

論文の内容の要旨

論文題目 複雑骨格天然物のモジュール型生合成マシナリーの機能解析と再設計

氏名 張 驪騏

【序論】

ポリケタイド化合物は多くの生理活性物質を含み、医薬品資源として重要な化合物群である。天然においてポリケタイドは微生物や植物から生合成され、炭素数 2 の酢酸単位がポリケタイド合成酵素 (polyketide synthase; PKS) の触媒する重合反応により伸長することで、その骨格が形成される。中でも放線菌からは、エバメクチンや FK506 など数多くの医薬品が単離されており、これらはモジュール型 PKS により生合成される。

モジュール型 PKS は異なる触媒機能を有するドメインが一つのポリペプチド鎖上に多数連なった、巨大複合体酵素である。その生合成過程では各ドメインを順番に経路することで炭素鎖が伸長されるため、酵素のドメイン構造と産生化合物の化学構造が一对一对応するという大きな特徴を持つ。このことから、酵素のドメイン構造を並び替えることで、目的化合物を産生する生合成マシナリーを自由に設計できることが期待されたが、モジュール型 PKS を組み替えることによる効率的な物質生産は未だ達成されていない。とりわけ、ポリケタイド骨格の大半を占める伸長基質の改変は困難とされており、その方法論を確立することは生合成工学を考える上で大きな意義を持つ。PKS の伸長基質は原則的にはマロニル CoA またはメチルマロニル CoA しか用いられないが、興味深いことに、本研究室ではこれまでに antimycin の生合成において(図1)様々なアルキルマロニル CoA が PKS の伸長基質に用いられることを報告している¹⁾。

本研究ではアンチマイシン生合成経路において PKS の伸長基質に多様性が生じる生合成メカニズムの解明とその生合成工学への応用を試みた。また、モジュール型 PKS の組み替えによる新規化合物創生を可能とする理論的知見を得ることを目指し、PKS 遺伝子の自然界での組替えメカニズムの解析を行った。

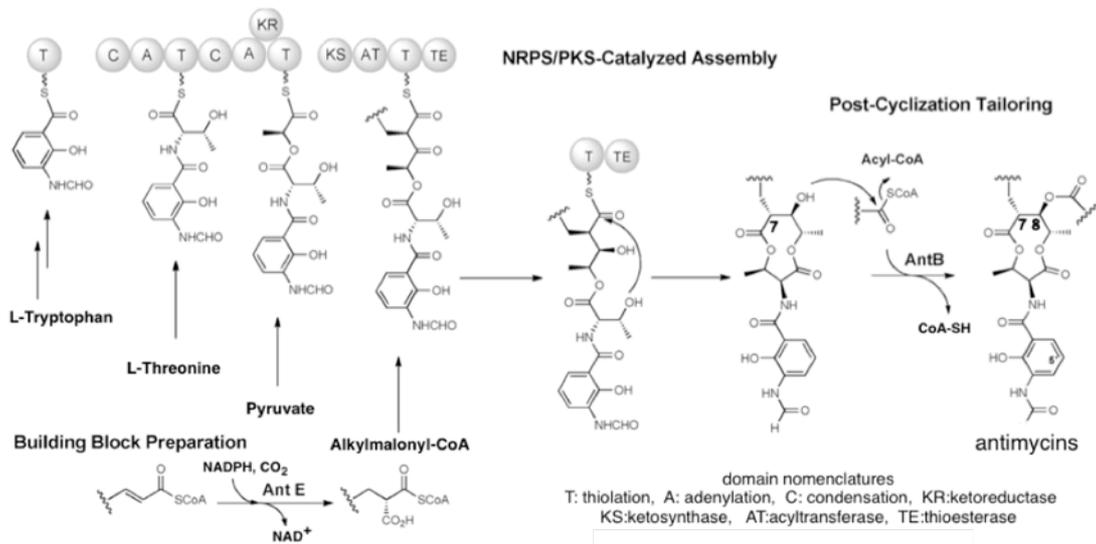


図 1: antimycin の生合成経路

【本論】

1. 多様な伸長基質の供給を可能とするクロトニル CoA 炭酸化酵素 AntE の構造機能解析

Antimycin の生合成では様々な伸長基質が PKS に取り込まれることで C7 位の炭素骨格に多様性を生み

出しているが、始めにこれら伸長基質の供給を担う鍵酵素 AntE に着目し、その機能解析を行った。AntE はクロロニル CoA 炭酸化酵素(CCR)に属し、 α,β -不飽和 CoA 基質の α 位への還元的炭酸化を触媒する酵素である(図 1 左下)。まず、AntE を大腸菌を用いて発現精製した後、結晶化を行い、X 線構造解析を行った結果、分解能 2.1 Å にて結晶構造を取得した²⁾。基質

