

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成 18 年度博士課程 入学
氏名 金 承榮
指導教員 西山 真

論文題目

放線菌の生産するジテルペン化合物サイクロオクタチンの生合成に関する研究

サイクロオクタチン (cyclooctatin)は *Streptomyces melanosporofaciens* MI614-43F2 から単離された、5-8-5 員環構造を有するジテルペン化合物である。サイクロオクタチンは lysophospholipids (LysPL)の脂肪酸エステル結合を加水分解して脂肪酸とグリセリンを生成する lysophospholipase を阻害する。サイクロオクタチンのような環状テルペノイドは、プレニル鎖長を決定するポリプレニルジリン酸合成酵素により生成した直鎖状ポリプレニルジリン酸がテルペン環化酵素によって環化されて炭素骨格が形成された後、酸化や還元等の化学修飾を受けて生合成される。このような生合成過程において、geranylgeranyl diphosphate (GGDP) cyclase のような環化酵素は、直鎖ポリプレニルジリン酸を構造多様な環状テルペノイド化合物へと変換するための鍵酵素である。

これまで、GGDP cyclaseのほとんどが高等植物と真菌から単離され、解析されている。この酵素群の環化様式は、1) A型、2) B型、3) A-B型、そして4) B-A型に分類される。A型反応はGGDPのジリン酸の ionizationにより、B型反応はGGDPの末端二重結合のprotonationによってそれぞれ環状化合物を生成する。A型反応とB型反応が複合して起こるのがA-B型とB-A型の反応であり、ionizationとprotonationの順番により、これら二つに分類される。これまでに原核生物由来のGGDP cyclaseについては、terpentecinを生産する*Kitasatospora griseola*由来のterpentedinol diphosphate synthase、viguiepinolを生産する*Streptomyces* sp. KO-3988 由来のent-copalyl diphosphate synthase、そして*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv3377c由来の5,13-halimadiene diphosphate synthaseについてのみ報告されている。これら三つのGGDP cyclaseはいずれもB型の様式で環化反応を触媒する。最近、植物病原性真菌である*Phomopsis amygdali*からA-B型のfusicocca-2,10(14)-diene synthase (PaFS)が同定された。このPaFSは多機能酵素であり、N-末側のGGDP cyclaseに続いて、C-末側にGGDP synthaseが融合している。fusicocca-2,10(14)-dieneとサイクロオクタチンの構造類似性から、fusicocca-2,10(14)-dieneがサイクロオクタチンの重要な中間体であり、PaFSのような多機能酵素がサイクロオクタチン生合成経路に関与する

と予想されたが、原核生物由来のジテルペン化合物であるサイクロオクタチンの生合成経路に関する情報はまったくなかった。

本研究の目的は、*S. melanosporofaciens* MI614-43F2 からのサイクロオクタチン生合成遺伝子クラスターのクローニング、および生合成遺伝子クラスターの機能解析、特に環化酵素の同定と環化反応機構の解明を中心としたサイクロオクタチン生合成経路の全容解明である。また、ジテルペン環化酵素としては初めての結晶構造解明も目的としている。

サイクロオクタチン生合成遺伝子クラスターの同定

サイクロオクタチンは C₂₀ からなる GGDP を共通の生合成中間体とするジテルペン化合物である。そのため、その生合成遺伝子は GGDP synthase 遺伝子とクラスターを形成していると考えた。そこで、ポリプレニルジリン酸合成酵素の保存配列から設計した PCR プライマーを用いて、*S. melanosporofaciens* MI614-43F2 のゲノム DNA から GGDP synthase 遺伝子の部分配列のクローニングを行った。次いで、この GGDP synthase 遺伝子をプローブにして、pOJ446 を用いて構築した MI614-43F2 株のコスミドライブラリーから、複数の陽性クローンを選抜した。陽性クローンについては、*S. albus* を用いて異種発現させ、サイクロオクタチンの生産を確認した後、シーケンス解析を行った。サイクロオクタチンの生産性を確認したコスミド pCOT9469 には 24 個の ORF (open reading frame) を含む 34-kbp の DNA 断片が挿入されていた。また、24 個の ORF の中には GGDP synthase (ORF1) が確かに存在し、その近傍には機能未知タンパク質 (ORF2) と 2 個のチトクローム P450 (ORF3 と ORF4) 遺伝子も存在した。ORF2 は BLAST と FASTA による検索ではホモログの存在が確認できないものの、PSI-BLAST を用いたドメイン検索の結果、ポリプレニルジリン酸-Mg²⁺ 結合配列を含む "Terpene cyclase" ドメインを持つことが判明し、ORF2 がサイクロオクタチンの鍵酵素である terpene cyclase と推定した。

