

## 論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻

平成 21 年度博士課程 進学

氏名 磯貝 章太

指導教員名 西山 真

論文題目 放線菌の生産するテルペノイド-ポリケタイド融合化合物  
特異的生合成機構に関する研究

放線菌 *Streptomyces* sp. KO-3988 の生産するフラキノシンと、放線菌 *Streptomyces* sp. CL190 の生産するナフトテルピンはともにテルペノイド骨格とポリケタイド骨格が融合したテルペノイド-ポリケタイド融合化合物である。これらの融合化合物は構造がユニークであることから、生合成を触媒する酵素が新規有用物質の生産に利用できることが期待される。

フラキノシンとナフトテルピンの生合成は、テルペノイド骨格の生合成、ポリケタイド骨格の生合成、両者の縮合、テルペノイド骨格の環化の四つの段階に分けることができる。テルペノイド骨格は炭素数 10 のゲラニルピリン酸 (GPP) に由来する。一方ポリケタイド骨格は、5 分子の malonyl CoA が縮合して生成する 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene (THN) が修飾を受けることで生合成されると推測される。両骨格の縮合は、芳香族基質プレニル基転移酵素によって触媒され、フラキノシン生合成に関わる Fur7 に関しては、既にその生理的基質として 2-methoxy-3-methylnaphthalene-1,4-dione (2-methoxy-3-methyl-flaviolin) が同定されている。一方、ナフトテルピンの生合成に関わる NphB に関しては生理的基質が同定されていない。また、生合成の最後の段階である環化に関しては両化合物とも不明である。

THN の生合成に関しては、THN 合成酵素と相同性を有する Fur1 および NphC によって触

媒されると推測される。フラキノシンとナフテルピンの生合成遺伝子クラスターにおいて、Fur1 および NphC をコードする遺伝子の周囲を比較すると、その下流に互いに高い相同性を示す *fur2*, *fur3* および *nphD*, *nphE* が存在していた。Fur2, NphD はともに THN 酸化酵素と相同性を示すことから、THN の酸化反応を触媒すると推測される。一方、Fur3 と NphE はピリドキサルリン酸 (PLP) を補酵素として用いるアミノ基転移酵素とアノテーションされるものの、最終産物であるフラキノシンとナフテルピンの構造中にはアミノ基が存在せず、どのような反応を触媒するかは不明であり、その機能に興味を持たれた。本研究では、フラキノシンのポリケタイド骨格生合成に関わると推測される Fur1,2,3 およびナフテルピンのポリケタイド骨格生合成に関わると推測される NphC,D,E について機能解析を行い、両化合物のポリケタイド骨格生合成の解明を目的とした。また、フラキノシン生合成における環化酵素の探索を行い、テルペノイド - ポリケタイド融合化合物の環化機構に関する新たな知見を得ることも目的とした。

## 第1章 フラキノシンのポリケタイド骨格生合成

まず、Fur2 および Fur3 反応産物を取得するために、異種放線菌 *Streptomyces albus* において *fur1,2* および *fur1,2,3* を異種発現させた。その結果 *fur1,2* 異種発現株では、主生産物として 2,5,7,8-tetrahydroxynaphthalene-1,4-dione (mompain) が生産され、また少量の 2,5,7-trihydroxynaphthalene-1,4-dione (flaviolin) も生産されていた。一方、*fur1,2,3* 異種発現株では、mompain とともに flaviolin と異なる化合物が検出された。この化合物を単離精製し構造決定を行ったところ、flaviolin の 8 位にアミノ基が付加した新規化合物 8-amino-2,5,7-trihydroxynaphthalene-1,4-dione (8-amino-flaviolin) であった。この 8-amino-flaviolin は最終産物であるフラキノシンの構造中には存在しないアミノ基を有する化合物であったため、シャント産物やアーティファクトである可能性が疑われた。そこで次に *fur3* 破壊株を作製し解析を行った。その結果、*fur3* 破壊株ではフラキノシンの生産が失われ、*fur3* が生合成に必須であることが判明した。さらに *fur3* 破壊株に 8-amino-flaviolin を添加して培養することでフラキノシンの生産が回復し、8-amino-flaviolin が生合成中間体であることが証明された<sup>1</sup>。

