

平成 21 年 6 月 11 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18710189
 研究課題名 (和文) 放線菌由来芳香族ポリケタイド化合物の生合成における酸化・水酸化機構の研究
 研究課題名 (英文) Functional Studies on Monooxygenase/Hydroxylase involved in the biosyntheses of aromatic polyketides
 研究代表者
 田口 貴章 (TAGUCHI TAKAAKI)
 武蔵野大学・薬学研究所・助教
 研究者番号：80409383

研究成果の概要：

一般に、抗生物質の生合成における後期修飾過程は、化合物の構造や物性、ひいては生理活性を大きく変える過程であり、その詳細な反応経路・反応機構の解明は、新薬創製を目指す上で必要不可欠なものである。

Streptomyces coelicolor A3(2)の生産する芳香族ポリケタイド抗生物質 actinorhodin (ACT)の生合成後期修飾過程においても二段階の酸化反応が必要であり、これら反応は生合成酵素 ActVA-6 および ActVA-5 によってそれぞれ触媒されると考えられてきた。しかし、ACT の類縁化合物の生合成研究が進み得られた知見から、以前に提唱されてきた ActVA-6, ActVA-5 の酵素機能と生合成仮説に疑いが生じた。よって、ActVA-6, ActVA-5 の生合成経路における真の機能を解明すべく、遺伝子破壊体および遺伝子再構築系の組換え体を作成し代謝産物を分析した。また、ActVA-6, ActVA-5 それぞれを大腸菌で発現し、精製したタンパクと各種アナログ基質を用いて酵素機能を検討した。こうした *in vivo*, *in vitro* 両実験系から、ActVA-5, ActVA-6 に関する重要な知見を新たに得ることに成功し、以前とは異なる新たな生合成仮説を提唱することができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
18年度	1,500,000	0	1,500,000
19年度	1,300,000	0	1,300,000
20年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	210,000	3,710,000

研究分野：天然物化学

科研費の分科・細目：

キーワード：放線菌、アクチノロジン、生合成、hydroxylase、monooxygenase、actVA-ORF5、actVA-ORF6

1. 研究開始当初の背景

微生物や植物の生産する二次代謝産物の

多くは複雑な構造を有し様々な生理活性を示す。こういった天然有機化合物には、現在の有機合成化学技術では実現困難な構造が

多く残されており、分子生物学的手法の発展は、微生物、特に放線菌の抗生物質生合成の多面的な研究と解明を可能にし、人工的な遺伝子改変や、発現タンパクを用いた試験管内での生合成の再現・改変を可能にし、ひいては新規生理活性物質の創製への応用が期待できる。

Type II polyketide synthase (PKS)を含む一連の酵素群によって生合成される放線菌由来芳香族ポリケタイド化合物には、doxorubicin (adriamycin) のように抗菌活性だけでなく抗腫瘍活性を示すものも比較的多く発見されており、臨床への応用が期待されている。ポリケタイド生合成のこれまでの研究の多くは生合成初期に焦点が当てられてきたが、最終産物の構造および活性の多様性は、主に生合成後期修飾過程で生じるものであるから、後期修飾過程の解明は、生合成工学的に新規化合物を創製するうえで重要である。

本研究では、*Streptomyces coelicolor* A3(2) の生産する芳香族ポリケタイド抗生物質 actinorhodin (ACT, Fig.1)を題材として用いる。ACTはナフタザリンニ量体という特異な構造を有し、酸性で赤色、アルカリ性で青色を呈することからその生産の有無を視覚的に簡便に検出できる。このため 1960年代の早い時期から生合成研究が進められ、その成果は放線菌遺伝学の進展にも大きく寄与した。

