

# 論文の内容の要旨

## ベンゾイソクロマンキノン系抗生物質生合成における 立体特異的還元酵素の機能研究

田口 貴章

放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) の生産するアクチノロジン (actinorhodin, ACT)、*S. violaceoruber* Tü22 の生産するジヒドログラナティシン (dihydrogranaticin, DHGRA) はともにベンゾイソクロマンキノン系抗生物質(BIQ)に属する芳香族ポリケタイド化合物であるが、基本骨格の一部、ピラン環上 3 位と 15 位に着目すると、ACT は (3*S*, 15*R*) であるのに対し DHGRA は (3*R*, 15*S*) と互いに逆の立体化学である。抗生物質の立体化学は生理活性発現に大きく関与することを考えれば、両化合物の生合成における立体化学制御の解明は、生物有機化学的に有用であるばかりでなく、combinatorial biosynthesis を志向した研究にとって大きな知見となる。

両化合物の生合成において、Type II PKS によって合成されたオクタケタイド鎖が還元、閉環、芳香化を経て仮想中間体 bicyclic intermediate が生成するまでは全く同様に進行すると考えられる。次に bicyclic intermediate 3 位のケトンが立体特異的に還元され中間体 DNPA が生成するが、ACT では(*S*)-DNPA (Fig.1 3)、DHGRA では(*R*)-DNPA (4)となり、ここで 3 位の立体化学に相違が生じる。

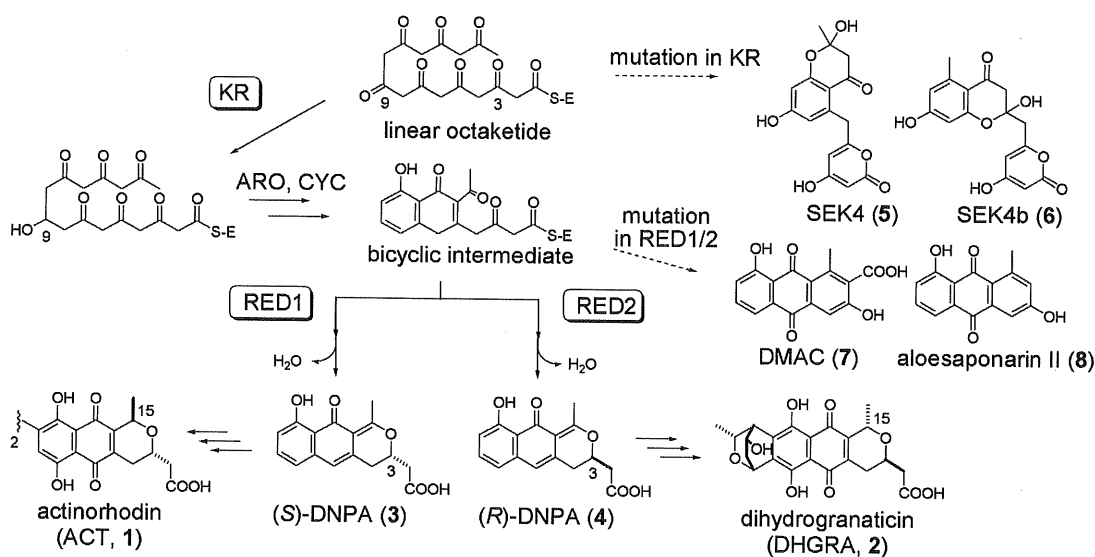


Fig.1 Proposed Biosynthetic Pathway of Act and DHGRA

ACT 生合成において 3 位の立体特異的還元に関わる遺伝子は *act* VI-ORF 1 であり (Fig.2)、立体特異的還元酵素 RED1 をコードすることを証明した[1]。一般に、同一化合物を基質とする酵素の間にはアミノ酸一次配列に有意な相同性が期待できるが、DHGRA 生合成遺伝子クラスター (the *gra* cluster) 中には *act* VI-ORF 1 の相同遺伝子は存在しなかった[2]。そこで改めて、同クラスター内から ACT と逆の立体化学制御遺伝子の探索、機能研究を行い、両立体化学の制御機構の解明を試みた。