次に、大腸菌もしくは放線菌から精製した組換え Fur1, Fur2, Fur3 を用いて *in vitro* における機能解析を行った。Fur2 は DTT 依存的に flaviolin を mompain へと酸化する活性を示すことが明らかとなり、Fur2 は THN を酸化して flaviolin を生成し、さらに flaviolin を酸化して mompain を生成する反応を触媒することが判明した。一方、Fur3 はグルタミン酸をアミノ基供与体として mompain の 8 位にアミノ基を転移する反応を触媒することが明らかとなり、mompain の酸化とグルタミン酸からのアミノ基の転移の両方を触媒する新規のアミノ基転移酵素であることが示された。

最後に 8-amino-flaviolin の有するアミノ基の果たす役割の解明を行った。これまでの研究によって、2-methoxy-3-methylflaviolin の生産には *fur1-6*, *16* が必要であることが示されており、O-メチル基転移酵素 Fur4 は 8-amino-flaviolin の 2 位の水酸基のメチル化を触媒すると推測された。しかしながら、*fur1-4* 異種発現株特異的に蓄積した化合物の構造は、8-amino-flaviolin の 7 位の水

酸基がメチル化された 7-methoxy-8-amino-2,5-dihydroxynaphthalene-1,4-dione (7-methoxy-8-amino-flaviolin)であった。この結果は、7-methoxy-8-amino-flaviolin はシャント産物であり、Fur4 の基質は 8-amino-flaviolin とは別の未同定の生合成中間体であることを示唆している。以上のことから、8-amino-flaviolin の 8 位のアミノ基は、正しい位置にメチル基を導入すべくメチル基転移酵素の活性中心ポケットに基質を正しく配置するための役割を果たしていると推測される。

## 第 2 章 ナフテルピンのポリケタイド骨格生合成

NphD および NphE 反応産物を同定するために、*fur1,2* および *fur1,2,3* 異種発現株と同様に、*S. albus* において *nphC,D* および *nphC,D,E* を異種発現させた。異種発現の結果、*nphC,D* 異種発現株では *mompain* と *flaviolin* が生産された。一方、*nphC,D,E* 異種発現株では 8-amino-flaviolin と類似したスペクトルを示す化合物が生産され、この化合物を精製し構造決定を行ったところ、8-amino-flaviolin であった。ナフテルピンの構造中にはフラキノシン同様アミノ基が存在しないため、この 8-amino-flaviolin はシャント産物やアーティファクトである可能性があった。そこで次に、ナフテルピン生産菌である *Streptomyces* sp. CL190 において *nphE* を破壊し解析を行った。*nphE* 破壊株培養抽出物を解析したところ、ナフテルピンの生産が失われ *nphE* が生合成に必須であることが示された。さらに *nphE* 破壊株に 8-amino-flaviolin を添加して培養することでナフテルピンの生産が回復したことから 8-amino-flaviolin が生合成中間体であることが証明された。

次に、大腸菌から精製した組換え NphC, NphD, NphE を用いて *in vitro* における機能解析を行った。NphD は DTT 依存的に *flaviolin* を *mompain* へと酸化し、Fur2 同様に THN から *flaviolin* への酸化と *flaviolin* から *mompain* への酸化の二段階の酸化反応を触媒することが明らかとなった。一方 NphE は、アミノ基受容体として *mompain* をアミノ基供与体としてグルタミン酸を用いることが判明し、NphE は Fur3 同様に *mompain* の酸化反応とグルタミン酸からのアミノ基転移反応の両方を触媒する酵素であることが明らかとなった。

NphE と Fur3 はともに酸化反応とアミノ基転移反応の両方を触媒することが判明したが、その反応機構は不明である。そこで、NphE の立体構造モデルから酵素活性に重要と推測された二つのアミノ酸残基 (Cys157, Arg182) をアラニンに置換し、NphE 反応に与える影響を観察した。その結果、両変異酵素とも活性が大幅に低下し、両アミノ酸残基が酵素活性に重要であることが示された。特に Cys157 に関しては、酵素の紫外可視吸収スペクトルから補酵素である PLP との結合に関与している可能性が示唆された。

## 第 3 章 フラキノシン環化酵素の探索

フラキノシンの環化反応は、2-methoxy-3-methylflaviolin がブレニル化された 6-(3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-yl)-5,7-dihydroxy-2-methoxy-3-methylnaphthalene-1,4-dione (Fur-P1) が基質となると予想されている。これまでの研究から Fur-P1 の生合成には、*fur1-7, 16, 19* が必要であると推測される。フラキノシン生合成遺伝子クラスター中の候補遺伝子からこれらの遺伝子を外すと、*fur17* および *fur18* が機能未知であり環化反応に関与する可能性が考えられた。そこで本章