次にこれら 4 つの ORF がサイクロオクタチン生合成の minimal gene cluster であることを確認するために、放線菌—大腸菌シャトルベクター pSE101 に ORF1 から ORF4 を含む DNA 断片を挿入したプラスミド pCOT104 を構築し、*S. albus* を導入した。その結果、*S. albus* 形質転換体の培養液中にサイクロオクタチンの生産が確認された。以上の結果から ORF1-4 がサイクロオクタチン生合成の minimal gene cluster と結論し、これらの ORF を CotB1-4 (cycloocta τ in biosynthesis) と命名した。

terpene cyclase (CotB2) の機能解析

次に、terpene cyclase であると推定した CotB2 について、大腸菌で高発現させたヒスチジンタグ付き組換え酵素を用いて機能解析を行った。SDS-PAGE とゲルろ過による分析の結果から、本酵素は 37 kDa のサブユニットからなる homodimer であると推定した。精製酵素を用いた *in vitro* 反応産物を GC-MS によって分析したところ、Mg²⁺ 依存的に GGDP が未知化合物 **2** に変換されることが判明した。そこで、未知化合物 **2** を silica gel chromatography により精製し、その精製物質の HR-ESI-MS、および各種 NMR スペクトルを解析したところ、化合物 **2** は 5-8-5 員環構造を持つ新規なジテルペン化合物

cycloocta-9-en-7-ol であることが判明した。cycloocta-9-en-7-ol と化学構造と、CotB2 の触媒する環化反応が Mg^{2+} 依存的であることから、この環化反応は、まず、GGDP のジリン酸部分の引き抜きによってカルボカチオンが生成し、次いで、生じた二重結合の protonation によって cycloocta-9-en-7-ol が生成する A-B 型の反応機構で反応が進行すると推測している。

P450 遺伝子 CotB3 と CotB4 の機能解析

前述の実験で環化酵素 CotB2 が cycloocta-9-en-7-ol を生成することを明らかにした。このことから、cycloocta-9-en-7-ol がサイクロオクタチンの生合成中間体であり、この化合物がチトクローム P450 である CotB3 と CotB4 による水酸化を受けることでサイクロオクタチンが生合成されると推定した。このことを明らかにするため、pCOT104 のデリーションプラスミドを構築し、*S. albus* を用いた異種発現を試みた。

S. albus 形質転換体培養物の LC-MS 分析の結果、CotB1、CotB2、CotB3 を含む場合にのみ新たな未同定化合物 **3** が検出された。そこで、**3** を silica gel chromatography と HPLC を用いて精製し、さらなる構造解析を行った。HR-ESI-MS および各種 NMR による分析の結果、化合物 **3** は C-5 に水酸基を持つ新規なサイクロオクタチン中間体である cycloocta-9-en-5,7-diol であることが判明した。一方、CotB1 と CotB2 のみを含む場合と CotB1、CotB2、CotB4 を含む場合には、cycloocta-9-en-7-ol が蓄積した。また、*Pseudomonas putida* 由来の flavodoxin と flavodoxin reductase を組み込んだ P450 発現用ベクター pTNS-camAB に CotB3 をクローニングして大腸菌を形質転換し、この組換え大腸菌を用いて cycloocta-9-en-7-ol の bioconversion を試みたところ、確かに、cycloocta-9-en-5,7-diol が生産された。これらの結果から、CotB3 が cycloocta-9-en-7-ol に水酸基を付加して cycloocta-9-en-5,7-diol を合成すること、次いで、CotB4 がさらに cycloocta-9-en-5,7-diol の 18 位に水酸基を付加してサイクロオクタチンを合成することが明らかになった。以上の結果からサイクロオクタチンの生合成経路を図1のように決定した。