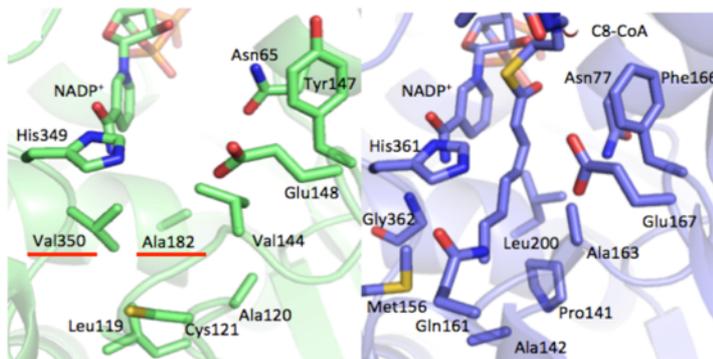


図 2: AntE(左; with NADP⁺)と CinF(右; with NADP⁺ and C8-CoA)の活性中心比較

の結合キャビティを構成するアミノ酸を既知のCCR酵素 CinF³⁾と比較した結果 NADP⁺や CO₂の結合部位の残基はよく保存されている一方で、1) Ala182により広いキャビティが確保されている、2) Val350 がキャビティの大きさを制限していることが判明した(図 2)。これらのアミノ酸の触媒機能への影響を調べるため各種変異体を作成し *in vitro* 機能解析を行ったところ、1) Ala182Leu 変異体ではクロロニル CoA のみを受け入れ、 α 位の炭酸化が進行する一方、2) Ala182Gly 変異体では炭酸化能が消失し還元反応を触媒する、3) Val350Gly 変異体は野生型酵素では受け入れられないフェノールやトリプトファン置換型基質を含む種々の基質の炭酸化を触媒する、ことが判明した。

以上の結果は、AntE の基質認識の分子基盤を明らかとするものであり、寛容な基質特異性が Ala182 により担保されている一方で、Val350 への変異導入によりさらなる触媒能の獲得に成功した。また Ala182Gly 変異体で反応選択性が変化した理由としては Ala 側鎖の立体障害が無くなることにより活性中心へ水分子が侵入し、二酸化炭素への求核付加反応を阻害することが示唆された。

続いて、機能改変した AntE 変異体を用い新規アンチマイシン類縁体の創出を試みた。antimycin 産生株である *Streptomyces* NRRL2288 $\Delta antB$ 株を元に *antE* 欠損株($\Delta antB\Delta antE$ 株)を作成、これに対し AntE^{A182L}または AntE^{V350G}を導入した株を得た(それぞれ A182L 株または V350G 株とする)。発酵生産を行い代謝産物を LC-MS を用い検出した結果、A182L 株ではエチル基側鎖を持つ antimycin 類縁体が選択的に産生し、V350G 株ではヘキシル基やイソバレリル基側鎖を持つ類縁体の収量が増加し、3-メチルペンチル基を側鎖に有する新規類縁体の産生が確認された。さらに AntE^{V350G} の拡張された触媒能を利用すべく、一次代謝により供給されない、芳香環を有する α,β -不飽和酸の培地添加を行いその取り込みを分析した。その結果、*p*-クマル酸やインドールアクリロイル酸は取り込まれなかったものの、桂皮酸やチエニルアクリロイル酸、*p*-メチル桂皮酸の投与においては、これらの置換芳香環やヘテロ環基質も受け入れ、それらを含む炭素骨格を有する新規アンチマイシンの生合成生産に成功した。

本結果は伸長基質の供給経路のエンジニアリングによりポリケタイドの構造多様性が生まれることを示すものであり、芳香環を含む伸長基質の人為的導入(図 3)に成功した初めての例となった。また、同時に antimycin の PKS も基質特異性が寛容であることが示された。