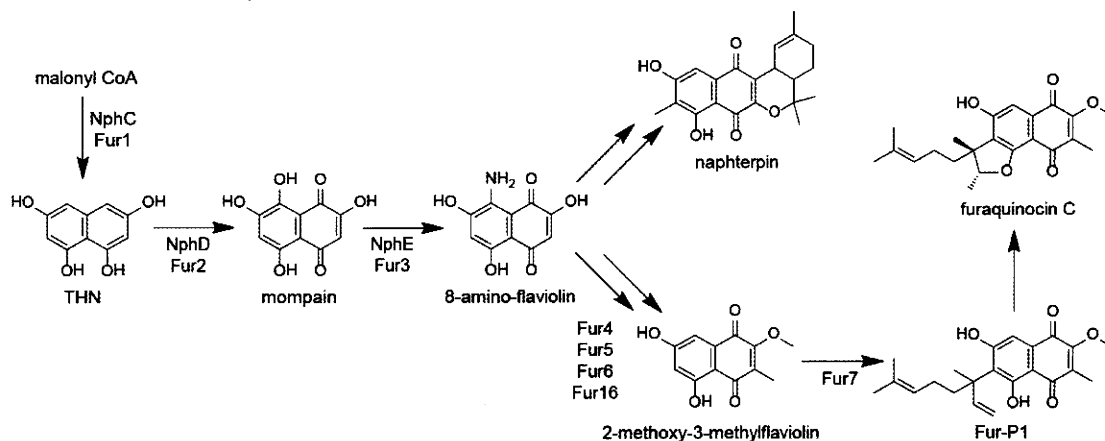
では両遺伝子について *in vivo* における解析を行った。

まず、基質となる Fur-P1 の生産系を確立した。既に当研究室で作成されていた *fur1-6* 異種発現系である pSFQ106 に *fur7*, *fur16*, *fur19* の遺伝子を導入し pSE\_ *fur-P1* とした。pSE\_ *fur-P1* により形質転換した *S. albus* を培養したところ、確かに Fur-P1 を生産しこれらの遺伝子が Fur-P1 生産に必要な十分であることが示された。

次に、*fur17*, *fur18*, *fur17-18* をそれぞれ *S. albus* において異種発現させ、上記の異種生産株から得られた Fur-P1 の添加実験を行った。しかしながら、いずれの異種発現系に Fur-P1 を添加した場合にもフラキノシン C への変換を確認することはできなかった。そこで、pSE\_ *fur-P1* においてさらに *fur17*, *fur18*, *fur17-18* を発現させた異種発現系を作製し、これらの異種発現株においてフラキノシン C が生産されるかの検証を行った。異種発現株培養抽出物を LC-MS により分析した結果、いずれの異種発現株においてもフラキノシン C への変換を確認することはできなかった。以上の結果は、*fur17*, *fur18* が環化反応に関与していないことを示唆している。そのことを確認するために遺伝子破壊株の解析を行った。*fur17* 破壊株はその生産物が既に解析されており、野生型と同様にフラキノシンを生産することが示されている。そこで、本研究では *fur18* 破壊株生産物の解析を行ったところ、*fur17* 破壊株同様にフラキノシンを生産した。これらの破壊株の結果と異種発現株の解析結果から、Fur17, Fur18 はともに環化酵素ではないと結論づけた。

## 総括

本研究では、フラキノシンのポリケタイド骨格生合成に関わる Fur1,2,3 およびナフテルピンの生合成に関わる NphC,D,E に関して機能解析を行い、両化合物に共通の中間体として 8-amino-flaviolin を同定した。本研究の結果から、THN から mompain を経由して 8-amino-flaviolin を生成する生合成経路はテルペノイド - ポリケタイド融合化合物に共通の生合成経路であることが強く示唆される。また、フラキノシンの生合成における環化酵素と推測された Fur17, Fur18 について機能解析を行った。結果として環化酵素の同定には至らなかったが、*fur17*, *fur18* が環化反応に関与していないことを証明することができ、今後の研究の足掛かりとすることができたと考えている。



1) S. Isogai, M. Nishiyama, T. Kuzuyama, *Bioorg Med Chem Lett.* 2012, 22, 5823-5826