

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 林 貴之
指導教員名 大西 康夫

論文題目

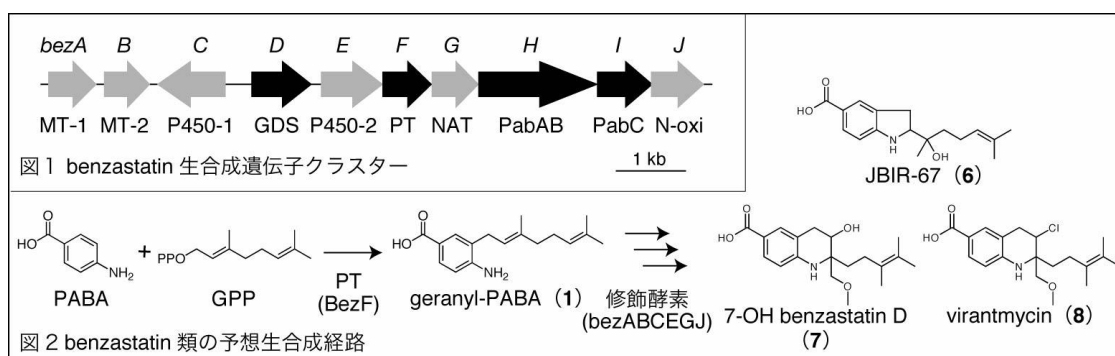
放線菌が生産するベンザスタチン類の生合成に関する研究

放線菌が生産する二次代謝産物としてベンザスタチン類が知られている。代表的なベンザスタチンである *virantmycin* は、塩素が結合している点、*tetrahydroquinoline* 骨格を有する点を特徴とするアルカロイドである。一方で、*Streptomyces* sp. RI-18 株（以下、RI-18 株）が生産するベンザスタチン類、JBIR-67 は *indoline* 骨格を有している。*tetrahydroquinoline* 骨格、*indoline* 骨格を有する化合物の報告は珍しいにも拘らず、ベンザスタチン類は両方の骨格を持つ化合物を含んでいる。このことから、ベンザスタチン類の生合成経路、生合成酵素に興味を持たれた。また、ベンザスタチン類は抗ウイルス、抗真菌、抗酸化、ヒト細胞に対する低酸素応答誘導といった多数の生理活性を持つことが知られている。このことから、ベンザスタチン類をリード化合物とした類縁体合成の基礎として、生合成経路の解明およびベンザスタチン類高生産株の構築が重要だと考えた。そこで本研究では、RI-18 株におけるベンザスタチン類の生合成経路、生合成酵素の解析を目標として研究を行った。

1、*Streptomyces* sp. RI-18 株におけるベンザスタチン生合成遺伝子クラスターの *in silico* 解析および生合成経路の推測

既知のベンザスタチン類の化学構造から、*p*-aminobenzoic acid (PABA) に geranyl 基が結合した geranyl-PABA が初期の中間体として合成されていることが推測された。まず、ベンザスタチン類生合成遺伝子クラスターの取得を目的として RI-18 株のドラフト

ゲノムシーケンス解析を行った。RI-18 株はベンザスタチンである *virantmycin*、JBIR-67、7-hydroxyl benzastatin D の生産菌である。得られたゲノムシーケンスにおいて、prenyltransferase 遺伝子および PABA 合成酵素遺伝子のゲノムスキニングを行ったところ、この両者を含む遺伝子クラスター (*bez* クラスター) が見出された (図 1)。このうち、ベンザスタチン生合成の主要な部分を担っていると考えられる遺伝子を *bezA-J* と名付け、以下のような生合成経路を推測した (図 2)。まず、PABA 合成酵素である BezHI が PABA を合成する。次に、prenyltransferase である BezF が PABA に geranyl 基を結合させ geranyl-PABA を合成する。さらに、修飾酵素である BezABCEGJ が修飾を行うことで、種々のベンザスタチン類を生産される。なお、BezA、BezB は methyltransferase、BezC、BezD は P450 monooxygenase と相同性を示した。BezG、BezJ はそれぞれ N-acetyltransferase、N-oxygenase と相同性を示すことから、環化反応に関与すると考えられた。一方、*virantmycin* には塩素が結合しているにもかかわらず、既知のハロゲン化酵素と相同性を有する酵素遺伝子は存在していなかった。



