

論文内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成19年度博士課程 進学
氏名 熊野 匠人
指導教員名 西山 真

論文題目

構造多様性を創出する芳香族基質プレニルトランスフェラーゼに関する基礎および応用研究

放線菌は多様な構造の二次代謝産物を生合成することが知られている。その中で一部の放線菌はポリケタイドとテルペノイドが融合したユニークな構造を有するポリケタイド-テルペノイド融合化合物を生合成する。*Streptomyces* sp. CL190 株が生産する抗酸化物質 naphterpin、*Streptomyces* sp. KO-3988 株が生産する抗腫瘍物質 furaquinocin、*Streptomyces* sp. CNQ525 株が生産する napyradiomycin、*Streptomyces cinnamomensis* が生産する furanonaphthoquinone がその一例である。これら融合化合物はテルペノイド部分の付加によって構造多様性が生じるため、その反応を触媒するプレニルトランスフェラーゼがこれらポリケタイド-テルペノイド融合化合物生合成の鍵酵素と考えられる(図 1)。

炭素数5の isopentenyl diphosphate と dimethylallyl diphosphate (DMAPP)からイソプレノイドジリン酸を合成する鎖長伸長プレニルトランスフェラーゼ、細胞内シグナル伝達を担う低分子 GTP 結合タンパク質のシステイン残基に farnesyl diphosphate や geranylgeranyl diphosphate を付加するタンパク質プレニルトランスフェラーゼ、ユビキノンやメナキノンの生合成に関与するポリプレニルトランスフェラーゼなどの既知のプレニルトランスフェラーゼは、いずれも Mg^{2+} 依存性であり、アスパラギン酸リッチな DDXXD モチーフを有している。一方、近年 *Streptomyces roseochromogenes* の clorobiocin 生合成遺伝子クラスターから見出された CloQ は、金属イオン非依存であり DDXXD モチーフも有していないが、4-hydroxyphenylpyruvate に DMAPP 由来のジメチルアリル基を付加する。

naphterpin と furaquinocin 生合成遺伝子クラスターには CloQ ホモログが存在し、これら

のプレニルトランスフェラーゼがポリケタイド基質にプレニル基を導入していると考えられたが、その基質、および反応産物に関しては未知であった。

本研究では naphterpin 生合成遺伝子クラスターの NphB と、furaquinocin 生合成遺伝子クラスターの NphB ホモログ Fur7 を中心に生理的基質の同定と機能解析を行った。さらに、これらのプレニルトランスフェラーゼを用いて、有用な生物活性が期待されながら天然からは調製が困難なフラボノイドや植物ポリケタイドのプレニル化化合物を合成し、これらの酵素が寛容な基質特異性を有しており、プレニル化化合物合成のツールとなりうることを示した。

