

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成27年度 博士課程進学
氏名 小林 正弥
指導教員名 西山 真

論文題目

放線菌の生産するプレニルインドール化合物の生合成機構に関する研究

プレニルインドール化合物は、テルペン骨格および L-トリプトファンに由来するインドール環から構成される天然化合物であり、分子内に窒素原子を含み塩基性を示すアルカロイドの一種である。アルカロイド系の化合物群は骨格構造および生物活性の多様性に富むことから、創薬に向けた重要な化合物資源となっている。そのような医薬品リード化合物の生合成機構を解明することで、アルカロイドの構造多様性を生み出す多彩な二次代謝経路や酵素反応の理解につながり、また得られた知見を基に新規分子骨格の構築や生物活性の創出に寄与することが期待される。放線菌の生産するプレニルインドール化合物 carquinostatin A (CQS) および lavanduquinocin (LVQ) は、特徴的な 6-5-6 員環構造からなるカルバゾールを基本骨格とし、オルトキノンおよびテルペン骨格から構成されている。カルバゾールを有する天然物は、これまでに真核生物や一部の細菌において発見されているものの、その生合成機構や生合成遺伝子に関する知見は限られている。本研究では CQS および LVQ に着目し、カルバゾール骨格の形成をはじめとして、オルトキノン生成やテルペン骨格の合成・転移反応などの未解明の興味深い生合成マシナリーの全容解明を目指した。

1. Carquinostatin A の生合成研究

Streptomyces sp. CS79 株の生産する CQS、および *Streptomyces* sp. FGK858 株の生産する LVQ は神経系ハイブリドーマである N18-RE-105 細胞に対するグルタミン酸毒性阻害活性を指標としたスクリーニングにより見出された神経細胞保護活性を有する抗酸化物質である。両化合物はテルペン骨格 (プレニル基) が異なっており、CQS はジメチルアシル基が、LVQ はシクロラバンデュリル基がカルバゾール骨格に付加した構造を有する。

標識前駆体を用いた過去のトレーサー実験の結果から、CQS のカルバゾール環の炭素骨格は L-トリプトファン、ピルビン酸、2 分子の酢酸に由来することが示唆されていた。そこで CQS 生合成の初期段階に L-トリプトファンとピルビン酸が脱炭酸を伴って縮合すると仮定し、その反応を触媒すると考えられるチアミン依存型酵素について、CS79 株および FGK858 株のドラフトゲノムデータから候補遺伝子を探索した。その結果、チアミン依存型酵素を含み、かつ両菌株にのみ共通に存在する特徴的な遺伝子クラスターを見出した。次

に、コスミドベクターを用いて同遺伝子クラスターの全長 (7.8 kb) を含む領域を CS79 株からクローニングし、*Streptomyces lividans* TK23 株に導入して異種発現を試みた結果、CQS の生産が確認できた。さらに CQS 生合成遺伝子クラスターの最小単位を検討したところ、8 つの遺伝子領域 (*cqsB1*~*B8*) を導入した形質転換体においても CQS が生産されたことから、*cqsB1*~*B8* に CQS 生合成に関わる遺伝子が含まれていることが判明した。この結果および LVQ がシクロラバンデュリル基を有していることを踏まえ、FGK858 株から見出した 10.9 kb の類似の遺伝子クラスター (*lvqB1*~*B9*) が、LVQ の生合成に関与すると推測した。

