

## 論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻

平成 25 年度 博士課程進学

氏 名 橋本 拓哉

指導教員名 西山 真

論文題目 放線菌の生産する中分子ポリケタイドの生合成マシナリーに関する研究

放線菌は、Waksman による Streptomycin の発見以来、有用な二次代謝産物のスクリーニング源として用いられており、免疫抑制剤の Rapamycin や抗寄生虫薬の Avermectin をはじめ多くの臨床薬が放線菌から単離されている。これらのような薬剤のリード化合物となり得る二次代謝産物の特徴的な分子骨格形成は、放線菌の持つ多彩な酵素反応が組み合わせられて形成される。つまり放線菌の二次代謝産物生合成経路は、ユニークな反応を行う酵素遺伝子や代謝経路の宝庫と見ることができる。本研究では、放線菌が生産する中分子ポリケタイド、Versipelostatin (VST) と Bafilomycin (BFM) に注目した。両者はポリケタイド合成酵素による基本骨格形成の後、未解明の興味深い修飾反応を受けてより高い生物活性を示す分子へ変換されることが予想されたため、これらの生物活性発現に重要な修飾反応に関与するユニークな酵素の機能解明を目指した。

### 1. VST の生合成研究

VST はがん細胞特異的に発現する分子シャペロン GRP78 の発現誘導を選択的に阻害する化合物として *Streptomyces versipellis* 4083-SVS6 株から単離された。その構造はスピロ炭素を介して連結したテトロン酸構造とシクロヘキセン環、および C-C 結合のみから成る大環状骨格に特徴づけられ、類似の骨格を持つ化合物群が多数放線菌より単離されている。これらは総称してスピロテトロン酸化合物と呼ばれ、生合成過程で分子内 Diels-Alder 様の [4+2] 環化付加反応により大環状構造が形成されると推定されている。しかし 6 つの類縁化合物の生合成遺伝子クラスターが報告されたが、本反応を触媒する酵素は同定されていなかった。そこで VST の生合成マシナリーを同定し、詳細に生化学的解析を行うことで VST の生合成機構とポリケタイドの大環状機構の解明を目指した。

#### 1-1. VST の生合成遺伝子クラスターの同定

VST 生合成遺伝子クラスター領域の推定のため、4083-SVS6 株のドラフトゲノムシーケンスデータを精査し、ポリケタイド生合成遺伝子を中心として 108 kb にわたる推定 VST 生

合成遺伝子クラスター領域を見出した。次に、BAC ベクターを用いて構築した 4083-SVS6 株のゲノムライブラリーを作製し、VST 生合成遺伝子クラスターの全長を含む BAC クローンを取得し *S. albus* J1074 株染色体へ導入した。形質転換体の培養抽出物を LC/MS により分析したところ VST が検出されたことから、この BAC クローンに VST 生合成遺伝子クラスターの全長が含まれていることが判明した。

### 1-2. VST の糖鎖部位の生合成に関与する糖転移酵素 *vstH* と *vstI* の同定

VST の側鎖構造は  $\beta$ -D-digitoxose-(1,4)- $\alpha$ -L-oleandrose-(1,4)- $\beta$ -D-digitoxose という 2 種の糖が交互に連なった 3 糖構造から成り、この糖鎖構造の存在が生物活性の発現に必須である。まず糖鎖構造を形成する糖転移酵素について解析を行った。遺伝子クラスターには 2 つの糖転移酵素遺伝子 *vstH* と *vstI* が含まれた。*S. albus* の異種発現株を親株にそれぞれの遺伝子破壊株を作製し、それぞれの形質転換体の培養液を LC/MS で解析した。その結果、各遺伝子破壊株では VST の生産は失われたが、両者を共培養することで VST の生産は回復した。さらに、*vstI* 遺伝子破壊株からは VST アグリコンを得た。*vstH* 遺伝子破壊株からは VST アグリコンに D-digitoxose が付加した VST G およびその 37-deoxy 体である VST H を得た。これらの結果から VST の側鎖糖構造は、まず *vstI* によって VST アグリコンへ D-digitoxose が転移されて VST G が形成し、次いで *vstH* によって VST G に L-olivose が転移された後、メチル基転移酵素である *vstB6* にメチル化されて L-oleandrose へ変換され、再度 *vstI* によって D-digitoxose が転移されることで側鎖構造が形成することが強く示唆された。