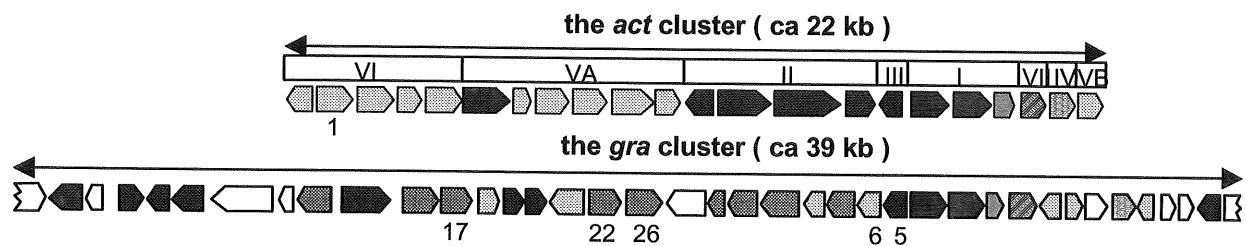


Fig.2 Biosynthetic Gene Cluster of Act and DHGRA

【1. 立体化学制御遺伝子のデータベース解析】ヌクレオチド結合部位の有無並びに相同性検索による機能推定から、*gra*-ORF 5 がポリケタイド鎖 9 位のケト還元酵素 (KR) を、*gra*-ORF 6 が 3 位の立体特異的還元酵素 (RED2) をそれぞれコードすることを推定した[3]。ACT 及び DHGRA 生合成における BIQ 骨格形成に関与するケト還元酵素遺伝子群について最新の BLAST ツールを用いた相同性比較とタンパクドメイン検索を行ったところ、*gra*-ORF 6 産物は *act* VI-ORF 1 産物とは有意な相同性を持たないこと、両者は異なるデヒドロゲナーゼファミリーに属することが改めて明らかになった (Table 1)。

Table 1. BLAST analysis of ketoreductases in this study

Gene designation	Proteins (aa)	Similarity(%) <sup>a</sup>			Putative conserved domain detected <sup>b</sup>
		<i>act</i> VI-ORF 1	<i>gra</i> -ORF 5	<i>gra</i> -ORF 6	
<i>act</i> III	261	no	79	47	short-chain alcohol dehydrogenase
<i>act</i> VI-ORF 1	307		no	no	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
<i>gra</i> -ORF 5	272			49	short-chain alcohol dehydrogenase
<i>gra</i> -ORF 6	249				short-chain alcohol dehydrogenase

a: BLAST2 SEQUENCE, b: PSI-BLAST

【2. 相補実験による機能証明】*gra*-ORF 6 の RED1/2 への関連性を検討するために相補実験を行った。RED1 をコードする *act* VI-ORF 1 の変異株では RED1 が発現しないため、bicyclic intermediate から非酵素的に環化して生じる DMAC (Fig. 1 7)、aloesaponarin II (8) が培地に蓄積される。推測通り *gra*-ORF 6 が RED2 をコードするならば、*act* VI-ORF 1 変異株に *gra*-ORF 6 を導入すると RED2 が発現し bicyclic intermediate を還元し、本来の立体化学とは異なる ACT が生産されたと考えた。この考えに基づき、形質転換用プラスミドを構築後 *act* VI-ORF 1 変異株 *S. coelicolor* B22 を形質転換し、得られた形質転換体の代謝産物を分析した。なお *gra*-ORF 6 は上流にある *gra*-ORF 5 と翻訳共役しているため、両遺伝子の共役を保ったままのプラスミドを構築した。分析結果から形質転換体は ACT 様色素を生産すること、7、8 を蓄積しないことを明らかにした[4]。これは仮説通り RED2 が発現し bicyclic intermediate を還元したことを示すものである。

