

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号: 12601

研究種目: 基盤研究(C)

研究期間: 2010~2012

課題番号: 22580089

研究課題名(和文) 有用物質産生へ向けたインドロカルバゾール生合成酵素反応機構の解析

研究課題名(英文) Characterization of indolocarbazole biosynthetic enzymes; for the application to the fine chemical production.

研究代表者

尾仲 宏康(ONAKA HIROYASU)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任教授

研究者番号: 80315829

研究成果の概要(和文):

インドロカルバゾール(ICZ)骨格は4つの生合成酵素によってトリプトファンを前駆物質として生合成される。本研究では、ICZの一種であるスタウロスポリン生合成酵素を用いた。StaDはインドールピルビン酸をカップリングする酵素であるが、反応経路における反応中間体を検出し構造決定を行った。また、StaC酵素がどのようにK252cの選択合成を行うかについての変異酵素を作出することにより解析を行った。

研究成果の概要(英文):

Indolocarbazole (ICZ) skeleton is biosynthesized from tryptophane as a precursor by four biosynthetic enzymes. In this study, the biosynthetic enzymes involved in staurosporine, one of ICZ are characterized. StaD is a coupling enzyme of two molecules of indolepyruvic acid. We detected the intermediate of the enzymatic reaction and determine the chemical structure. We then analyzed how StaC catalyzes the formation of K252c by using of mutated StaC.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野: 農学

科研費の分科・細目: 農芸化学・応用微生物学

キーワード: 遺伝学、応用微生物、抗生物質、発酵、バイオテクノロジー

## 1. 研究開始当初の背景

放線菌からしばしば発見されるインドロカルバゾール化合物群は強力な蛋白キナーゼ阻害活性があり、抗ガン剤として有望視されている (図1)。

複数のインドロカルバゾール類縁体が医薬品として臨床試験中であるほか、スタウロスポリンはプロテインキナーゼC等を用いた生化学実験の阻害剤としても汎用されている。我々は、生合成遺伝子を活用した新規インドロカルバゾール化合物の創製を目指し、インドロカルバゾール生合成機構解明を進めている。その先駆けとなるレベッカマイシンの生合成においては、2002年に Sanchez らが遺伝子クローニングし、翌年には我々により生合成経路の全貌が遺伝学的に解明された。これらの知見からインドロカルバゾール骨格は4つの酵素による3段階の酵素反応によってトリプトファンを原料にインドールピルビン酸のイミン体 (IPA imine)、クロモピロリン酸(CPA)を経て生合成される事が明らかとなった (図2)。これらの酵素反応はいずれも既知の酵素反応機構では説明できない事から、我々を含めいくつかの海外の