### 1-3. [4+2] 環化付加反応を担う遺伝子 *vstJ* の発見と機能解析

次に分子内 [4+2] 環化付加反応を触媒する酵素の探索のため、VST を含む既知のスピロテトロン酸化合物の生合成遺伝子クラスターを比較して解析した。その結果、目的酵素遺伝子の候補として 429 bp の機能未知遺伝子 *vstJ* を見出した。VstJ のアミノ酸配列は既知のタンパク質と有意な相同性を示さなかったが、生合成遺伝子クラスターに保存されたホモログ間で 30 %程度の相同性を示した。そこで、VstJ の機能解析のため、*S. albus* の異種発現株を親株に *vstJ* の遺伝子破壊株を作製した。LC による培養抽出物の分析の結果、遺伝子破壊株では VST の生産は失われ、代わりに共役ジエンと末端オレフィンを含む生合成中間体 **2** が蓄積した。次に、精製した **2** と VstJ の組換え酵素を用いて *in vitro* 反応を行った結果、新たな反応産物 **3** が得られた。**3** はスピロテトロン酸骨格が完成した 37-deoxy-VST アグリコンであることが判明した。一方で、非酵素的な **2** の環化付加反応は観察されないこと、VstJ による反応はミカエリス・メンテン式に従うことから、VstJ が [4+2] 環化付加反応を触媒する酵素であることが示された。また、**2** の NOESY 測定からは、**2** の共役ジエンは *s-trans* と *s-cis* の平衡状態にあることが示された。さらに、**2** の分子動力学シミュレーションからは、**2** は極めてフレキシブルな分子であり自発的な共役ジエンと末端オレフィンの接近は困難なことが示唆された。以上の考察から、VstJ は、フレキシブルな **2** の *s-cis* 体とのみ結合

し、共役二重結合と末端オレフィンとを近づけることで、酵素非存在下では起こり得ない分子内 [4+2] 環化付加反応を触媒する新奇酵素であると結論した。

## 2. VstJ ホモログ Abycyc の結晶構造解析と VstJ の活性に重要な残基の探索

VstJ が触媒するフレキシブルな **2** の [4+2] 環化付加反応に関する構造生物学的知見を得るため、VstJ、および abyssomicin 生合成遺伝子クラスターに見出した VstJ ホモログである Abycyc の結晶構造解析に取り組んだ。Abycyc およびその Se-Met 置換体について結晶が得られ、Native タンパク質については 2.35 Å、Se-Met 置換体については 3.20 Å の分解能の回折データを取得した。しかし、SAD 法による位相決定ができなかったため、構造決定には至らず、現在より良い結晶化条件のスクリーニングを行っている。

そこで次に *in silico* での VstJ の構造予測を行った。リモートホモログに相当する Allene oxide cyclase (AOC) (PDB ID: 4H69) を鋳型に VstJ の構造モデルを取得した。VstJ のモデル構造は AOC と類似した 8 枚の逆並行  $\beta$ -sheet からなる  $\beta$  バレル構造であった。次に、モデル構造と **3** の最安定配座を用いてドッキングシミュレーションを行った。その結果、[4+2] 環化付加反応によって形成する **3** のスピロテロン酸部位は、バレル内部の疎水的なポケットの奥へと挿入される向きで結合することが示唆され、触媒作用にポケット最奥の Glu8 残基の関与が示唆された。次に、ホモログ間で保存されているアミノ酸残基、および Glu8 の周辺残基の Ala 置換体を作製し比活性を測定した。その結果、Glu8 の Ala 置換体では活性の低下は観測されなかった。一方で、E45A、I50A、V58A、L59A、Q71A、K115A については比活性が約 50%以下となることが示され、これらのアミノ酸残基が VstJ の活性発現に重要であることが示唆された。

## 3. BFM 生合成におけるフマル酸エステルを形成する酵素の解析

BFM は液胞型 ATPase の阻害試薬として広く用いられる天然化合物である。基本骨格の BFM A のエステル化反応によって、フマル酸エステル構造を持つ BFM C へと変換されることで生物活性が向上する。これまでに当研究室で行われた遺伝子破壊実験の結果から、本反応には BfmI と BfmJ の 2 つの酵素の関与が示されていたが、各酵素の単独の機能については明らかになっていなかった。そこで、組換え酵素を用いて各酵素の機能解析を行った。その結果、BfmI と BfmJ、BFM A、フマル酸、ATP、 $Mg^{2+}$ を加えた条件で、BFM C へのエステル化反応が進行することが示された。さらに BfmJ 単独反応の結果、fumaryl-AMP に水分子が Michael 付加した 3''-hydroxy-succinyl-AMP (**7**) が単離できた。しかし、**7** は BfmI の基質として受け入れられなかった。また、BfmI と BfmJ の大腸菌での共発現系によるプルダウンアッセイにより、BfmI と BfmJ が相互作用しヘテロ複合体として機能すること、相互作用には BfmJ の N 末端側が関与することが示唆された。これらのことから BfmJ によってフマル酸が ATP による活性化を受けて fumaryl-AMP へ変換された後、BfmI-J 複合体を介して BfmI へと受け渡され、BfmI によって BFM A がフマル化されることが強く示唆された。