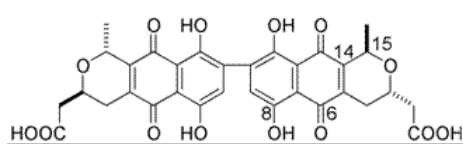


Fig.1 Actinorodin (ACT) の構造

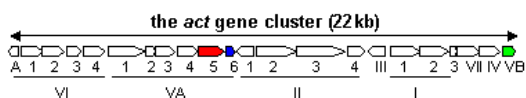


Fig.2 ACT 生合成遺伝子クラスター
赤色: *actVA-5*, 青色: *actVA-6*, 緑色: *actVB*

ACT の生合成は、ゲノム上 22 遺伝子からなる 22kbp の大きさの生合成遺伝子クラスターによって制御されている。これら 22 個の遺伝子それぞれの機能が、生合成経路とともに明らかにされてきたが、機能未知の遺伝子がまだ複数存在しており、それらは特に生合成後期の修飾過程 (tailoring steps) に関わるもので、この tailoring steps の全貌はまだ明らかにされていない。加えて、これまでに提唱されてきた遺伝子機能は、塩基配列およびその遺伝子産物のアミノ酸の一次配列

の相同性から推定されたものが多く、実験的な検証の結果、推定遺伝子機能および推定生合成経路を改める必要がでることもしばしばである。

また、生合成の遺伝子・酵素・機能については、かつては「一遺伝子・一酵素・一機能」というように遺伝子産物の機能は一義的なものと思われていたが、実際には、ひとつの酵素が数段階の反応に関与しているケースや、他の酵素が補酵素的に機能し共同して一つの機能を発現することもあることが判明してきたため、生合成研究は慎重に進める必要があると、認識されるようになった。

2. 研究の目的

化合物の生合成における酵素の添加は、化合物の極性や物性、ひいては生理活性を大きく変化させるため、新規医薬品またはそのリード化合物の創製を目指すうえで、詳細に理解しなければならないものである。この観点から、ACT 生合成後期修飾過程における 2 段階の必須の酸化反応、すなわち、生合成中間体 6-deoxydihydrokalafungin (DDHK) 6 位への酸素添加によるキノン形成と、それに続く dihydrokalafungin (DHK) 8 位への水酸基導入 (Fig.3) もまた、その制御機構を解明すべき重要な問題である。

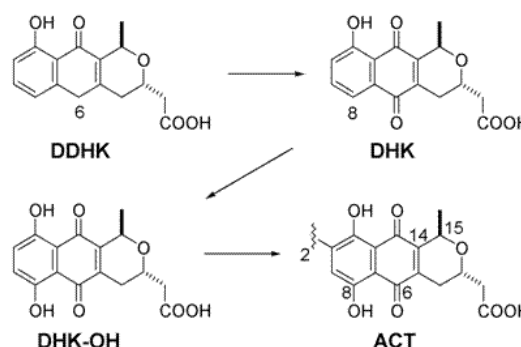


Fig. 3 ACT 生合成後期修飾過程における二段階の酸化反応スキーム

ACT 生合成遺伝子の塩基配列解析から、*actVA-6* は他の monooxygenase に相同性を示し、また遺伝子クラスター中 *actVA-6* の上流に位置する *actVA-5* が他の芳香族ポリケタイドの生合成に関わる hydroxylase に相同性を示した。このことから、*actVA-6* のコードするタンパク ActVA-6 が 6 位キノン形成、つまり DDHK から DHK への変換 (Fig.3) を触媒し、ActVA-5 が DHK の 8 位水酸化 (Fig.3) を触媒すると推定された。これらの知見に基づき、ActVA-6 の精製タンパクは *in vitro* assay 系で DDHK の四環性アナログ基質に

酸素を添加しキノンを形成することが示された。さらにタンパクの結晶化と X 線結晶解析も行われ、得られた結果はこの機能仮説を支持するものであった。(Sciara, G., *et al.*, (2003) *EMBO J.*, 22, 205-215.)