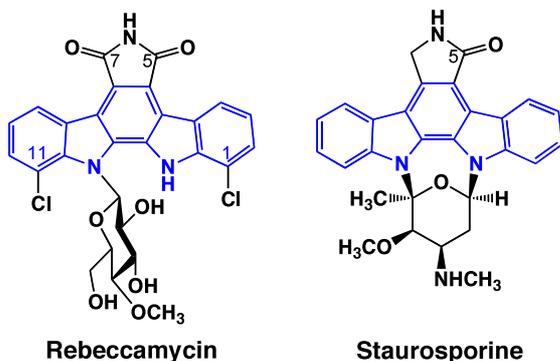


図1 本研究で用いるインドロカルバゾール化合物

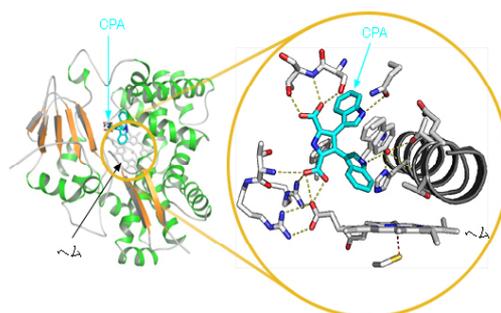


図3 シトクロムP450StaPの全体構造とCPA (拡大図中央シアン)が結合する部位の拡大図

グループが現在その詳細な反応機構解析に取り組んでいる。図2には本研究で用いたスタウロスポリン生合成経路内のインドロカルバゾール生合成経路を示している。

CPAは分子内C-C結合及び脱炭酸、酸化によりインドロカルバゾール骨格になる。この複雑な多段階反応を担っているのはP450StaPであった。本来ならばP450は水酸化反応のような分子状酸素添加反応を行うのが一般的であるが、インドロカルバゾール生合成においては3段階からなる複雑な反応を担っている。我々による結晶構造解析の結果、全体構造はP450であるにも関わらず、活性部位はむしろシトクロムcの構造に類似しており、このことからヘムが電子を引き抜くことでカチオンラジカルを形成させるペルオキシダーゼ様反応を触媒する珍しいP450である事が明らかとなっている (図3)。

## 2. 研究の目的

以上のようにインドロカルバゾール生合成機構には未知のユニークな酵素が関与していたが、StaPと共に関与する2つの酵素で

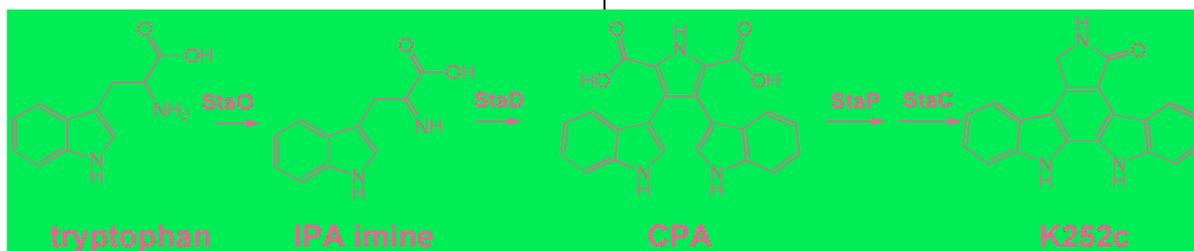


図2 これまでに明らかとなったインドロカルバゾール生合成経路

本研究で用いる *Streptomyces* sp. TP-A0274 由来のスタウロスポリン生合成経路を示している。

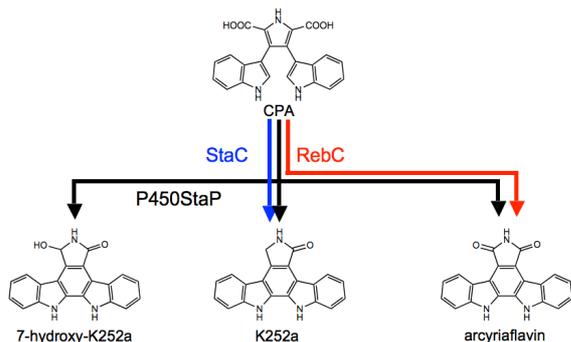


図4 StaC、RebCの反応スキーム

赤矢印は StaC, 青矢印は RebC の反応経路を示す。StaP 単独での反応経路は黒矢印で示す。StaP 単独では 3 種類を併産するが、その生産量は StaC、RebC 存在時に比べはるかに少ない

ある StaD、StaC においても新しい酵素反応機構が推測されている。そこで、本研究では StaD、StaC 酵素の結晶構造解析を行ない、それに基づき酵素反応機構を明らかにする。StaD は IPA imine を CPA に変換するヘム酵素であるが、ヘムへのエネルギー供給のための補酵素を必要としない自己完結型の酵素であるという特徴を有する。そこで、StaD がどのようにしてヘムを還元しているかについて特に明らかにする。StaC はインドロカルバゾール環内のピロール環酸化に関与する酵素である。StaC は、レベッカマイシン生合成におけるホモログ RebC とはアミノ酸配列上で 65% の高い相同性がみられるにも関わらず、基質を酸化する位置が異なる (図 4)。そこで、両者のピロール環酸化反応の違いについて特に明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) StaC の反応機構解析