## 総括

VST と BFM の中分子ポリケタイドの活性発現に重要な修飾反応について解析し、活性発現機構の一端を示した。VST については 108 kb の VST 生合成遺伝子クラスターの異種発現に成功し、糖鎖生合成機構について明らかにした。さらに[4+2] 環化付加反応を触媒する酵素 VstJ については、類縁化合物 Chlorothricin と Pyrroindomycin の生合成においても VstJ ホモログが[4+2] 環化付加反応を触媒することが報告され (Liu, W., *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2015)、本反応がスピロテロン酸化合物生合成における共通の鍵反応であることが示された。本研究は、この報告に先駆けて VstJ を同定し、酵素非存在下では起こらない 16 結合離れた共役ジエンと末端オレフィンを近づけて [4+2] 環化付加反応を触媒するユニークな生合成マシナリーをはじめ明らかにした。BfmI と BfmJ については、両者が複合体を形成することで不安定な fumaryl-AMP を受け渡し、フマル化反応を触媒していると結論した。

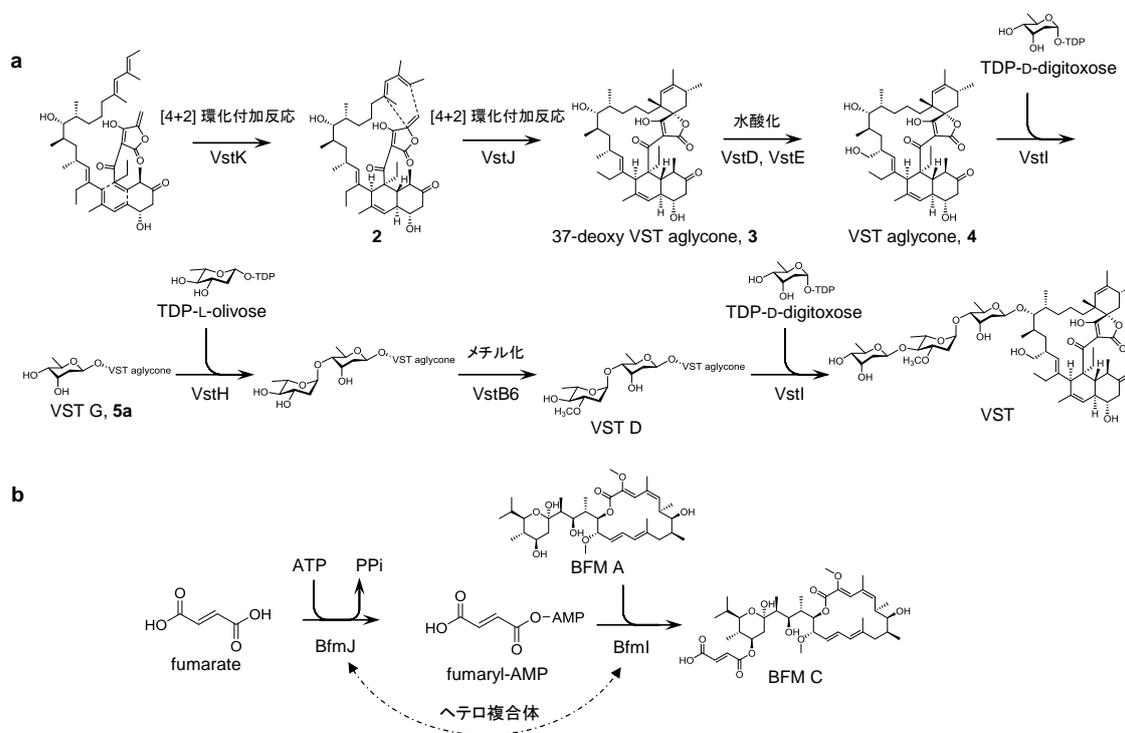


図 VST と BFM の生合成機構

a. PKS による骨格形成の後の VST の生合成機構 b. BfmI と BfmJ による BFMA から BFMC への変換反応。

## 発表論文

Hashimoto, T., *et al.* Biosynthesis of versipelostatin: Identification of an enzyme-catalyzed [4+2]-cycloaddition required for macrocyclization of spirotetronate-containing polyketides *J. Am. Chem. Soc.* 137: 572 (2015).