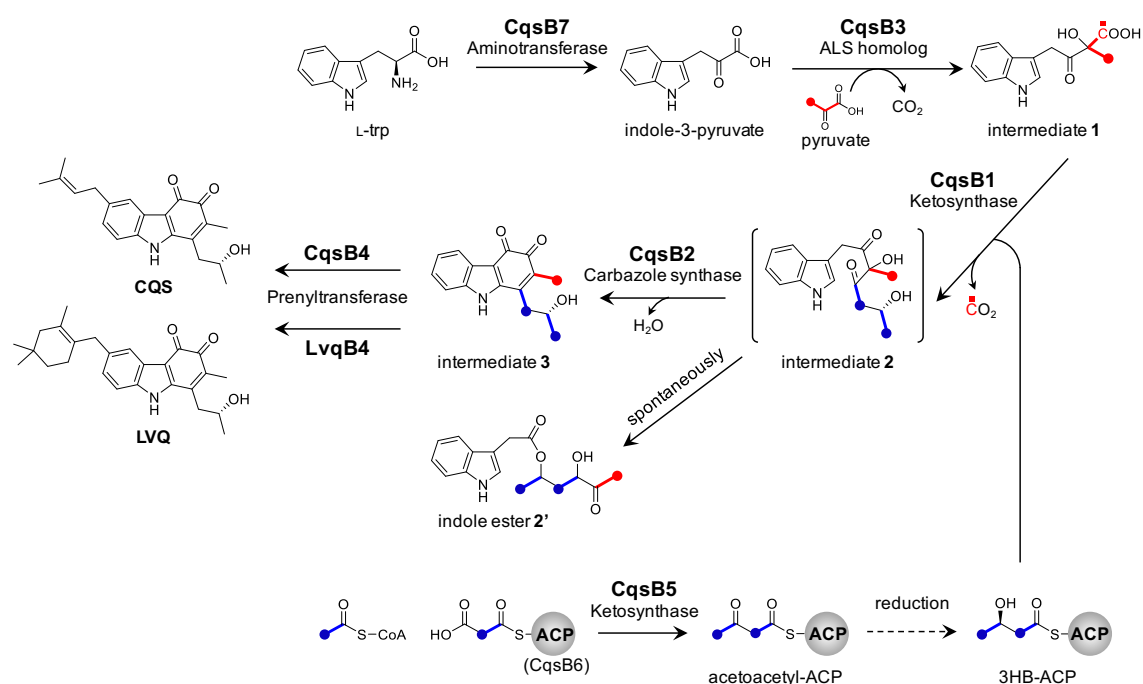


図 CQS と LVQ の生合成機構

2. プレニル基の転移および供給に関わる酵素の機能解析

CQS および LVQ の有するプレニル基は、化合物の細胞内への浸潤性を高めることから生物活性の発現に重要な構造であると考えられている。CQS 生合成遺伝子クラスターから既知のプレニル基転移酵素は見出されなかった一方で、CqsB4 はスクアレン合成酵素と、CqsB8 は 1 型イソペンテニルジリン酸異性化酵素との相同性をそれぞれ示した。両酵素はそれぞれプレニル基の転移あるいは合成反応に関与すると推測し、それらの機能を明らかにするため遺伝子破壊株の解析を行った。*cqsB4* 破壊株の培養抽出物を分析した結果、CQS のプレニル基が欠損したカルバゾール生合成中間体 **3** が生成することが判明した。そこで、**3** および DMAPP を基質として CqsB4 の *in vitro* 反応を行った結果、反応産物として CQS の生成が確認できた。以上の結果から、CqsB4 はカルバゾール骨格へのプレニル基の付加を触媒する新規カルバゾールプレニル基転移酵素であり、また CQS 生合成経路の最終段階の反

応を担うことが明らかとなった。一方で、*cqsB8* 破壊株の培養抽出物については CQS の生産量が減少し、かつ **3** の蓄積が確認できたことから、CqsB8 はプレニル基の基質である DMAPP の供給に関与していると考えられる。

3. カルバゾール環合成酵素 CqsB2 の発見と機能解析

カルバゾール骨格生合成の初期段階ではインドールピルビン酸とピルビン酸の縮合、およびアシル側鎖の付加が生じると考えられる。次いで、これらの炭素鎖を骨格として閉環反応が進み、6-5-6 員環構造が形成されると予想した。そこで炭素-炭素結合形成および環化反応に関与すると推定したケトアシル ACP 合成酵素ホモログ CqsB1、Polyketide ARO/CYC ドメイン様 CqsB2、チアミン依存アセト乳酸合成酵素ホモログ CqsB3 に着目し、これらの組換え酵素を用いて *in vitro* 解析を実施した。その結果、インドールピルビン酸を開始基質とした CqsB1, 2, 3 の全酵素を含む反応系においてのみ、カルバゾール生合成中間体 **3** の生成を確認することができた。この結果から、カルバゾール骨格の生合成における一連の増炭反応と閉環反応を CqsB1, 2, 3 が担うことが明らかとなった。特に CqsB2 は閉環反応を触媒し、かつオルトキノンを生成する前例のないカルバゾール環合成酵素であることが判明した。