2、ベンザスタチン生合成遺伝子クラスターの同定

実際の実験として、まず *bezF* の異種発現を試みた。*Streptomyces lividans* において *bezF* を異種発現したところ、培地に PABA を添加した場合に化合物 **1** を生産した。**1** を単離精製し構造決定を行った結果、geranyl-PABA であった。この結果より、BezF は PABA に geranyl 基を結合させる新規な prenyltransferase であることが明らかになった (図 2)。次に、*bezA-J* のうち同一転写単位にコードされていると考えられた *bezD-J* の異種発現を試みた。その結果、化合物 **6** が生産された。JBIR-67 標品と溶出時間、MS/MS スペクトルを比較した結果、**6** は JBIR-67 であることが明らかになった (図 2)。さらに、*bezD-J* とともに *bezABC* を発現させたところ、化合物 **7** および化合物 **8** が生産された。標品との比較により、これらはそれぞれ 7-hydroxyl benzastatin D および virantmycin であることが明らかになった (図 2)。

以上より、*bez* クラスターがベンザスタチン生合成遺伝子クラスターであることが明らかになった。また、geranyl-PABA を BezEGJ が修飾することで JBIR-67 が、BezABCEGJ が修飾することで 7-hydroxyl benzastatin D および virantmycin が合成されることが明らか

になった。

3、ベンザスタチン生合成酵素遺伝子の機能解析

次に、ベンザスタチン修飾酵素である BezABCEGJ の機能解析を行った。まず、*bezF* に加えて *bezA*、*bezB*、*bezC* を様々な組合せで共発現させるプラスミドを作製し、形質転換株の代謝物を解析した（表グループ①）。その結果、BezA が geranyl-PABA の 13 位を methyl 化し methyl-geranyl-PABA (2) を合成することが明らかになった（図 3）。また、BezC が methyl-geranyl-PABA の 17 位を水酸化し、hydroxyl-methyl-geranyl-PABA (3) を合成することが明らかになった（図 3）。2、3 は単離精製し構造決定を行った。

次に、*bezA-J* 発現プラスミドから一つあるいは複数の修飾酵素遺伝子を除いたプラスミドを作製し、形質転換株の代謝物を解析した（表グループ③）。同様に *bezD-J* 発現プラスミドから修飾酵素遺伝子を除いたプラスミドを作製し解析した（表グループ②）。その結果、BezB が化合物 5 を methyl 化することで 7-hydroxyl benzastatin D (7) を合成することが示唆された（図 3）。また、BezG が geranyl-PABA (1) および methyl-geranyl-PABA (2) を 5 員環化し、それぞれ JBIR-67 (6)、methyl-JBIR-67 (4) を合成することが明らかになった（図 3）。4 は単離精製し構造決定を行った。BezE と BezJ はそれぞれクロル化酵素と 6 員環合成酵素のいずれかであることが示唆された。

表 各種異種発現株が生産するベンザスタチン

	genes	products							
		1 geranyl-PABA	2	3	4	5	6 JBIR-67	7 7-OH ben D	8 virantmycin
グループ①	<i>bezF</i>	○	×	×	×	×	×	×	×
	<i>bezFA</i>	○	○	×	×	×	×	×	×
	<i>bezFB</i>	○	×	×	×	×	×	×	×
	<i>bezFC</i>	○	×	×	×	×	×	×	×
	<i>bezFAB</i>	○	○	×	×	×	×	×	×
	<i>bezFAC</i>	○	○	○	×	×	×	×	×
	<i>bezFBC</i>	○	×	×	×	×	×	×	×
	<i>bezFABC</i>	○	○	○	×	×	×	×	×
グループ②	<i>bezD-J DbezDE</i>	○	×	×	×	×	○	×	×
	<i>bezD-J DbezG</i>	○	×	×	×	×	×	×	×
	<i>bezD-J DbezJ</i>	○	×	×	×	×	○	×	×
	<i>bezD-J</i>	○	×	×	×	×	○	×	×
グループ③	<i>bezA-J DbezBC</i>	○	○	×	○	×	○	×	×
	<i>bezA-J DbezAC</i>	○	×	×	×	×	○	×	×
	<i>bezA-J DbezAB</i>	○	×	×	×	×	○	×	×
	<i>bezA-J DbezC</i>	○	○	×	○	×	○	×	×
	<i>bezA-J DbezB</i>	○	○	○	○	○	○	×	×
	<i>bezA-J DbezA</i>	○	×	×	×	×	○	×	×
	<i>bezA-J DbezDE</i>	○	○	○	○	×	○	×	×
	<i>bezA-J DbezG</i>	○	○	○	×	×	×	×	×
	<i>bezA-J DbezJ</i>	○	○	○	○	×	○	×	×
	<i>bezA-J</i>	○	○	○	○	×	○	○	○
RI-18株	×	×	×	○	×	○	○	○	