インドロカルバゾール環形成の最後のステップはピロール環の酸化である (図 2)。この触媒反応を行なう酵素はフラビン要求性のモノオキシゲナーゼ・StaC である。P450 StaP 単独では、ピロール環 7 位の酸化状態が異なる 3 種類のインドロカルバゾールが併産されるが、StaC もしくはそのホモログである RebC が存在することで K252c あるいは arcyriaflavin を選択的に生産するようになる (図 4)。これら 3 種類の化合物の持つ生理活

性はそれぞれ異なるため、ピロール環 7 位の酸化反応のコントロールが可能になれば、有用インドロカルバゾールの選択的な醗酵生産が期待できるが、現時点では選択的反應機構の詳細は不明である。本研究では RebC の基質結合部位周辺のアミノ酸残基を StaC 型に変換した変異蛋白を遺伝子組換えにより作出し、7 位の酸化に関与するアミノ酸残基を特定する。

#### (2) StaD の結晶構造解析

StaD は IPA imine を CPA へと変換する巨大ヘム酵素であるが、相同性の高い既知蛋白はほとんど無く、その反応機構は明らかになっていない。また、ヘム酵素であるにもかかわらず、レダクターゼ等の補酵素を要求しない。そのため、どのような仕組みで IPA imine を酸化しているのかを既知の酵素反応から類推することが困難である。本酵素の反応機構が明らかになれば、インドロカルバゾール生合成に関する重要な知見が得られるだけでなく、一般的な酸化酵素の反応機構に関する新しい知見を得ることが期待できる。そこで、StaD を組換え蛋白として大量に発現させ、X 線結晶構造解析により立体構造を解明する。

### 4. 研究成果

#### (1) StaC の反応機構解析

StaC、RebC の大腸菌を用いた大量調整に成功したために、結晶化条件のスクリーニングを行った。しかしながら、StaC については結晶化には成功したが、フラビンの取り込みが安定せず、ホロ体とアポ体が共存し、良質な結晶を得ることが困難であった。また、我々が結晶化をしている最中に RebC の結晶構造解析結果がアメリカのグループより発表された。以上のことより、方針を変更し、RebC の結晶構造を基に、StaC の基質反応ポケットを推定し、両者の基質ポケットにおいて 3 カ所の異なるアミノ酸部位について両者のアミノ酸を入れ換えることによって産物の構造変化を測定した。RebC の基質結合部位周辺のアミノ酸残基を StaC 型に変換した変異蛋白および StaC の基質結合部位周辺のアミノ酸残基を RebC 型に変換した変異蛋白を遺伝子組換えにより作出した結果、F216V/R239N-RebC 二重変異体において、7