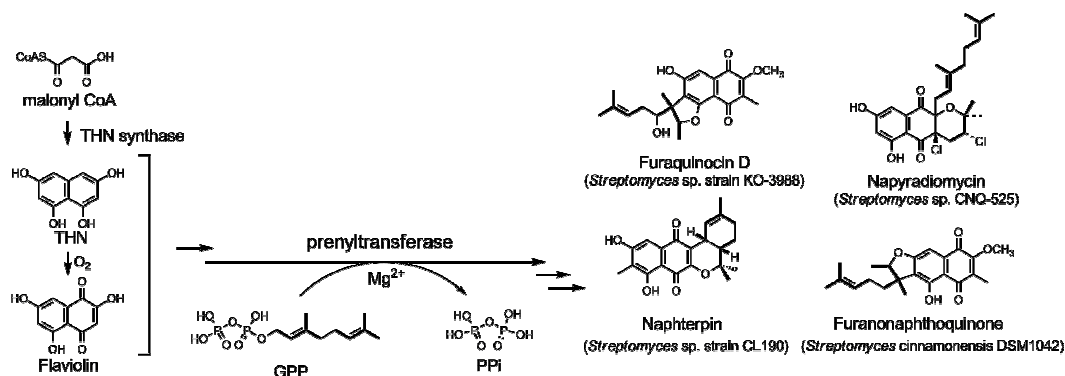


図 1 ポリケタイド-テルペノイド融合化合物

1. フラキノシン生合成遺伝子 Fur7 の基質の同定と生合成中間体の取得

furaquinocin 生合成遺伝子クラスターは富山県立大学の大利徹先生より御分与いただいた。

Fur7 の生理的な基質を得るために fur7 破壊株を作製し培養したところ furaquinocin のは生産されなくなったものの、Fur7 の基質となる化合物の蓄積は観察されなかった。この結果から基質が不安定である可能性を考え、fur7 破壊株の培養上清と精製した Fur7 を混合し、その反応前後の溶液を HPLC、LC-MS で分析した。その結果、培養上清中の分子量 234 の化合物が減少するとともに分子量 370 の化合物が生成した。そこで 2 L の培養液から 0.2 mg の Fur7 の基質と考えられる分子量 234 の化合物を単離し NMR を用いてその構造を 2-methoxy-3-methyl flaviolin と決定した。次いで 2-methoxy 3-methyl flaviolin と Fur7 を反応させたところ二つの反応産物 Fur-P1, P2 が得られ、それらの構造を決定した。このうち生合成中間体と考えられる化合物 Fur-P1 を fur7 破壊株に与えると furaquinocinC の生産が回復した。これらの結果から 2-methoxy 3-methyl flaviolin が Fur7 の生理的基質であり、Fur-P1 が furaquinocin 生合成中間体であることが明らかとなった (図 2)。

2. ナフテルピン生合成遺伝子 NphB 反応によるナフテルピン生合成中間体の取得

naphterpin 生合成において nphB 破壊株は d2-8 と名付けた化合物を蓄積するがこれは NphB の基質とはならない。そこで furaquinocin の場合と同様に nphB 破壊株培養上清に NphB を反応させ反応産物 Nph-P1, P2, P3 を単離しその構造を決定した。それぞれを nphB 破壊株培養液に添加したところ Nph-P3 のみナフテルピンの生産が回復した。これにより naphterpin 生合成における NphB の反応産物 Nph-P3 が生合成中間体であることが示唆された。また、今回

得られた化合物のうち Nph-P1 は徐々に Nph-P2 へと構造変化したことから Nph-P2 は Nph-P1 の脱水反応によって生じることが示唆された。以上の結果から naphterpin 生合成における NphB の反応について図 3 のように推測した。