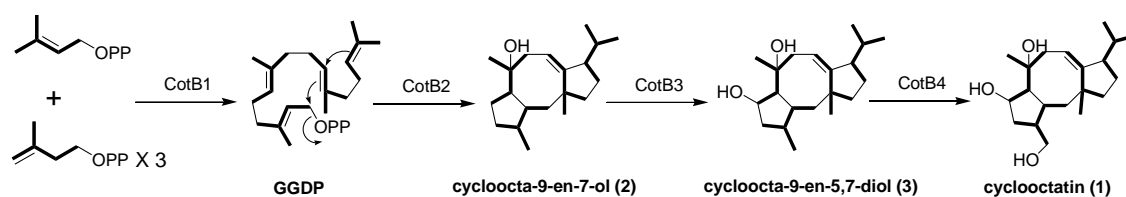


図1. サイクロオクタチンの生合成経路

CotB1, GGDP synthase; CotB2, GGDP cyclase; CotB3, P450; CotB4, P450.

terpene cyclase (CotB2)の結晶構造解析

(His)₆タグが融合した CotB2 を大腸菌 B834(DE3)を用いて大量発現させて精製し、10 mg/ml まで濃縮して結晶化に用いた。結晶化スクリーニングの際には、1 mM GGDP を添加したサンプルも用意し、hanging drop 蒸気拡散法による 20°C でのスクリーニングと結晶化条件の最適化を行ったところ、0.1 M Tris-HCl (pH8.0)、2.2 M ammonium formate の条件で良質の結晶が得られた。さらに SeMet 置換体結晶を作製し、その X 線回折データから、結晶の空間群を *P*6₅22 に、その格子定数を $a = b = 105.6 \text{ \AA}$ 、 $c = 310.4 \text{ \AA}$ と決定した。CotB2 の結晶構造は、図2に示すように、 α -helix のみから構成される homodimer 構造であった。また、既知のテルペン環化酵素で保存されている DDXD モチーフと NSE モチーフが基質結合ポケットを構築し、その基質結合ポケットは GGDP 非結合型の open form を形成していた。CotB2 の結晶構造はジテルペン環化酵素としては初めて決定されたものである。

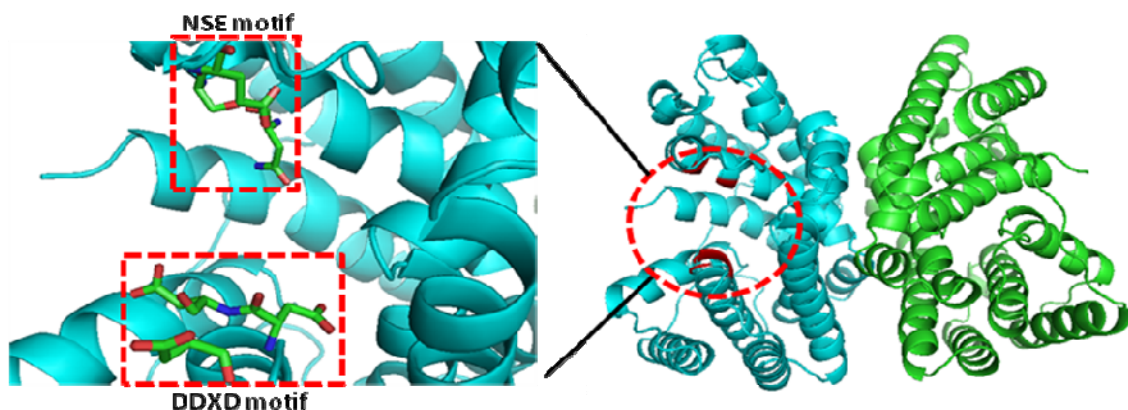


図2. GGDP cyclase の全体構造と、DDXD モチーフと NSE モチーフ

まとめ

本研究では、*S. melanosporofaciens* MI614-43F2 由来のサイクロオクタチン生合成遺伝子クラスターのクローニングと *S. albus* での異種発現に成功し、サイクロオクタチン生合成経路を解明した。サイクロオクタチン生合成遺伝子クラスターは 4 つの遺伝子、*cotB1-4* からなり、その中に見出された CotB2 は、GGDP から cycloocta-9-en-7-ol を合成する新規なジテルペン環化酵素であった。続いて、二つのチトクローム P450 の機能解析を行い、CotB3 は cycloocta-9-en-7-ol の 5 位に水酸基を導入して cycloocta-9-en-5,7-diol を合成すること、次いで、CotB4 が cycloocta-9-en-5,7-diol の 18 位に水酸基を導入しサイクロオクタチンを合成することを明らかにした。さらには、ジテルペン環化酵素 CotB2 の結晶構造解析に成功し、A-B 型反応を行う同酵素の構造的基盤を明らかにした。