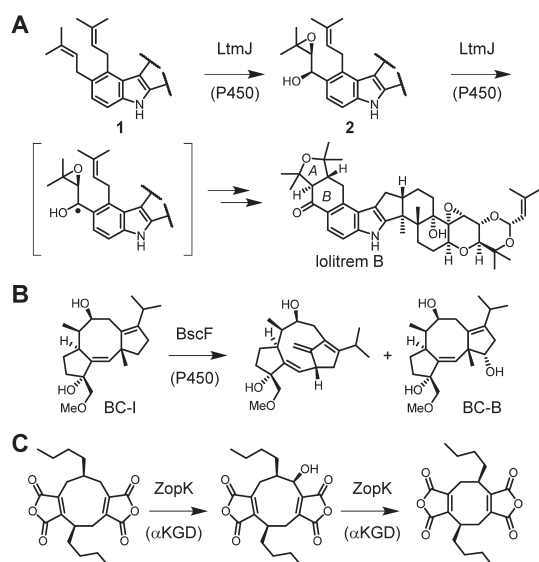


図2. P450が触媒する酸化の環化反応 (A) や酸化の骨格転位 (B) 及び  $\alpha$ KGDによる環縮小反応 (C)

に着目し、本化合物に特徴的な5/6縮環構造 (AB環) が単一の酵素LtmJ (P450) による3回の連続的な酸化によって構築されることを明らかにした (図2A)。この反応では、中間体1のインドール環に置換したプレニル基が2回の酸化によってエポキシアルコール2へと変換された後、さらに酸化的に環化することで最終産物であるlolitrem Bへと変換される。有機化学的にも興味深い本反応について、共同研究者のご支援で量子化学計算やモデル反応を用いて検証し、詳細な反応機構を提唱した。この他にも、ジテルペン化合物brassicene (BC) の生合成において未解明であった骨格転位に関わるP450 (図2B) や酸無水物二量体の環縮小反応を触媒する $\alpha$ KGD (図2C) をはじめとして、生物活性天然物の生合成に関わる様々な酸化酵素を同定し、その機能を明らかにした。

#### 4. ペプチドの修飾に関わる新規酸化酵素群の機能解析

近年、糸状菌由来のリボソーム翻訳型ペプチドであるustiloxin Bの生合成において、機能未知酵素ドメインDUF3328のみからなる2種の蛋白質UstYa/Ybが酸化のエーテル環化に関わることを報告された。UstYaホモログは糸状菌に特異的に分布しており、新規の酸化酵素群だと考えられる。筆者らは、phomopsin Aやcyclochlorotine等のBGCにP450等の典型的な酸化酵素遺伝子ではなくUstYaホモログが共通して存在することに着目し、これらが各生合成経路におけるペプチドの修飾酵素であると推測して研究を行った。

Phomopsin Aはustiloxin Bの構造類似体であり、両化合物に共通する13員環エーテルに加えて、複数のデヒドロアミノ酸を有する点が構造上の特徴である。生産菌の遺伝子破壊実験により、BGCに存在する5種のUstYaホモログ (*phomYa-Ye*) のうち、*phomYc/Yd/Ye*がそれぞれイソロイシン・アスパラギン酸・プロリン残基側鎖の不飽和化に関わることを示した (図3A)。また、非リボソームペプチドcyclochlorotineの生合成において、UstYaホモログが不活性な $sp^3$ 炭素の水酸化・ハロゲン化や分子内アシル基転移に関わることを明らかにした (図3B)。以上の結果は、UstYaホモログが代表的な酸化酵素

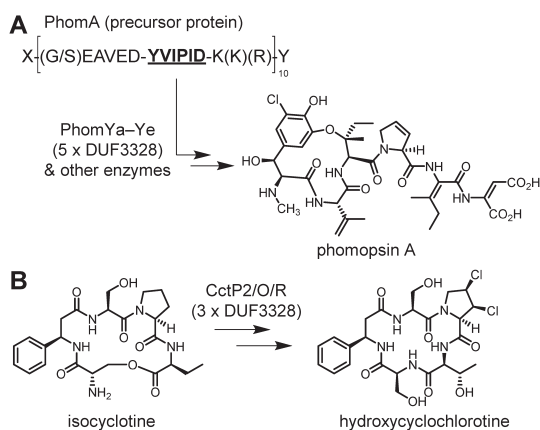


図3. UstYaホモログ (DUF3328) が関わる糸状菌由来ペプチド系天然物の生合成

であるP450に匹敵する機能多様性を持つことを示している。さらに、麹菌異種発現系によるcyclochlorotine生合成経路の再構築を検討し、UstYaホモログの機能発現にBGC中に存在するトランスポーター遺伝子の共発現が必要であることを見出した。これは、生合成中間体の細胞内輸送が重要であることを示唆しており、今後関連の生合成系を利用するうえで重要な指針になると考えられる。

#### おわりに

天然物生合成における酸化酵素の機能に焦点をあてて研究を行い、環化や転位により骨格を改変する酸化酵素を同定し、その機能を解析した。また、P450や $\alpha$ KGD等良く知られた酸化酵素とは異なるタイプと考えられるUstYaホモログが、ペプチド系天然物の生合成において様々な反応に関わることを示した。これらの成果から、生物活性天然物の構造多様性を生み出す新たな戦略を明らかにすることができたと考えている。また、発現系の改良による研究の効率化と合わせ、酵素触媒を用いた天然物合成のポテンシャルを示した。今後は同定した酵素群の反応機構や生合成中間体の細胞内輸送なども包括的に解析し、生体内の物質変換過程や天然物の構造多様化戦略の全容に迫っていきたい。

謝辞 本研究は北海道大学大学院理学研究院化学部門有機反応論研究室で行われたものです。研究の機会をいただき、終始ご指導ご鞭撻を賜りました及川英秋先生に心より御礼申し上げます。研究遂行にあたり日々多くのご助言を賜りました同研究室・南篤志先生、ともに研究に取り組んでいただいた研究室メンバーに心より感謝申し上げます。また、本研究成果の多くは、共同研究者の方のご協力により達成されました。多大なるご支援をいただいた共同研究者の皆様へ深く感謝申し上げます。学生時代の恩師であり、研究を基礎からご指導いただいた東京大学・西山真先生、同大学・葛山智久先生、東京大学微生物潜在機能探索寄附講座に特任助教として在籍した時よりご指導を賜りました尾仲安康先生に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北海道支部長・松浦英幸先生に深謝致します。