

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750382

研究課題名(和文) 生合成酵素を利用した新規teleocidin Bアナログの創製

研究課題名(英文) Functional analyses of teleocidin B biosynthetic enzymes

研究代表者

淡川 孝義 (Awakawa, Takayoshi)

東京大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80609834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Teleocidin Bは放線菌由来インドールテルペノイドであり、強力なprotein kinase C(PKC)活性化因子である。teleocidin B類縁体ライブラリー構築のため、その生合成酵素の反応解析、構造解析を行った。インドールにテルペノイド部を逆プレニル化するTleCの結晶構造解析を行い、その基質結合部位を明らかにした。teleocidin Bの環状テルペノイド合成に関わるメチル化酵素TleDの反応をin vitroで詳細に解析した。本反応はメチル化によってテルペン環化が引き起こされる初めての例であった。本研究によって新たなPKC活性化因子合成に関わる有用な知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Teleocidin B is a unique indole alkaloid, with an indolactam and a monoterpenoid moiety from *Streptomyces blastomyces*. This compound is also known as a potent protein kinase C activator, which is valuable pharmaceutically. We analyzed a prenyltransferase (TleC) and a methyltransferase (TleD) involved in teleocidin B biosynthesis. We analyzed the crystal structure of TleC, and identified its substrate-binding site. This is the first report of the structural analysis of prenyltransferase which forms C-C bond between C-3 of prenyl moiety and indole ring. With in vitro studies, we showed that TleD not only installed a methyl group on the geranyl moiety of the precursor, but also facilitated the nucleophilic attack to form the indole-fused six-membered ring. This is the first demonstration of a cation, generated from methylation, triggering successive terpenoid-ring closure. These results will pave the way for future studies to produce useful teleocidin B analogues by enzymes.

研究分野：生合成、酵素工学

キーワード：生合成 インドールテルペノイド テルペン環化 PKC activator

1. 研究開始当初の背景

Teleocidin B (図 1A)は放線菌 *Streptomyces blastmyceticus* 由来のインドールテルペノイドであり、protein kinase C (PKC)の強力な活性化因子として注目を集めてきた。PKCの活性化因子は、発ガンプロモーターとして知られる一方、抗腫瘍活性を持つ化合物も存在し、活性化因子の構造を元に抗腫瘍化合物のデザインに成功した例も存在する(Nakagawa *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol.76, 2012, pp.1262, Sodeoka *JACS*, Vol.120, 1998, pp.457)。Teleocidin Bは、これまで前駆体投与実験により、tryptophan由来のインドール、プレニル側鎖より生合成されることが分かっていたが、その生合成は未知であった(Irie *Tetrahedron Lett.*, Vol.31, 1990, pp.101, Irie *Tetrahedron Lett.*, Vol.39, 1998, pp.7929)。よって、その生合成反応を明らかにすることで、有用物質生産につながる有益な知見が得られる。また、teleocidin Bは、その構造より新規生合成反応を含むと考えられ、それらを解析することによって、学術的にも価値の高い知見が得られると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、放線菌 *S. blastmyceticus* より、teleocidin B 生合成に関わる生合成酵素遺伝子を同定し、その酵素反応を明らかにすることを目的とした。特に、インドール環の逆プレニル化、テルペノイド環の環化など、興味深い反応を触媒する酵素については、結晶構造解析を行い、その反応機構の詳細を明らかにする。本研究により、teleocidin Bの詳細な合成機構が解明されることで、生合成酵素のエンジニアリングへの道が開け、環境に優しい生合成反応を用いた、広範な teleocidin B 類縁体ライブラリーの構築が可能となる。これら類縁体より有用 PKC 活性化物質が見出されることが期待される。

3. 研究の方法

共同実験者の徳島文理大学の伊藤卓也博士の協力のもと、*S. blastmyceticus* のゲノムシーケンスを行い、その中から、ラン藻由来化合物である lyngbyatoxin A (図 1B)合成に関わる非リボソームペプチド合成酵素、P450酸化酵素、プレニル基転移酵素(Edward & Gerwick *JACS*, Vol.126, 2004, pp.11432)のホモログ遺伝子(*tleABC*)を見出した。Lyngbyatoxin Aは構造類似性より、teleocidin Bの前駆体であると考えられるため、これらの酵素が teleocidin B の生合成に関わることが強く示唆された。