一方、ActVA-5 についても *in vitro* 実験系での検討が行われ、嫌気性条件下で、変換効率が低いながらも、DHK (Fig.3) の 8 位を水酸化すること、さらに ActVA-5 が hydroxylase として機能するためには、flavin:NADH oxidoreductase として機能する ActVB が必須であることが示された。(Valton, J., *et al.*, (2006) *J. Bio. Chem.*, 281, 27-35.)

上に述べたように、バイオインフォマティクスおよび生化学的検討から、ActVA-6 が 6 位キノン形成を触媒し、ActVA-5 が ActVB と two-component system を構築し 8 位水酸化を触媒するという推定は理に適っているようにみえる。しかしながら、ACT の類縁化合物である granaticin (GRA と略、*S. violaceoruber* Tü22 由来) および medermycin (MED と略、*Streptomyces* sp. AM-7161 由来) の生合成遺伝子クラスターを ACT のそれと比較すると、GRA, MED とともに構造上 6 位にはキノンが形成されているにもかかわらず、遺伝子両クラスターに ActVA-6 の相同遺伝子は存在せず、かわりに ActVA-5, ActVB はよく保存されている。さらに、MED は構造上 8 位に水酸基がないことから、MED クラスター中の ActVA-5 相同遺伝子産物が hydroxylase として機能しているとは考え難い。

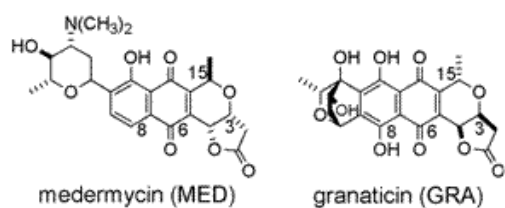


Fig.4 GRA と MED の構造

こういった状況に基づき、「actVA-5 がコードするタンパクは、hydroxylase に相同性を示しながらも水酸化ではなく酸化を触媒する新規の monooxygenase である」という仮説を新たに立て、この仮説について再度詳細に検討し、特に *in vivo* での ActVA-6, ActVA-5 両酵素の機能と生合成経路への関連を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

i) 遺伝子破壊体の代謝産物分析

まず、*S. coelicolor* M510 株を親株 (以降 wild type, WT と表記) として *actVA-6* 破壊体 (以降 $\Delta actVA-6$ と表記)、*actVA-5*・*actVA-6* 二重破壊体 ($\Delta actVA-5,6$) を作成した。*actVA-5* は *actVA-6* の上流に隣接し翻訳共役しているため、*actVA-5* 破壊は *actVA-6* にも影響を与えることが想定されたため、二重破壊体とした。

ActVA-5 が *in vitro* assay で 8 位水酸化活性を示すには ActVB が必須であるという Valton らの知見から、ActVB 破壊体 ($\Delta actVB$) と、さらに *actVA-6*・*actVB* 二重破壊体 ($\Delta actVA-6\Delta actVB$) を作成した。

$\Delta actVA-5,6$ については、*actVA-5*, *actVA-6* それぞれを単独で導入した相補株を作成し、相補実験も行った。

作成した破壊体はすべて、WT と共に R5MS 寒天培地および R5MS 液体培地で培養し、液体培養については培地上清を直接 HPLC に供し、培地中の代謝産物を分析・比較した。

ii) 遺伝子再構築系による機能検討

S. coelicolor A3(2) から ACT 生合成遺伝子クラスター全域を欠損させた株 CH999 に、生合成遺伝子を必要とされる順番で導入していくと、生合成の途中までの経路を再構築し、中間体、もしくは shunt product を生産させることができる。

上記方法 i) で得られた知見に基づき、生合成の途中段階までを再構築することを試みた。この際に得られた *S. coelicolor* CH999 の組換え体の代謝産物については、i) と同様に培養・HPLC 分析を行った。

iii) *in vitro* 実験系での機能解析

i), ii) で *in vivo* での機能を検討した ActVA-6, ActVA-5, ActVB について、His-tag 融合タンパクを大腸菌で発現させ、ニッケルキレートカラムで精製したタンパクを用いて *in vitro* assay を行った。アナログ基質には emodinanthrone など、構造の類似している市販品を用いた。(次の「成果」項目を参照。)

