

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 工藤 慧
指導教員名 西山 真

論文題目

天然化合物の構造多様性を生み出す特異な官能基導入機構に関する研究

天然化合物は構造多様性と生物活性の多様性の両観点から合成化合物ライブラリーの多様性と一線を画しており、多剤耐性菌の出現が大きな問題となっている現代において、天然物化学の重要性は増している。その中で生合成研究は、生合成酵素の触媒する興味深い化学反応を明らかにするとともに、新たな骨格の天然化合物を獲得するための手段を提供する分野として発展してきた。本研究では天然化合物が有する特異な官能基に着目して、その生合成機構の解明と応用展開の可能性について探求した。

第一章 HDAC 阻害剤 trichostatin A の生合成^[1]

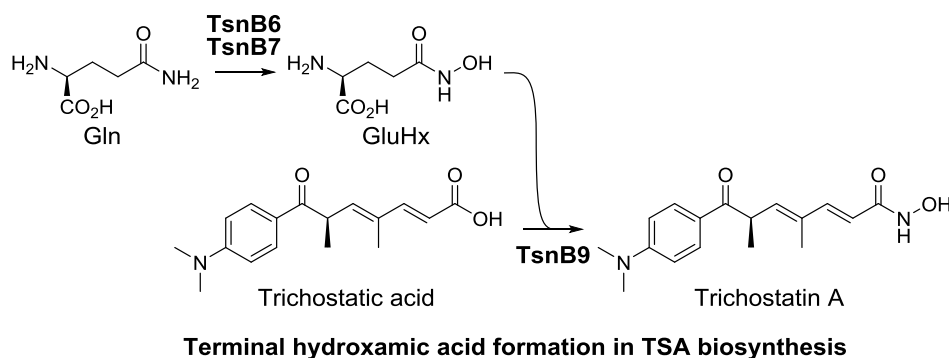
Trichostatin A (TSA)は当初抗真菌活性物質として報告された放線菌が生産するヒドロキサム酸基含有化合物である。後にヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC)の強力な阻害剤であることが報告されて以来、エビジェネティクスの研究試薬として長く利用されてきており、また HDAC との共結晶構造から作用機序も明らかにされている。さらに構造類似体である化学合成品 vorinostat は抗がん剤として認可されている。このように TSA は基礎研究から臨床応用まで幅広く利用されているにもかかわらず、生合成に関する知見がなかった。そこで TSA を生産する放線菌 *Streptomyces* sp. RM72 株を材料に、生合成遺伝子を探索し生合成経路の全容解明を目指した。

初めに RM72 株のゲノム解析から TSA 生合成遺伝子クラスターを推定した。コスミドを用いた推定生合成遺伝子クラスターのクローニングと、TSA を生産しない異種放線菌における異種発現によって、計 14 遺伝子からなる TSA 生合成遺伝子クラスターを同定した。また異種発現株の TSA の生産量は RM72 株の約 17 倍であり、異種発現が物質生産に有効な手段であることを示すことができた。

次いで TSA の炭素骨格の形成に関わる I 型ポリケチド合成酵素 (PKS)の機能解析に取り組んだ。通常の I 型 PKS とは異なり、TSA の I 型 PKS は開始基質の導入部に AT ドメインや KS^Q ドメインを欠くことが配列情報解析から示唆されたため、天然化合物では珍しい *N,N*-ジメチル-*p*-アミノ安息香酸部位の導入に特徴的な仕組みが介在していると考えた。組換えタンパク質を用いた *in vitro* 再構成実験により、CoA リガーゼホモログの TsnB12 が *in-trans* に機能することで、PKS の N 末端 ACP ドメインへの開始基質 *p*-アミノ安息香酸 (PABA)の導入を担うことが示された。さらにメチル

基転移酵素 TsnB8 は ACP にロードされた PABA を特異的に認識してメチル化反応を触媒することを示し、TSA の生合成に関与する I 型 PKS のユニークなプライミング機構を明らかにすることができた。

続いて I 型 PKS によって生合成される中間体 trichostatic acid (TS acid) から、最終産物 TSA に至るヒドロキサム酸基の形成過程について解析した。Fosmidomycin や desferrioxamine 類では、一級アミンの水酸化とそれに続くアシル化によって、修飾されたペプチド結合の形でヒドロキサム酸基が生合成されることが知られている。しかしながら TSA や actinonin のような末端ヒドロキサム酸基の生合成はそのような経路では説明できない。そこでまず微生物変換実験により、TS acid から TSA までの変換には 3 つの遺伝子 *tsnB6*、*tsnB7*、*tsnB9* が必要なことを示した。次いで組換えタンパク質を用いた *in vitro* 実験の結果、TsnB7 が TsnB6 の共存下で Gln の一級アミドを酸化してヒドロキサム酸含有化合物 glutamic acid γ -monohydroxamate (GluHx) を生成することを示した。一般にアミド結合中の窒素原子は求核性が極めて弱いため、TsnB6 と TsnB7 の詳細な触媒機構に興味もたれる。さらに TsnB9 が触媒するヒドロキサム酸基の転移反応によって GluHx と TS acid から TSA が生成することを明らかにした。GluHx はこれまで生体反応における生理的基質としては知られていなかった新規な非タンパク質性アミノ酸であり、末端ヒドロキサム酸基の生合成に特有の中間体であることが示唆された。