【3. *in vivo* 遺伝子発現系による機能証明】ACT 生合成初期段階で必要な遺伝子である ketosynthase (KS)、chain length factor (CLF)、acyl carrier protein (ACP)、KR、aromatase (ARO)、cyclase (CYC) を有する放線菌用発現プラスミド pRM5 を、the *act* cluster 欠損株 *S. coelicolor* CH999 に導入すると ACT 生合成が bicyclic intermediate で止まり、上述の通り DMAC、aloesaponarin II を検出できる。また pRM5 に RED1 遺伝子 *act* VI-ORF 1 を加えたプラスミド pIJ5660 を CH999 に導入すると、生合成が先まで進み (S)-DNPA が生産される (Fig.1) [1]。

*gra*-ORF 6 が RED2 をコードすることを証明するためにこの系を利用した。すなわち、pRM5 に *gra*-ORF 6 を加えれば(*R*)-DNPA が生産されると考えた。*gra*-ORF 5, 6 が翻訳共役していること、*gra*-ORF 5 と *act* III が相同遺伝子と考えられることを考慮し、7種のプラスミドを構築し *S. coelicolor* CH999 に導入した(Table 2)。得られた形質転換体を液体培養しその代謝産物を HPLC で分析した結果、以下が明らかとなった。1) *gra*-ORF 5 は相同遺伝子である *act* III 同様、オクタケタイト鎖の9位を還元するケト還元酵素 KR をコードする。2) *gra*-ORF 5 と *act* III のいずれか、あるいは両方と *gra*-ORF 6 を有するプラスミドを導入すると DNPA が生産される。ただし、*gra*-ORF 5, 6 が翻訳共役している状態 (以下 *gra*-ORF 5+6 と表記) の方が *gra*-ORF 6 単独より DNPA 生産性が高い (Fig. 3A)。ここで得られた DNPA を単離・精製し、旋光度、CD を分析した結果、いずれの形質転換体がつくる DNPA も(*R*)体 4 であり (Fig. 3B)、さらに chiral column HPLC によりいずれも光学純度 100%であることを確認した (Fig. 3C) [5]。以上から、*gra*-ORF 6 が RED2 をコードしていると判断した。

Table 2. Effect of adding ketoreductases to type II PKS, ARO, CYC

Constructs	Additional genes	Products	Comments
pRM5	<i>act</i> III	7, 8	C-9 reduction to produce the bicyclic system
pIK186	<i>act</i> III, <i>gra</i> -ORF 5	7, 8	<i>gra</i> -ORF 5 and <i>act</i> III function as a reductase for C-9 (KR)
pIK187	<i>act</i> III, <i>gra</i> -ORF 6	4, 7, 8	<i>gra</i> -ORF 6 provides reduction at C-3 (RED2)
pIK188	<i>act</i> III, <i>gra</i> -ORF 5	4	same as above, more efficiently
pIK177	-	5	Loss of KR causes loss of control for the subsequent cyclization
pIK189	<i>gra</i> -ORF 5	7, 8	<i>gra</i> -ORF 5 substitutes for <i>act</i> III
pIK190	<i>gra</i> -ORF 6	5	<i>gra</i> -ORF 6 product is not a KR
pIK191	<i>gra</i> -ORF 5+6	4	<i>gra</i> -ORF 5+6 provide KR and RED2 most efficiently
pIJ5660	<i>act</i> III, <i>act</i> VI-ORI	3	<i>act</i> VI-ORF 1 encodes a dedicated reductase for C-3 (RED1)

