

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 22 年度博士課程 進学
氏 名 尾崎 太郎
指導教員名 西山 真

論文題目

放線菌におけるテルペノイドの構造多様性創出機構に関する研究

テルペノイドは炭素数 5 のイソプレン骨格を基本単位として生合成される化合物の総称である。これまでに数万ものテルペノイドが天然から単離されてきた。テルペノイドは、その多様な構造ゆえに様々な生物活性を示し、医薬や農薬、香料など様々な用途で利用されてきた重要な化合物群である。構造多様なテルペノイドは、イソプレン骨格の縮合や環化、転移、修飾により生合成される。その生合成機構を解明することで、汎用宿主による効率的な物質生産や変異酵素を利用した新規類縁体の合成が可能になると期待される。また、特徴的な骨格を生合成する酵素反応には、独自の反応を触媒するものが多く存在するため、分子進化の多様性を探るうえでも生合成研究は重要である。本論文の第一章と第二章では、放線菌の生産するテルペノイドの生合成研究を行い、新たなテルペノイド生合成機構を見出した。さらに、第三章と第四章では、生合成研究によって見出された基質特異性の寛容なプレニル基転移酵素を利用して様々な芳香族化合物のプレニル化を試み、構造多様なプレニル化化合物を合成することに成功した。

第一章 *Streptomyces coelicolor* A3(2)におけるプレニル化インドールの生合成研究

S. coelicolor A3(2)のゲノム上にはプレニル基転移酵素遺伝子 *SCO7467*、およびフラビン依存型モノオキシゲナーゼ(FMO)遺伝子 *SCO7468* が並んで存在する機能未知遺伝子クラスターが存在する。この遺伝子クラスターが新規テルペノイドの生合成に関与すると予想し、研究を行った。*SCO7467* と *SCO7468* を異種放線菌 *Streptomyces lividans* TK23 に導入することで最終産物の同定を試みた。*S. coelicolor* A3(2)と *S. lividans* TK23 は近縁の種であり、ほぼ同一の遺伝子クラスターを有している。*S. lividans* TK23 において、*SCO7467* と *SCO7468* の発現量を上昇させることで、最終産物が蓄積することを期待した。両遺伝子を導入した *S. lividans* TK23 の形質転換体を培養したところ、形質転換体特異的に蓄積する化合物を見出すことに成功し、構造解析によって新規化合物 5-ジメチルアリルインドール-3-アセトニトリル(5-DMAIAN)であることを明らかにした。

次いで、組換えタンパク質を用いた実験によって、5-DMAIAN の生合成経路を推定した。初めに *SCO7467* によって L-トリプトファンがプレニル化され、5-ジメチルアリルトリプトファン(5-DMAT)が生成することを明らかにした。本研究によって、*SCO7467* が L-トリプトファンの 5 位をプレニル化する原核生物由来の初めてのプレニル基転移酵素であることを明らかにした。続いて、*SCO7468* が 5-DMAT を 5-ジメチルアリルインドール-3-アセタルドキシム(5-DMAIAOx)に変換することも明らかにした。同様の変換反応は植物のオーキシン生合成においてシトクロム P450 が触媒することが知られているが、FMO では初めての例である。5-DMAIAOx は脱水反応によって 5-DMAIAN に変換されるため、生合成における合理的な中間体であると考えている。

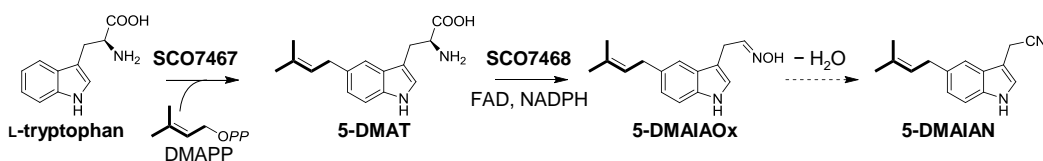


図 1 5-DMAIAN の生合成経路

第二章 ラバンドシアニンの生合成研究

ラバンドシアニンは放線菌 *Streptomyces* sp. CL190 の生産するフェナジン-テルペノイド融合化合物であり、フェナジンの 5 位窒素原子にプレニル基が付加した特徴的な構造を有する。N-プレニル化フェナジンは様々な生物活性を示すことが知られているが、そのプレニル化機構は未解明であった。また、ラバンドシアニンにおけるプレニル基は、シクロラバンデュリル基という特徴的なモノテルペノ

イドであり、その生合成機構も明らかにされていなかった。第二章では、ラバンドシアニン生合成に新規のテルペノイド生合成機構が存在すると予想し、その解明を目的として研究を行った。