Assay mixture の組成は既報 (Valton, J., *et al.*, (2006) *J. Bio. Chem.*, 281, 27-35.) に従ったが、反応は通常の酸素濃度条件化で行った。反応後の酢酸エチル抽出物を LC/TOF-MS にて分析した。

4. 研究成果

i) 遺伝子破壊体の代謝産物分析

WT、 $\Delta actVA-6$ 、 $\Delta actVA-5,6$ を同条件で培養し、培地中の代謝産物を HPLC で分析・比較したところ、 $\Delta actVA-6$ の代謝産物プロファイルは WT のそれとほぼ同様で、最終産物 ACT および ACT のラクトン体である γ -ACT、 γ' -ACT を同程度生産した。このことから、 $\Delta actVA-6$ の *in vivo*における生合成への寄与はわずかなものであると考えられた。

これに対して、 $\Delta actVA-5,6$ は ACT 類を一切生産せず、代わりに新規黄色化合物を蓄積することが明らかとなった。この新規化合物を単離・精製し、併せて[1,2- ^{13}C]酢酸の取込実験も行い、新規の perylenequinone 型 shunt product であると構造決定し、actinoperlylone (ACPL)と命名した。ACT 生合成における 6 位キノン形成とは、生合成中間体 DDHK の 6 位に酸素が添加される反応であるが、ACPL の構造は、DDHK の 6 位に酸素が添加されることなく二量化したことを示唆するものであった (Fig.5)。

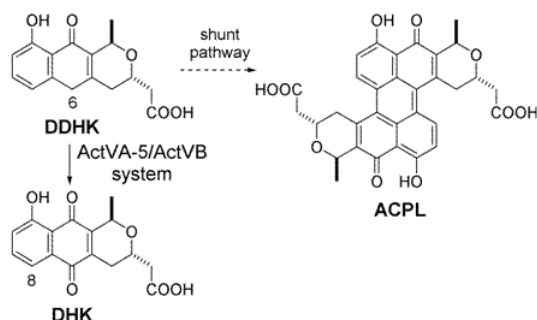


Fig. 5 Actinoperlylone の構造と推定生成経路

また、 $\Delta actVA-5,6$ に *actVA-5*、*actVA-6* それぞれを単独で導入した相補実験において *actVA-5* で相補した場合のみ、ACT 類の生産が回復することを確認した。

以上の結果から、6 位キノン形成について、この反応を触媒するとそれまで信じられてきた *ActVA-6* の寄与はわずかであり、*ActVA-5* が主に機能し触媒していることを示した。

続いて、 $\Delta actVB$ が ACT 類 (WT の 30% 程度の量) と ACPL を同時に生産・蓄積することが明らかとなった。このことは、「*in vivo*においても *ActVA-5* が機能するには *ActVB* が必要であるが、*actVB* 破壊により *ActVA-5* が機能しなくなったために生合成が DDHK で止まり ACPL が蓄積された。ただし、*ActVA-6* は存在しており、わずかながら 6 位キノン形成を触媒したために少量の ACT 類と ACPL が同時に蓄された」ということを示唆すると説明できる。