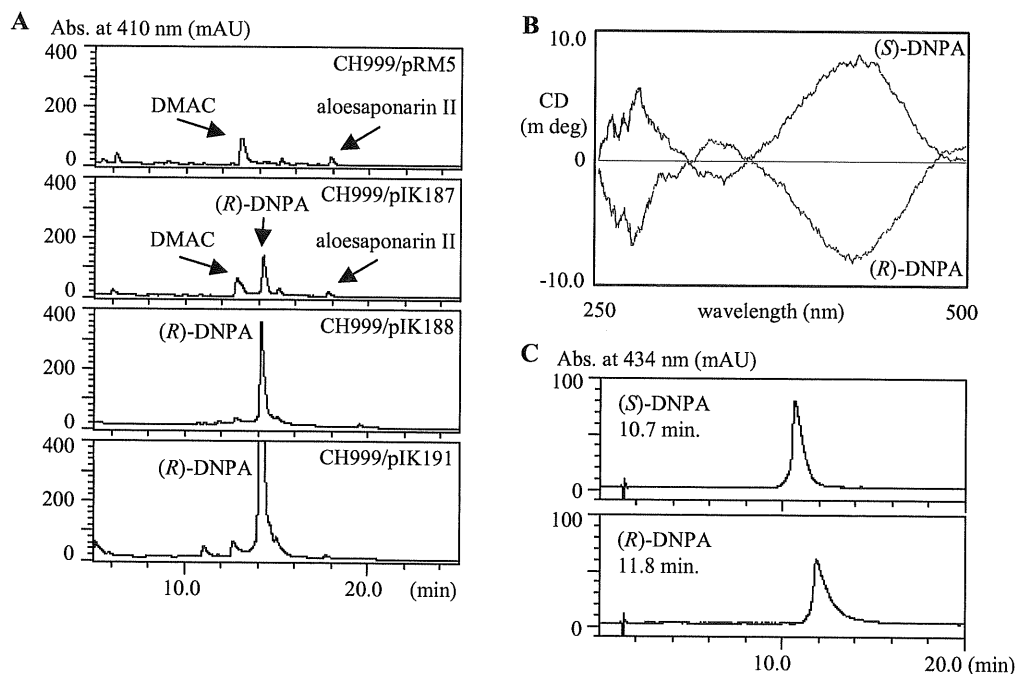
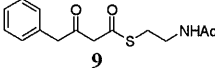
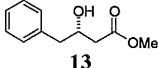
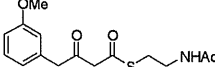
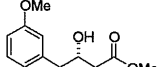
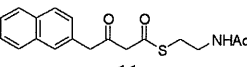
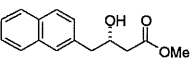
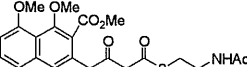
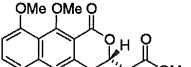


Fig. 3A: HPLC analysis of transformants, B: CD spectra of (*S*)- and (*R*)-DNPA, C: Chiral HPLC analysis

このように、*act* VI-ORF 1 のコードする RED1、*gra*-ORF 6 のコードする RED2 は、アミノ酸一次配列上有意な相同性を示さないにも関わらず、同一の化合物を基質とし、同一部位のケトン立体化学が逆になるように還元するという、二次代謝系では極めて稀で興味深い事実を示すことができた。しかしながら、*gra*-ORF 5+6 の方が *gra*-ORF 6 単独より (*R*)-DNPA 生産性が高いという事実を考慮すると、*gra*-ORF 6 のコードするタンパクが RED2 として十分な活性を持つには *gra*-ORF 5 のコードする KR が必要だという可能性が残るが、これについては個々の酵素について詳細な生化学的検討を行う必要がある。

【4. 組換え放線菌による Biotransformation】先述の(*S*)-DNPA 生産プラスミド pIJ5660 から KS を欠損させたプラスミド pIJ5675 を CH999 に導入した株 CH999/pIJ5675 は、*act* PKS による基本炭素骨格形成が行われないため ACT 生合成中間体、shunt product のいずれも生産しない。一方、本系は KS 以外の酵素群は発現するようにデザインされているので、RED1 の他、複数の構造修飾酵素の発現系として非天然型基質の酵素変換系に利用できる。単離不能な bicyclic intermediate に代わり、アナログ基質 4 種 (Table 3, 9-12) を *N*-acetylcysteamine 誘導体として合成し CH999/pIJ5675 の液体培養に供したところ、何れの基質も立体選択的に還元された[6]。特に化合物 12 は 99 % *ee* という高いエナンチオ選択性を示し、bicyclic intermediate を特異的に基質として認識していることが示唆された。