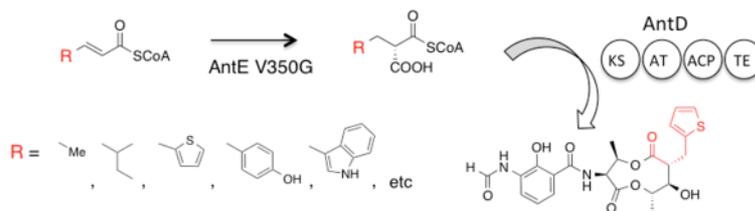


図 3: 伸長基質合成反応の拡張による新規アンチマイシン産生

2. モジュール型 PKS の配列解析

アンチマイシンの PKS は基質特異性が寛容であるために AntE 由来の非天然型伸長基質を取り込むことができたが、任意の PKS において非天然基質の自由自在な導入を達成するためにはモジュール型 PKS 自体のリプログラミングが不可欠である。しかし、これらの酵素は巨大複合体酵素であり、その機能改変は容易ではない。これまでに本研究室ではアミノポリオール化合物 *mediomycin* の遺伝子クラスター同定に成功しており、その PKS は 27 ものモジュールから構成されている。アミノポリオール化合物は他にも数種類報告例(図 4)があり、いずれも巨大なモジュール型 PKS から合成されることが予想されたため、自然界が如何にモジュール型酵素を進化させ構造多様性を生み出したかのメカニズムを解明すべく、PKS 遺伝子の系統解析を試みた。

始めに *tetrafabricin* 産生株よりゲノム配列情報を次世代シーケンサーを用いて解析し、PKS 遺伝子配列を取得した。これまでに PKS 遺伝子が報告されている ECO-02301 と合わせて PKS のアミノ酸配列を用いて系統樹解析を行った結果、遺伝子重複や欠損、組替えにより構造多様性が生まれていることが明らかとなった。また、組替えが起こる配列箇所を *acyltransferase* ドメインの後方に同定し、*ketosynthase* ドメインは常に上流のドメインとセットになり組替えが起こることが示唆された。本結果は、PKS が自然界でどのように遺伝子変異を起こし進化したかを詳細に解明するものであり、これらの遺伝子組換えメカニズムを応用した PKS リプログラミングに応用可能である。

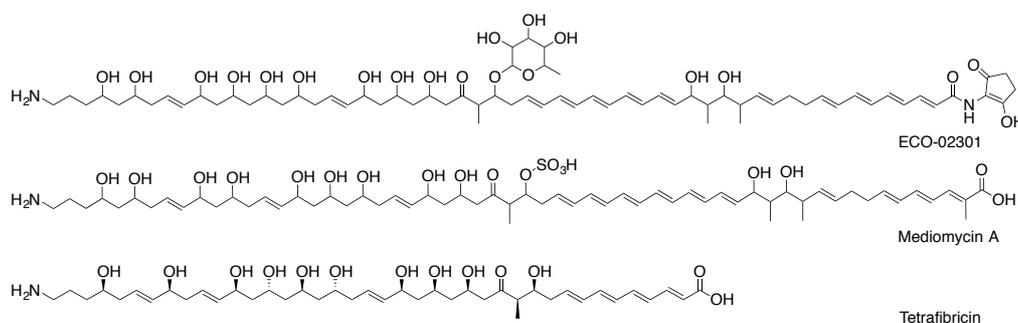


図 4: アミノポリオール化合物の構造

【総括】

本研究では *antimycin* の伸長基質供給酵素 AntE の構造解析を行い、触媒機構の理解とリデザインにより *antimycin* 生合成マシナリーの人為的な機能拡張を達成した。また、ポリケタイド化合物が自然界でどのように分子多様性を獲得したかについて、遺伝子レベルでその進化メカニズムを明らかにすることができた。ポリケタイドは構造多様性に富んだ化合物群であるが、特に伸長基質の生合成の構成単位は限られている。本結果は PKS への非天然伸長基質の供給を可能とするものであり、また PKS 自体の自由自在なリプログラミングに向けた、理論的な基盤を与えるものである。マロニル CoA 以外の多様な構成単位を、PKS の任意のモジュールに組み込むことができればポリケタイドの構造多様性を一層、飛躍的に高められることが予想され、生合成工学による新規物質創出に貢献できることが期待される。

【参考文献】

- 1) Yan, Y.; Zhang, L.; Ito, T.; Qu, X.; Asakawa, Y.; Awakawa, T.; Abe, I.; Liu, W. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 4142; Yan Y., Chen, J., Zhang, L., Zheng, Q., Han, Y., Zhang, H., Awakawa, T., Abe, I., Liu, W., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, 12308–12312.
- 2) Zhang, L., Chen, J., Mori, T., Yan, Y., Liu, W., Abe, I., *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **2014**, *70*, 734–737.
- 3) Quade, N.; Huo, L.; Rachid, S.; Heinz, D.; Muller, R. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 117.