放線菌においてシクロラバンデュリル基は、ラバンドシアニン、およびラバンドキノシンにのみ見出されている。そこで、次世代シーケンサーを用いて、CL190株とラバンドキノシン生産菌のドラフトゲノムシーケンスを行い、両菌株のテルペノイド生合成遺伝子を比較した。その結果、他の放線菌には存在せず、両菌株にのみ特異的に存在するプレニルジリン酸合成酵素遺伝子を見出すことに成功した。次に、組換えタンパク質を用いた実験や遺伝子欠損株の生産物の分析によって、この遺伝子産物がジメチルアリルジリン酸(DMAPP)からシクロラバンデュリルジリン酸(CLP)を合成する新奇プレニルジリン酸合成酵素であることを明らかにし、本酵素をシクロラバンデュリルジリン酸合成酵素(CLDS)と命名した。

また、ラバンドシアニンの生合成中間体としてフェナジン-1-カルボン酸(PCA)を同定し、*N*-プレニル化酵素(PTase)と FMO によって、PCA がラバンドシアニンへと変換されることも明らかにした。このプレニル基転移酵素がフェナジンの *N*-プレニル化、およびシクロラバンデュリル基の転移を触媒する初めてのプレニル基転移酵素であることを明らかにした。

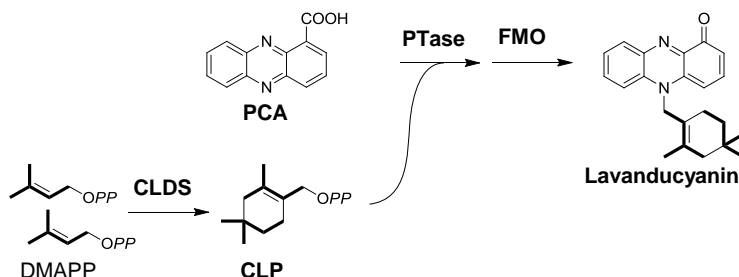


図 2 ラバンドシアニンの生合成経路

第三章 NovQ の機能解析¹

第三章では、アミノクマリン系抗生物質ノボビオシンの生合成に関与する *Streptomyces niveus* 由来の NovQ の機能解析を行った。初めに、NovQ が 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸のプレニル化を触媒することを明らかにした。

NphB や SCO7190 などの放線菌由来プレニル基転移酵素はその立体構造から ABBA プレニル基転移酵素とも呼ばれ、芳香族化合物に対して寛容な基質特異性を示す。NovQ や、NovQ と高い相同性を示す CloQ も ABBA プレニル基転移酵素に分類されるが、その基質特異性はこれまでに検討されてこなかった。そこで、NovQ の基質特異性を検討するために、様々な芳香族化合物のプレニル化反応を

試みた。その結果、他の ABBA プレニル基転移酵素と同様にフラボノイドやジヒドロキシナフタレンにプレニル化活性を示すことを明らかにした。また、NMR による反応産物の構造解析を行い、他のプレニル基転移酵素とプレニル化の位置選択性が異なることを明らかにした。NphB や SCO7190 がフラボノイドの A 環の 6 位の C-プレニル化や 7 位の O-プレニル化を触媒するのとは対照的に、NovQ が触媒するのは B 環の 3'位の C-プレニル化や 4'位の O-プレニル化であった。さらに、*p*-クマル酸などのフェニルプロパノイドにも活性を示すことを明らかにした。

第四章 フェナンスレンジオキシゲナーゼとプレニル基転移酵素を利用した構造多様性の創出²

放線菌由来の ABBA プレニル基転移酵素は基質とする化合物にフェノール性の水酸基を必要とする。一方、*Cycloclasticus* sp.由来のフェナンスレンジオキシゲナーゼは様々な置換ナフタレン類に対して活性を示し、この酵素による水酸基導入とそれに続く酸性条件での脱水反応によって、置換ナフタレン類にフェノール性水酸基を導入することが可能である。第四章では、これらのヒドロキシナフタレン類が、放線菌由来 ABBA プレニル基転移酵素の基質となることを期待して、フェナンスレンジオキシゲナーゼと放線菌由来 ABBA プレニル基転移酵素の反応を利用した置換ナフタレン類のプレニル化誘導体合成を試みた。

結果として 3 種の置換ナフタレン類を出発物質として、10 種のプレニル化誘導体を合成することに成功した。本章で得られた各化合物の抗酸化活性を測定し、フェノール性水酸基の導入によって抗酸化活性を獲得し、プレニル化によってその抗酸化活性が上昇することを明らかにした。

総括

本研究では、放線菌の生産するテルペノイドの生合成研究を通して、新たな生合成機構を提唱することができた。また、生合成研究から発見されたプレニル基転移酵素を利用して、新たなプレニル化化合物を創製することにも成功した。本研究の成果は、テルペノイドの構造多様性創出機構を解明する一助になると考えている。

- (1) Ozaki, T.; Mishima, S.; Nishiyama, M.; Kuzuyama, T. *J Antibiot* (Tokyo) **2009**, 62, 385.
- (2) Shindo, K.; Tachibana, A.; Tanaka, A.; Toba, S.; Yuki, E.; Ozaki, T.; Kumano, T.; Nishiyama, M.; Misawa, N.; Kuzuyama, T. *Biosci Biotechnol Biochem* **2011**, 75, 505.