Table 3. Enantioselective reduction of NAC thioesters by the recombinant *S. coelicolor* CH999/pIJ5675

NAC substrate	Product <sup>a</sup>	Yield (%)	<i>ee</i> (%)	[ $\alpha$ ] <sub>D</sub>
		18	85	+1.2 ( <i>c</i> =0.90)
		27	74	+1.1 ( <i>c</i> =0.80)
		55	55	+1.0 ( <i>c</i> =1.77)
		42	99	-39.2 ( <i>c</i> =1.00)

この系を応用し RED2 の基質特異性を検討した。上で(*R*)-DNPA を与えた 3 種のプラスミド (Table 2) それぞれから KS 欠損プラスミドを構築し CH999 に導入後、アナログ基質 9, 11 を用いて同様の biotransformation を行ったが、RED2 からは期待できる還元生成物を検出できなかった。この結果から、両酵素は同一化合物を基質とするものの基質特異性が大きく異なることが示唆された。

【5. homology modeling 法による 3 次元構造の予測】RED1、RED2 両酵素の 3 次元構造を homology modeling 法 (FAMS) により予測した。RED1 はヒト心臓由来 L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [7] を、RED2 は真菌由来 trihydroxynaphthalene reductase [8] をそれぞれ鋳型とする 3 次元モデルを得ることができた (Fig. 4)。アミノ酸一次配列上有意な相同性を示さない RED1、RED2 両酵素は、その 3 次元構造も大きく異なると予測されるが、活性発現に重要と考えられる残基 (L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase の H158、E170、trihydroxynaphthalene reductase の S164、Y178、K182 が RED1、あるいは RED2 のそれぞれにおいてもよく保

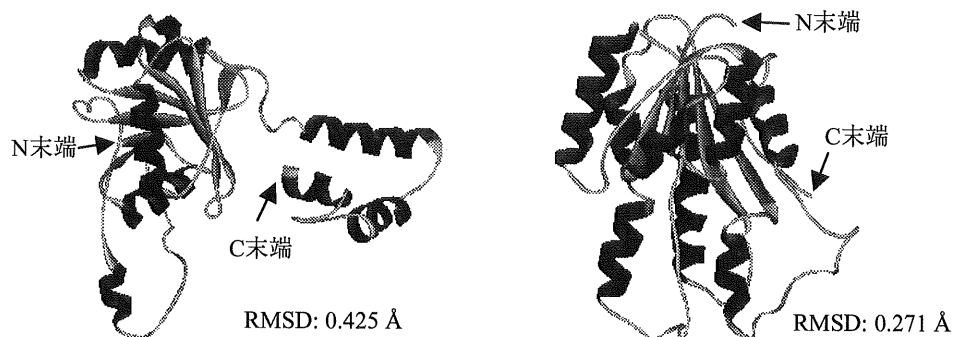


Fig. 4 3D structures of RED1 (left) and RED2 (right) based on homology modeling

存されていることが判明した。また鑄型となった2種の酵素はそれぞれダイマー構造を形成していることが報告されていることから、RED1・RED2も活性発現のため、それぞれオリゴマーを形成している可能性が考えられる。先の(R)-DNPA生産が *gra*-ORF 5+6 で高効率であったことは、*gra*-ORF 5・*gra*-ORF 6 がヘテロダイマーとして RED2 機能を有していることに由来するとも解釈でき、興味深い。