さらに $\Delta actVA-6\Delta actVB$ は ACPL のみを蓄積することが明らかとなり、上の説明を支持

するものであった。

ここまでの小括として、ACT 生合成における 6 位キノン形成を主に触媒するのは *ActVA-5* と *ActVB* によって構成される two-component monooxygenase system であり (Fig.5)、*ActVA-6* は、*ActVB* が機能しなくなったときに代替経路として機能する、という推定経路を新たに提唱した。

ii) 遺伝子再構築系による機能検討

これまで判明している ACT 生合成経路では、生合成中間体 (*S*)-DNPA の 14,15 位の二重結合が立体特異的に還元され DDHK に変換され、この DDHK の 6 位に酸素が添加されキノンが形成され DHK に変換される。この (*S*)-DNPA から DDHK への立体特異的還元は *ActVI-2* が触媒すると、塩基配列の相同性および遺伝子破壊実験から考えられてきたが、実験による直接的な証拠は得られていなかった。そこで、(*S*)-DNPA の生合成までに必要な遺伝子すべてを有する plasmid, pIJ5660 と、ここに *actVI-2* を加えた pIJ5658 の 2 種の plasmid で *S. coelicolor* CH999 形質転換し、得られた形質転換体の代謝産物を比較した。

結果、CH999/pIJ5660 が確かに (*S*)-DNPA を生産するのに対し、*actVI-2* を加えた CH999/pIJ5658 から (*S*)-DNPA は検出できず、代わりに ACPL が蓄積されることが明らかとなった。ACPL は DDHK のであるから、この結果から、*ActVI-2* はたしかに、(*S*)-DNPA を還元し DDHK を与える、ということを実証したといえる。

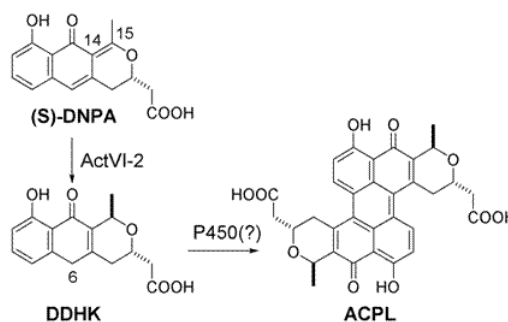


Fig.6 *ActVI-2* による (*S*)-DNPA から DDHK への変換と ACPL の生成

尚、DDHK が二量化して ACPL となるには、他の酵素による触媒が必要と思われる、他の研究例から、P450 が関与している可能性が高い。しかしながら ACT 生合成遺伝子クラスターには P450 型遺伝子は存在しない。よって、DDHK から ACPL への二量化は、ACT 生合成遺伝子クラスターの外にある P450 遺伝子が関与する可能性が高い。

iii) *in vitro* 実験系での機能解析

6 位キノン形成反応の基質となるのは DDHK であるが、安定性の問題から単離は不可能である。そこで、構造が比較的類似している emodinanthrone をアナログ基質として、*in vitro* でのキノン形成活性を検討した。

ActVA-6 は他の補酵素を一切必要とせず、*in vitro* で emodinanthrone を emodin に変換することを確認した。(Fig.7)

一方、ActVA-5 は、ActVB, NADH, FMN が共存した場合のみ 6 位キノン活性を示し、emodinanthrone を emodin に変換することを確認した。また、emodinanthrone と構造の類似している三環性化合物である anthrone、dithranol もアナログ基質として検討したところ、それぞれ anthraquinone および chrysazin に変換されること (Fig.7)、つまり ActVA-5/ActVB system はこれらの化合物に対してもキノン形成活性を示すことを明らかにした。

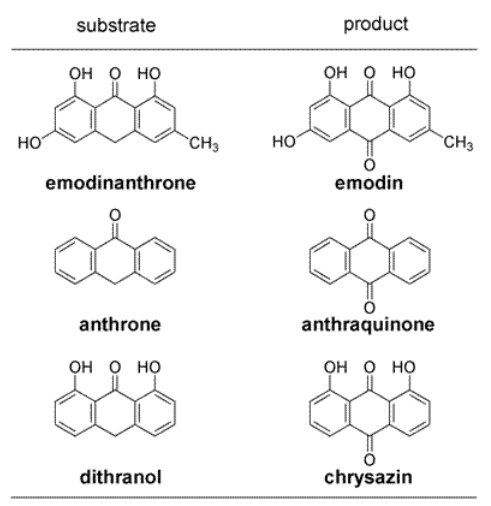


Fig.7 ActVA-5/ActVB system の *in vitro* 反応で用いたアナログ基質および反応生成物

なお、この反応系において、emodinanthrone、anthrone、dithranol のそれぞれの構造上、ACT の 8 位に相当する部分が水酸化された化合物を検出することはできなかった。