(1) プレニル基転移酵素 TleC の構造解析

TleCは geranyl diphosphate (GPP)の3位より、indolactam Vの7位に求電子置換する反応(図 1B)を触媒すると考えられる。プレニルニリン酸の1位より求電子置換するプレニル化反応に対して、3位から置換する反応を逆プレニル化と呼ぶが、GPPの逆プレニル化は稀で

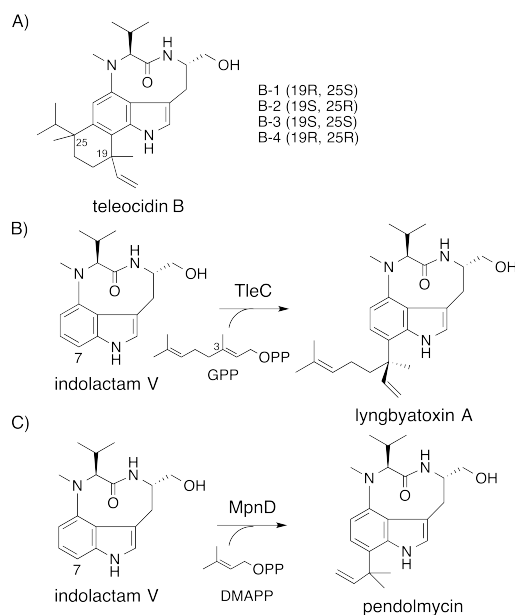


図 1 Teleocidin B の化学構造(A)、TleC (B)、MpnD(C)のプレニル化反応

あり、TleCの構造活性相関に興味を持たれる。そこで、TleCの酵素タンパク質を大腸菌を用いて大量調製し、高純度タンパク質溶液を用いてタンパク質結晶を取得し、X線結晶構造解析を行う。また、基質となる indolactam V、diphosphate アナログであるチオニリン酸との共結晶を取得し、解析することで、その基質認識に関わる部位、反応機構を詳細に解析する。同時に C5 の DMAPP を基質として、indolactam V より pendolmycin を生成する MpnD (Ma *ChemBiochem*, Vol.13, 2012, pp.547, 図 1C)の結晶構造解析を行い、両者の比較により、基質認識の差異を詳細に解析する。野生型酵素、または部位特異的変異導入によって改変した酵素を用いて、indolactam V アナログまたは様々な鎖長のプレニルニリン酸を用いて *in vitro* 反応を行い、触媒機構の拡張を試みる。

(2) プレニル基環化に関わる酵素の探索

Lyngbyatoxin Aのプレニル部位はメチル化、環化されることによって teleocidin B へと変換されると予想される。インドール環とテルペノイド部が融合した cyclohexane 環は大変珍しい骨格であり、その骨格導入機構に興味を持たれる。そこでその生合成に関わる酵素の探索のために、まず *tleABC* を含む遺伝子領域を放線菌 *Streptomyces lividans* 内で異種発現し、lyngbyatoxin A の変換反応によって teleocidin B が生成するか HPLC 分析によって試験する。変換が起きた場合、*tleABC* 周辺より候補遺伝子を探索する。変換が起きなかった場合、その他の遺伝子領域より C-メチル化酵素遺伝子の酵素遺伝子を取得し、*tleABC* と共発現し、生成物を分析することでスクリーニングを行う。異種発現によってスクリーニングされたメチル化、環化酵素を調製し、lyngbyatoxin A を基質として用いて *in vitro* 反

応を行う。

4. 研究成果

(1) TldC、MpnD を His-tag 末融合タンパク質として大腸菌生体内で発現させ、Ni-キレートアフィニティーカラム、ゲル濾過カラムを用いて精製した。精製した酵素を用いて結晶化スクリーニングを行った結果、TldC、MpnD とともに硫酸アンモニウムを沈殿剤とする結晶化条件で結晶が再現性よく得られた。X 線回折強度データの収集は、Photon Factory の構造生物学ビームライン (PF-AR NW12A) を利用した。TldC の結晶構造は、Se-Met 誘導体結晶を用いた SAD 法で決定し、MpnD の結晶構造は、TldC をモデルとした分子置換法で決定した。TldC の野生型結晶と Se-Met 誘導体結晶の全体構造をそれぞれ 1.95 Å、2.11 Å の分解能で決定することに成功した。さらに、MpnD の apo 体構造を 1.6 Å、indolactam V と DMAPP アナログの DMSPP との複合体構造を 1.4 Å の分解能で決定した。TldC や MpnD の全体構造は他のインドールプレニルトランスフェラーゼと同様な $\alpha\beta\beta\alpha$ フォールディングを有していた (図 2A)。diphosphate を認識する部位は多くの塩基性アミノ酸とチロシンが存在し、水素結合を形成することで、diphosphate を安定化させていた。また、indolactam V の結合部位においては、E106、K297、N367 (TldC numbering) が水素結合を形成することで、強固に indolactam V を結合することが明らか