【6. 大腸菌での大量発現系の確立】両酵素の特性をより直接的に解析するため、RED1、RED2 それぞれの大腸菌で大量発現及び *in vitro* assay 系の構築を試みた。大腸菌用発現ベクターとして pRSET B (Invitrogen) を採用した。*act* VI-ORF 1、*gra*-ORF 6 それぞれを PCR で増幅してベクターに組み込み *E. coli* BL21(DE3)pLysS に導入した。液体培養した菌体から粗酵素液を調製し SDS-PAGE、western blotting により分析した結果、recombinant の RED1・RED2 が発現していることを確認した。この粗酵素液と前述の基質アナログを用い *in vitro* assay を行ったところ、RED1 反応液からは還元生成物を検出できたが RED2 からは検出できず、biotransformation の結果と同じに留まった。これは、RED1・RED2 の基質特異性は大きく異なることを示唆する結果と判断した。

また還元活性を検出できた RED1 について検討を進めたところ、その基質は NAC エステルではなく、アナログ基質から NAC の外れた free acid 体であることが判明した。このことから、本来の基質 bicyclic intermediate も従来考えられていたように酵素結合型で反応するのではなく、free acid になってから還元されている可能性が高まり、基質チャネリングに関する新たな知見を得ることができた。さらに site directed mutagenesis により、homology modeling から活性に必須と予想された His129、Glu141 をそれぞれ他のアミノ酸に置換したところ、いずれの mutant RED1 の還元活性も低下あるいは消失した。検討した Mutant のうち E141D は、唯一 wild type の 20%程度という、他の mutant に比べて高い活性を示した。このことは Glu141 の役割が His128 のイミダゾール基活性化であることを示唆していると判断しており、homology modeling で得られた結果を支持するものである。

【総括】以上、私は DHGRA 生合成遺伝子中 *gra*-ORF6 が RED2 をコードし、3位の立体化学制御に必須であることを始めて明らかにした。アミノ酸一次配列上、有意な相同性を示さない二つの酵素が、同一化合物を基質とし同一部位を立体化学が逆になるよう還元することは、構造多放線性を特徴とする放線菌二次代謝産物の生合成において、極めて興味深いことである。また RED1・RED2 それぞれを大腸菌で発現させることに成功し、特に RED1 については基質が free acid 体で反応している可能性が高いことを示した。これは新しい知見であり、今後生合成酵素間の基質チャネリング機構を解明するうえで重要な知見となるはずである。

#### 【参考文献】

- [1] Ichinose K., Surti C. M., Taguchi T., Malpartida F., Booker-Milburn K. I., Stephenson G. R., Ebizuka Y., Hopwood D. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 395-400 (1999).
- [2] Ichinose K., Bedford D. J., Tornus D., Bechthold A., Bibb M. J., Revill W. P., Floss H. G., Hopwood D. A. *Chem. Biol.* **5**, 647-659 (1998).
- [3] 市瀬浩志, David A. Hopwood, Heinz G. Floss, 海老塚豊. 第42回天然有機化合物討論会(沖縄). 講演要旨集, p253-258 (2000).
- [4] Ichinose K., Taguchi T., Bedford D. J., Ebizuka Y., Hopwood D.A. *J. Bacteriol.*, **183**, 3247-3250 (2001).
- [5] Taguchi T., Ebizuka Y., Hopwood D.A., Ichinose K. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 11376-11380 (2001).
- [6] Anson C. E., Bibb M. J., Booker-Milburn K. I., Clissold C., Haley P. J., Hopwood D. A., Ichinose K., Revill W. P., Stephenson G. R., Surti C. M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 224-227 (2000).
- [7] Barycki J. J., O'Brien L. K., Bratt J. M., Zhang R., Sanishvili R., Strauss A. W., Banaszak L. *J. Biochemistry*, **38**, 5786-5798 (1999).
- [8] Liao, D. -I., Basarab, G. S., Gatenby, A. A., Valent, B., Jordan, D. B. *Structure*, **9**, 19-27 (2001).