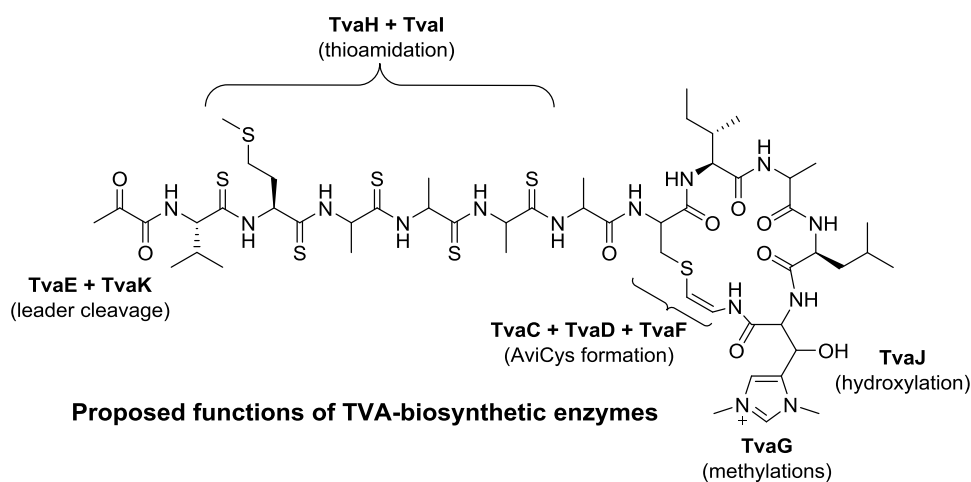


第二章 チオアミド含有化合物の生合成と多様性拡張

アミド結合はタンパク質を構成する最も基本的な化学結合の一つである。一方、アミド結合の酸素原子が硫黄原子に置き換わったチオアミド結合は、報告例が少ないながらも天然化合物中にも見出される構造である。チオアミド結合はアミド結合と比べて生物活性の向上や、薬物動態の向上が期待されるため、薬剤開発においても注目すべき官能基の一つといえる。天然チオアミド化合物の例としては、thiouridine や ergothioneine といった生理的機能が調べられているものの他に、thioviridamide (TVA) や thiopeptin、closthioamide といった二次代謝産物が知られているが、その例は少なく、天然チオアミド化合物の生合成機構に関してはほとんど明らかになっていない。

TVA は既に生合成遺伝子クラスターが報告されている RiPPs (ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides) であるが、生合成経路に関する解析は行われていなかった。そこでまず TVA 異種発現系において遺伝子破壊株を作製し、その代謝物から生合成経路を検討した。

tvaG と *tvaJ* の破壊株ではそれぞれメチル基と水酸基を欠く生合成中間体が蓄積したことから、これらの修飾反応は生合成経路の最終段階で行われることが強く示唆された。さらに大腸菌発現系を用いた *in vivo* 実験、および組換えタンパク質を用いた *in vitro* 実験の結果から、TvaC、TvaD、TvaF による脱水と脱炭酸を伴う aminovinylcysteine (AviCys) 構造の形成が TVA 生合成の初発段階であることを示した。また YcaO ホモログの TvaH と TfuA-like ホモログの TvaI によってチオアミド化反応が触媒されること、TvaE と TvaK がリーダーペプチドの切除を担うことが強く示唆された。以上により全ての TVA 生合成酵素が TVA の構造に関連付けられ、生合成経路を推定することができた。



TVA は 5 か所のチオアミドを有するユニークな構造であることから、構造活性相関にも興味もたれた。そこで TVA 生合成遺伝子クラスターとその異種発現系を利用した変異体生産にも取り組んだ。まず TVA のプレカーサーペプチドをコードする遺伝子 *tvaA* に変異を導入する手法を構築した。これを利用して 34 種類の変異株を作製し、27 株で新規骨格を有する TVA 類縁体の生産を確認した。さらにこのうち 7 株から 10 種の化合物を単離・精製し、SKOV-3、Meso-1、Jurkat 細胞を用いた細胞毒性試験に供した。その結果、(1) N 末端側から 2 番目の Met を Ile に置換すると細胞毒性が上昇すること、(2) 8 番目を His に置換、または 10 番目を Tyr に置換するといずれも細胞毒性が著しく損なわれること、を明らかにすることができ、TVA 類縁体の生物活性向上に関する指針を得ることができた。