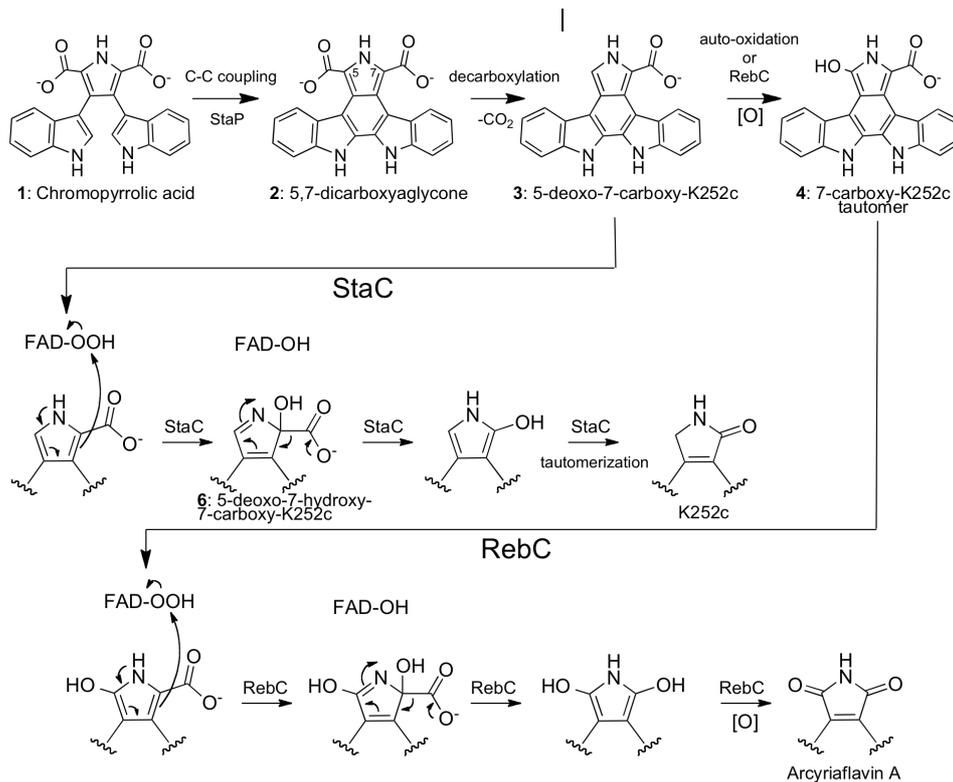


図5 本研究による解析から導かれる StaC 及び RebC の推定生合成経路

位の酸化パターンが RebC 型から StaC 型へ、また StaC 型から RebC 型へと変化した N244R/V246T-StaC 変異体の取得に成功した。以上の結果から、RebC, StaC の触媒機構は基本的には FAD を介して進み、基質ポケットの微妙な違いが図5に示すような酸化反応様式の違いに結びついていることが強く示唆された。

## (2) StaD の結晶構造解析

StaD の結晶化については大腸菌での発現に成功したが StaD の分子量が 100 kDa 程度と大きく、部分分解が見られたため、結晶化に適さなかった。そこで、本研究では StaD によるカップリング反応経路の詳細の決定を行った。

CPA 形成時にはインドールピルビン酸イミン 2 分子の β 炭素同士のカップリングとアミノ基の縮合反応が行われるが、その二段階の反応がどのように進むかは不明であった。これはインドールピルビン酸イミンから CPA へと至る経路中の反応中間体が検出できなかったためである。本研究では基質との共結晶構造からこの反応機構を推定することが目的であったが、前述のように結晶化が進まなかったために生化学的解析を行うこ

ととした。その結果、イミン体の代わりにインドールピルビン酸を基質として用いることにより、反応中間体のアナログの構造を検出することに成功した。本中間体の化学構造を NMR によって決定した結果、インドールピルビン酸の β 炭素同士がカップリングした中間体構造が同定できたことから、StaD の反応は C-C カップリングを行った後にアミノ基の縮合が進むことが示唆された。

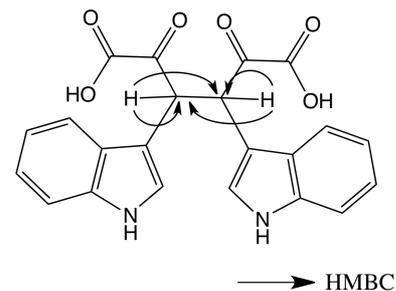


図6 本研究によって同定された StaD 反応中間体の構造。矢印は HMBC の相関を示している。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕（計 2 件）

1, S. Asamizu, S. Hirano, H. Onaka, H. Koshino, Y. Shiro, and S. Nagano. Coupling Reaction of Indolepyruvic Acid in the Presence of StaD and Its Product: Implications for Biosynthesis of Indolocarbazole and Violacein. *ChemBioChem* 13(17): 2495-2500 (2012) 査読有  
doi: 10.1002/cbic.201200535.

2, S. Asamizu, Y. Shiro, Y. Igarashi, S. Nagano, H. Onaka, Characterization and functional modification of StaC and RebC, which are involved in pyrrole oxidation of indolocarbazole biosynthesis. *Biosci Biotechnol Biochem.* 75(11): 2184-93 (2011) 査読有  
doi: 10.1271/bbb.110474

〔学会発表〕（計 1 件）

尾仲 宏康「放線菌由来へテロ環含有抗生物質の生合成に関する分子生物学的研究」日本農芸化学会中部支部会例会（20 年度日本農芸化学奨励賞受賞講演）2010/5/30 静岡市

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

尾仲 宏康 (ONAKA HIROYASU)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任教授

研究者番号：80315829