グループ①は PABA を培地に加えて培養した

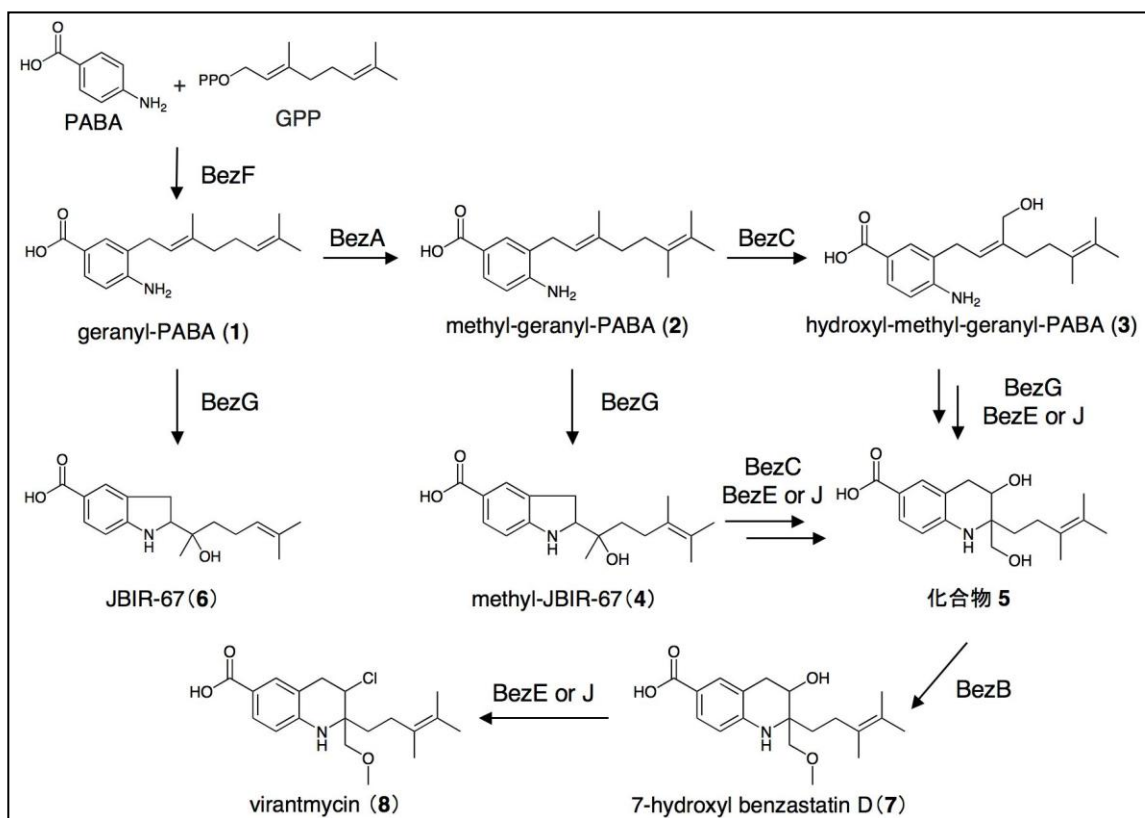


図3 本研究で示唆されたベンザスタチン生合成経路

化合物5は構造決定をしていないが、BezB (methyltransferase) を除くと7が合成されないこと、5の分子量が7よりmethyl基1つ分だけ小さいことから、このような構造 (demethyl-7-hydroxyl benzastatin D) だと考えられた。本研究結果では化合物5への生合成経路が2通り示唆された。実際には3、4のいずれかが5の中間体であり、いずれかはシャント化合物だと考えられる。

BezEあるいはBezJを除いたプラスミドはベンザスタチン全体の生産量が減少し、7、8を生産しなかった。消去法からBezEとBezJの機能はそれぞれクロル化と6員環合成のいずれかだと考えられた。

4、総括

本研究では *S. lividans* における異種発現実験により RI-18 株のベンザスタチン生合成経路、酵素遺伝子の解析を行った。その結果、新規なベンザスタチン1、2、3、4、5を明らかにすることができた。特に1、2、3、4については高生産株を作製することに成功した。また、分岐した複雑な生合成経路が明らかになったことから、JBIR-67 (6) は早い段階で分岐した最終産物であることが示された。生合成中間体としてクロル化した化合物が見出されなかったことから、7-hydroxyl benzastatin Dの水酸基がクロル基に置換されることでvirantmycinが合成されると推測された。

本研究により、ベンザスタチン生産に必要な十分な生合成酵素遺伝子群が明らかになった。その結果、全く未知であったベンザスタチンの tetrahydroquinoline 骨格、indoline 骨格合成経路・酵素について重要な知見が得られた。また、既知のハロゲン化酵素と相同性を持たない新規なクロル化酵素の存在を明らかにすることができた。