各酵素の機能解析を進めた結果、アミノ基転移酵素 CqsB7 によって L-トリプトファンから生成したインドールピルビン酸とピルビン酸の脱炭酸を伴った縮合反応を CqsB3 が触媒することが分かり、その反応産物である中間体 **1** の構造を決定した。さらに、**1** にアシル側鎖の転移を触媒すると予想した CqsB1 の反応産物の構造を解析したところ、indole ester (**2'**) を同定した。**2'** は、非酵素的な炭素-炭素結合の開裂とエステル結合の生成により、CqsB1 の本来の反応産物 (**2**) から生じたシャント化合物であると考えられる。以上の結果から、CqsB2 は不安定な生合成中間体 **2** のコンフォメーションを制御しつつ閉環反応を触媒することで、**2** の自発的なエステル生成を抑制し、カルバゾール骨格を構築すると結論づけた。

4. シクロラバンデュリルジリン酸合成酵素 CLDS の結晶構造解析

LVQ の有するシクロラバンデュリル基は特徴的な head-to-middle 型結合を有する環状モノテルペンである。シクロラバンデュリル骨格の合成酵素としては、*Streptomyces* sp. CL190 において同定された CLDS が唯一当研究室から報告されており、相同性検索によって LVQ 生合成遺伝子クラスター内においても CLDS ホモログ (*lvqB9*) を見出すことができた。CLDS は2分子のジメチルアリルジリン酸 (DMAPP) を基質としてシクロラバンデュリルジリン酸を生成するが、このような DMAPP 同士の縮合とその後の環化の両反応を同一酵素が触媒するテルペン合成酵素の前例はなく、その反応機構の詳細も未解明であった。

そこで CLDS の触媒機構を解明するため、本酵素の X 線結晶構造解析に取り組んだ。その結果、SeMet 置換体を用いた Se-SAD 法により、分解能 1.73 Å でリガンド結合型複合体

の、2.0 Å でアポ体の結晶構造の決定に成功した。CLDS のサブユニット構造は *cis* 型プレニルジリン酸合成酵素に共通の立体構造を示した。アポ型構造は活性中心が開いているのに対し、リガンド結合型複合体構造の活性中心は閉じており、 Mg^{2+} 、Tris、2 分子のピロリン酸の結合が確認できた。次に活性中心近傍のアミノ酸残基について変異体解析を行った結果、P8I 変異体および F173L 変異体が非環状のラバンデュリルジリン酸を生成したことから、Pro8 および Phe173 が基質の環化反応に関与することが判明した。これらのアミノ酸残基は、CLDS の活性中心に存在する疎水性ポケットの一部を構成しており、2 分子の DMAPP のジメチルアリル基同士の接触を促すように機能していると考えられる。

さらに CLDS の反応機構の詳細を明らかにするため、4 位および 5 位メチル基のすべての水素原子を重水素原子に置換したラベル化 DMAPP を用いて CLDS の反応産物の標識パターンを解析した結果、分子内 1,5-プロトン転移を介した環化機構が示唆された。以上の変異体解析とラベル実験の結果から、CLDS の触媒する環化反応には Pro8 および Phe173 による基質の配置の制御が重要であり、基質同士の接近が分子内プロトン転位反応を開始させ、引き続き環化反応を促進すると結論づけた。

総括

本研究では、CQS および LVQ の生合成マシナリーの解明に取り組むことにより、放線菌における前例のないカルバゾール環およびテルペン骨格形成の分子機構を明らかにした。CQS に関しては生合成遺伝子クラスターの異種発現に成功し、さらにカルバゾール骨格形成の鍵反応である閉環反応とオルトキノンの生成を触媒するカルバゾール環合成酵素 CqsB2 を同定することができた。また CqsB4 および LvqB4 が、スクアレン合成酵素との相同性を示す新規カルバゾールプレニル基転移酵素であることを示すことができた。さらに LVQ の有するシクロラバンデュリル基については、CLDS の結晶構造解析によって詳細な合成機構を明らかにした。炭素数 10 個の環状モノテルペンの環化機構に分子内プロトン転位が関与する酵素としては CLDS が最初の例であり、さらにテルペノイド生合成における分子内プロトン転移が生じるメカニズムに関しても、はじめて知見を得ることができた。本研究により、自然界におけるアルカロイドやテルペノイドの生合成機構の多様性の一端を示すことができたと同時に、新たな生物活性物質の創出に向けた生合成経路あるいは酵素の改良・設計への貢献が期待できると考えている。

発表論文

Tomita, T.,* Kobayashi, M.,* Karita, Y., Yasuno, Y., Shinada, T., Nishiyama, M., Kuzuyama, T. Structure and Mechanism of the Monoterpene Cyclolavandulyl Diphosphate Synthase that Catalyzes Consecutive Condensation and Cyclization. *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**: 14913 (2017). (*Contributed equally)