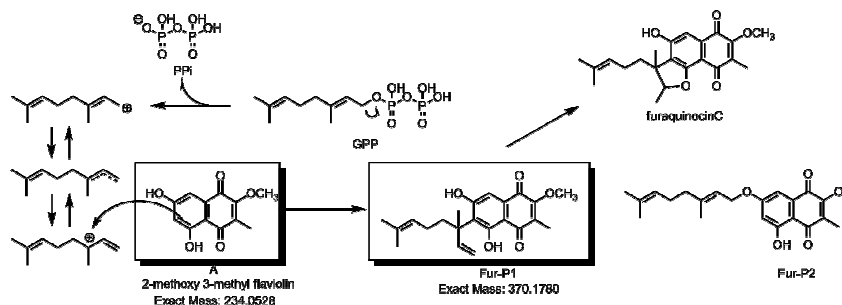


図 2 2-methoxy 3-mehtyl flaviolin と Fur7 の反応

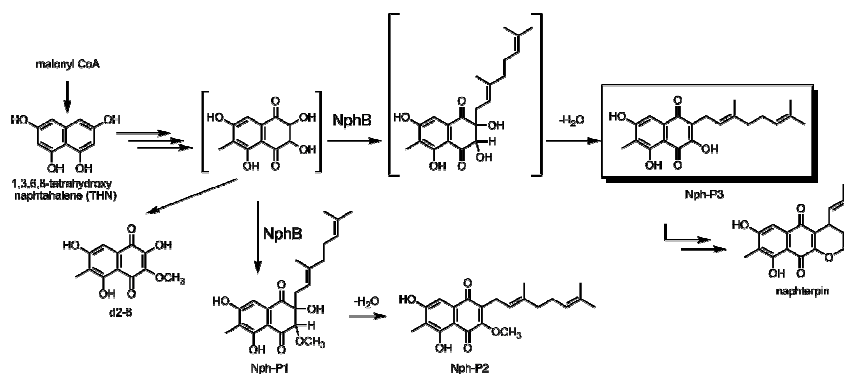


図 3 ナフテルピン生合成における推定 NphB 反応

3. 放線菌由来プレニルトランスフェラーゼの基質特異性と反応産物の構造解析

天然には植物やカビ由来のプレニル化合物が多数知られ、有用な生物活性が期待されているがそれらの天然からの調製は困難なため、簡便な合成方法が求められている。

そこで NphB、Fur7 と *Streptomyces coelicolor* A3(2)由来の NphB ホモログ SCO7190 を用いて dihydroxy naphthalene (DHN)、4 種のフラボノイド、2 種の植物ポリケチドを基質にプレニル化を試みた。その結果、NphB では 1,6-DHN、2,7-DHN、naringenin、apigenin、genistein、daidzein、olivetol、resveratrol の水酸基のオルト位またはパラ位をグラニル化することができ、フラボノイドに対しては水酸基のプレニル化も観察された。NphB は水酸基のグラニル化を触媒できる初めての酵素である。Fur7 は 1,3-DHN、resveratrol をグラニル化したがフラボノイドに対しては活性を示さなかった。一方で flaviolin に対しては GPP の 1 位の炭素が付加する活性だけでなく 3 位で付加する活性も有しており、GPP だけでなく DMAPP に対しても活性を有していることが判明した。SCO7190 は DMAPP を基質とし 1,6-DHN、2,7-DHN、naringenin、olivetol、resveratrol に対して活性を示した。

4. NphB, Fur7 変異酵素の機能解析

NphB は Mg^{2+} 依存性であるが、Fur7 と SCO7190 は金属イオン非依存性である。さらに、napyradiomycin 生合成遺伝子 NapT8, NapT9 をクローニングし flaviolin に対して反応を試みたところ、NapT8 は金属イオン非依存的にジメチルアシル基を、NapT9 は金属イオン依存的にゲラニル基を flaviolin の 3 位に付加した。これらプレニルトランスフェラーゼ間でアラインメントをとると、金属イオン非依存性の Fur7、SCO7190、NapT8 では Fur7 の 53 番目と 67 番目に相当するアミノ酸残基がアルギニンであり、金属イオン依存性の NphB、NapT9 ではセリンである。プレニルトランスフェラーゼ反応ではプレニルジリン酸のヘテロリシスにより生じたプレニルカチオンが芳香環と求電子置換反応により反応すると推定されており、 Mg^{2+} がその一端を担っていると考えられている。一方、Fur7 などの金属イオン非依存性の酵素では、同アルギニン残基がプレニルカチオンの生成に関与している可能性を考えた。そこで NphB(S51R), NphB(S64R), NphB(S51R, S64R), Fur7(R53S), Fur7(R67S), Fur7(R53S, R67S) を作製して活性を測定した。その結果、NphB(S51R) において Mg^{2+} 非存在下でも活性が検出された。一方で、Fur7(R53S, R67S) は Mg^{2+} 依存度が変化したことから、Fur7 をはじめ、金属イオン非依存性のプレニルトランスフェラーゼでは二つのアルギニン残基がプレニルカチオンの生成に関与していることが示唆された。

5. 形質転換体植物抽出物に含まれるプレニル化合物の同定

植物の二次代謝産物として様々なプレニル化合物が単離されており、それらの生物活性が注目されているが、生産量が微量であるため化合物の同定は困難である。本研究では放線菌由来プレニルトランスフェラーゼを利用して合成したプレニル化合物を標品として用いることで LC-MS により放線菌または植物由来のプレニルトランスフェラーゼを発現するミヤコグサ、ダイズ、トマトの形質転換体抽出物中のプレニル化合物の同定を可能にした。

まとめ

本研究では furaquinocin 生合成、および naphterpin 生合成におけるプレニルトランスフェラーゼ Fur7、NphB の生理的な基質または反応産物を明らかにした。また、これらの放線菌由来プレニルトランスフェラーゼが寛容な基質特異性を有し、プレニル化合物合成のツールとなりうることを示すことができた。さらに NphB、Fur7 の変異酵素の機能解析からは Fur7 などの Mg^{2+} 非依存性のプレニルトランスフェラーゼでは、活性中心の二つのアルギニン残基がプレニル化反応に重要な役割を担っていることを明らかにした。

Takuto Kumano, Stéphane B. Richard, Joseph P. Noel, Makoto Nishiyama, and Tomohisa Kuzuyama, “Chemoenzymatic syntheses of prenylated aromatic small molecules using *Streptomyces* prenyltransferases with relaxed substrate specificities” *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2008, 16(17), 8117-26