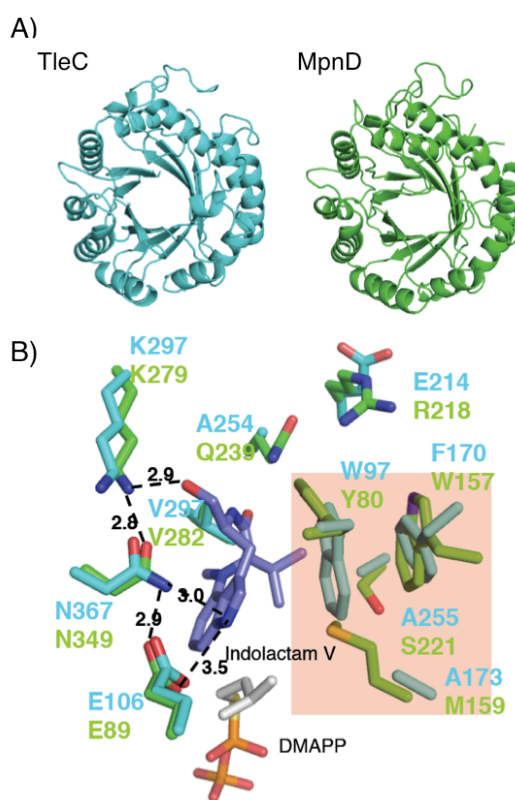


図 2 TldC、MpnD の全体構造 (A)、indolactam V、diphosphate の結合位置 (B) (青: TldC、緑: MpnD)

となった (図 2B)。これらの残基に関しては TldC、MpnD 間でアミノ酸残基の種類、およびその位置がよく保存されていた。一方、prenyl 基の結合部位においては TldC、MpnD 間でその配列、および配向が大きく異なっており、これらの違いがプレニル基の長さの認識に大きな役割を担っていることが考えられた。そこで、TldC のアミノ酸残基を MpnD の残基へと変異した W97Y、F170W、A173M 三重変異体を作成し、活性評価を行った。その結果、TldC 変異体は GPP に対して顕著な活性の低下を示したにもかかわらず、DMAPP に対しては野生型と同程度の活性を維持していた。以上より、TldC と MpnD で特異的に置換されているこれらのアミノ酸残基がイソプレノイド基質の基質特異性に重要な役割を担っていることが示された。

(2) *tleABC* を含む fosmid を改変し、放線菌 *S. lividans* に導入した。Teleocidin 生産培地で培養し、菌体内蓄積物を HPLC 分析した結果、teleocidin 前駆体で、鎖上のテルペノイド骨格を持つ lyngbyatoxin A が生産されていることが判明した。この結果より、*tleABC* を含む遺伝子クラスター外にメチル化、環化に関わる酵素遺伝子が存在することが示唆された。そこで、*S. blastomyceticus* の C-methyltransferase のうち、RT-PCR 法によって転写が確認された 6 遺伝子を *tleABC* 放線菌に導入し、生産物を HPLC 分析した。その結果、ステロール、または GPP の C-methyltransferase と相同性を持つ、特定の遺伝子を導入した場合のみ、teleocidin B が生産されることが明らかとなった。この遺伝子を TleD と命名した。大腸菌を用いて調製した TleD 酵素に対して lyngbyatoxin A、SAM を基質として用いることで、*in vitro* 反応を行った所、teleocidin B が生成され、TleD のみで lyngbyatoxin A のメチル化、環化反応に十分であることが示された。