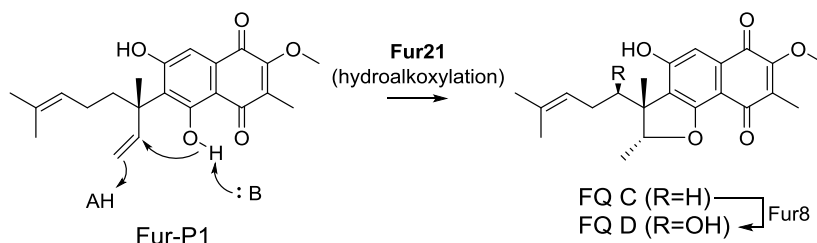
TVA の生合成研究から得られた知見を基にゲノムマイニングを試みた。チオアミド化に必須と考えられた YcaO ホモログと TfuA-like ホモログがともにコードされる遺伝子クラスターを公開データベースから探索し、*S. cattleya* DSM46488 のゲノム配列より YcaO と TfuA-like の融合タンパク質をコードする遺伝子クラスターを見出した。この遺伝子クラスターをクローニングし、異種ホストに導入することで生産される新たな化合物を確認した。本化合物は野生株では生産されない、未利用遺伝子クラスターによる新規チオアミド化合物であると推測している。

第三章 特異な環構造を有する天然化合物の生合成

天然化合物の構造多様性を生み出す特徴の一つは、環構造である。ここではメロテルペノイド

furaquinocin D (FQ D)と、pyrroloquinoline 骨格を有する ammosamide A/B (AMS A/B)の生合成について研究した。

FQ D はゲラニル基と、III 型 PKS が関与して生合成されるナフトキノン骨格が融合した三環式骨格を有する化合物である。プレニル基転移酵素が触媒するゲラニル基の転移反応によって生合成中間体 Fur-P1 が生成することが先行研究によって示されているが、Fur-P1 がジヒドロフラン環を形成して FQ C へと至る過程は未知であった。そこで FQ D 生合成遺伝子クラスター中に余剰に存在するとみられていたメチル基転移酵素ホモログ Fur21 に着目して機能解析を行った。Fur-P1 の生合成に必要な遺伝子群に加え、*fur21* を保持した株は Fur-P1 の他に FQ C を生産した。さらに Fur21 の組換えタンパク質を用いた *in vitro* 機能解析により、Fur21 が Fur-P1 を FQ C へと変換する酵素活性を確認した。Fur21 は SAM 依存性メチル基転移酵素である Fur6 と 60% もの高い配列相同性を示すにもかかわらず、SAM 非依存的に、ヒドロアルコキシ化反応を触媒する新奇な活性を有する酵素であることが明らかにできた。



AMS A/B は平面的な pyrroloquinoline 骨格と、AMS A におけるチオラクタム構造が特徴的な化合物である。AMS A/B と類似骨格を有する lymphostin の生合成遺伝子クラスターは *Salinispora* 属細菌より報告されているが、その骨格形成機構については知見がなかったため、まず AMS A/B の生合成遺伝子クラスターを同定することとした。Lymphostin の生合成に関与する *lymA*、*lymB* のホモログは AMS A/B 生産菌 *Streptomyces* sp. OPMA01663 株のゲノム配列からは見出されなかったため、トリプトファンハロゲナーゼをクエリとしてゲノムマイニングを試みた。その結果、周辺遺伝子の構成が *lymA*、*lymB* 周辺と高い保存性を示す領域を見出したので、BAC ライブラリーから当該領域を含むクローンを選抜し、異種発現により生産を確認した。さらに同定した *ams* 生合成遺伝子クラスター中 8 つの遺伝子の破壊株を作製し、AMS A/B の生産能を解析することで、AMS A/B の生合成遺伝子クラスターの同定に成功した。

総括

本研究では天然化合物の特異な官能基、骨格の形成機構に着目して、それらのユニークな生合成経路の解明を試みた。ここから得られた知見はゲノムマイニングや合成生物学的手法を通じて新規生物活性物質の獲得につながるものとして天然物化学の発展に寄与できるものと確信している。

発表論文

- [1] [Kudo, K.](#); Ozaki, T.; Shin-ya, K.; Nishiyama, M.; Kuzuyama, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (20), 6799–6802.