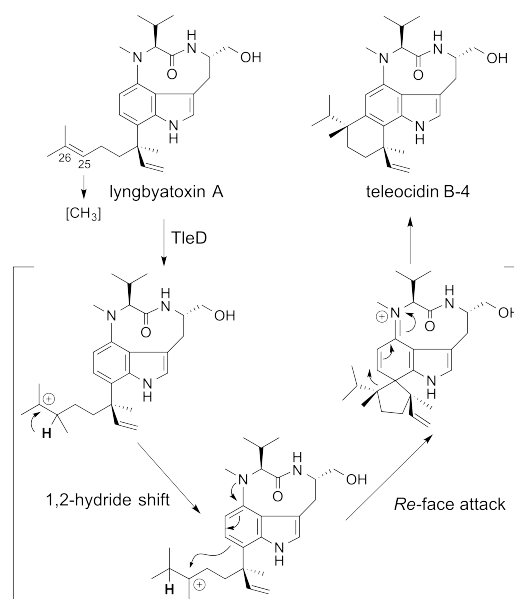


図 3 TleD による新規テルペン環化反応

以上より、lyngbyatoxin A は TleD によって 25 位の methyl 化を受け、水素原子の 26 位へのシフト、環化中間体の形成を経て、teleocidin B へと変換される生合成機構が示された(図 3)。25 位の重水素ラベル lyngbyatoxin A を化学、酵素合成して基質に用い、生成物の重水素の位置を NMR にて解析し、実際に水素原子のシフトが起きることを確かめた。本結果は、メチル化反応が引き金となって、terpenoid の環化が起きる生合成反応を示した初めての例であった。現在、その触媒の構造活性相関を示し、異なる構造の基質への応用のために、TleD の結晶構造解析を行っており、アポ体の結晶を 2.80 Å の分解能で取得済である。更なる結晶化条件の最適化の後、精密な構造解析を行う予定である。

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 1 件)

① Awakawa, T., Zhang, L., Wakimoto, T., Hoshino, S., Mori, T., Ito, T., Ishikawa, J., Tanner, M. E., Abe, I., A methyltransferase initiates terpene cyclization in teleocidin B biosynthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 136, 2014, pp. 9910-9913. DOI: 10.1021/ja505224r 査読あり

[学会発表] (計 8 件)

①Mori, T., Awakawa, T., Zhang, L., Wakimoto, T., Hoshino, S., Ito, T., Ishikawa, J., Tanner, M. E., Abe, I. 「Functional analysis of prenyltransferase TleC」 1st European Conference on Natural Products, 2013年9月23日～9月25日、Frankfurt, Germany

②Mori, T., Awakawa, T., Zhang, L., Wakimoto, T., Hoshino, S., Ito, T., Ishikawa, J., Tanner, M. E., Abe, I. 「Function analyses of indole prenyltransferases TleC and MpnD」 Gordon Research Conference – Marine Natural Products, 2014年3月2日～3月7日、Ventura, USA

③星野 翔太郎、張 驪驛、淡川 孝義、伊藤 卓也、脇本 敏幸、阿部 郁朗、「放線菌異種発現系を用いた新規teleocidin類アナログの創出」日本農芸化学会2014年度大会、2014年3月27日～3月30日、神奈川県川崎市

④森 貴裕、張 驪驛、淡川 孝義、脇本 敏幸、森田 洋行、阿部 郁朗、「放線菌由来新規インドールプレニルトランスフェラーゼ TldC と MpnD の X 線結晶構造解析」日本薬学会

134年会、2014年3月27日～3月30日、熊本県熊本市

⑤森 貴裕、張 驪驛、淡川 孝義、脇本 敏幸、森田 洋行、阿部 郁朗、「放線菌由来新規インドールプレニルトランスフェラーゼ TldC と MpnD の X 線結晶構造解析」第29回日本放線菌学会大会、2014年6月19日～6月20日、茨城県つくば市

⑥Awakawa, T., Mori, T., Zhang, L., Wakimoto, T., Hoshino, S., Ito, T., Ishikawa, J., Tanner, M. E., Abe, I. 「Cyclohexene ring formation facilitated by methylation of the prenyl chain in teleocidin B4 biosynthesis」 248th ACS National Meeting & Exposition, 2014年8月10日～8月14日、San Francisco, USA

⑦森 貴裕、淡川 孝義、張 驪驛、星野 翔太郎、脇本 敏幸、森田 洋行、伊藤 卓也、石川 淳、阿部 郁朗、「Teleocidin類の生合成機構の解明」第56回天然有機化合物討論会、2014年10月15日～10月17日、高知県高知市

⑧Awakawa, T., Mori, T., Zhang, L., Wakimoto, T., Hoshino, S., Ito, T., Ishikawa, J., Tanner, M. E., Abe, I. 「A methyltransferase initiates terpene cyclization in teleocidin B biosynthesis」 Natural Product Discovery & Development in the Post Genomic Era by Society for industrial microbiology and biotechnology, 2015年1月11日～1月14日、San Diego, USA

[図書] (計 0 件)

[その他]

東京大学大学院薬学系研究科天然物化学教室 <http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~tennen/head.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者
淡川 孝義 (AWAKAWA, Takayoshi)
東京大学・大学院薬学系研究科・助教
研究者番号：80609834