また、この 6 位キノン形成が確認できる条件で、これまで 8 位水酸化の基質と思われてきた DHK を *in vitro* assay 系に供したところ、Valton らが DHK-OH (Fig.3) として報告しているような化合物は検出できず、代わりに kalafungin (KAL) に酸素が 1 分子添加したと思われる化合物が検出された。この化合物の吸光スペクトルはナフタザリン様化合物のものとは異なることから、Valton らの報告とは異なる結果が得られた。

また negative control との比較から、

ActVA-5/ActVB system は、反応溶液中 DHK から自然に変換されて (自動酸化で) できる KAL を基質としている可能性が高まった。

総括

以上、*in vivo*、*in vitro* 両実験系において、ActVA-5/ActVB monooxygenase system が ACT 生合成における 6 位キノン形成を触媒するものであり、ActVA-6 は代替経路として機能するというを明らかにし、新しい ACT 生合成経路 (Fig.8) を提唱した。

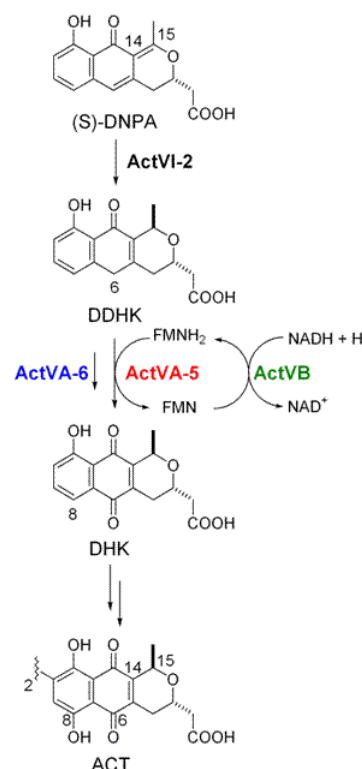


Fig.8 ACT 生合成における 15 位立体特異的エノイル還元と 6 位キノン形成に関する新しい推定経路

ActVA-5 はアミノ酸一次配列の相同性検索からは hydroxylase として推定されるものである。また、これまでの *in vitro* 実験系から提唱された 8 位水酸化への関与も、本研究から否定されるものではなく、また我々の *in vitro* 実験の結果からも、6 位キノン形成のほかに酸素導入を触媒する可能性が強く示唆されている。

ActVA-5/ActVB system に DHK を供して得られる化合物の構造決定、反応系の最適化などから、ActVA-5/ActVB system の反応制御機構を詳細に解明することが今後の課題となる。

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 Okamoto, S., Taguchi, T., Ochi, K., Ichinose, K.
Biosynthesis of Actinorhodin and Related Antibiotics: Discovery of Alternative Routes for Quinone Formation Encoded in the *act* Gene Cluster.
Chem. Biol., **16**, 226-236 (2009).
- ② Taguchi, T., Okamoto, S., Itoh, T., Ebizuka, Y., Ochi, K., Ichinose, K.
Actinoperylon, a novel perylene-quinone-type shunt product, from a deletion mutant of the *actVA*-ORF5 and ORF6 genes for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2).
Tetrahedron Lett., **49**, 1208-1211 (2008).

[学会発表] (計4件)

- ① 田口貴章、岡本晋、伊藤崇敬、海老塚豊、越智幸三、市瀬浩志
Actinorhodin 生合成後期修飾過程における酸素導入に関する新たな知見
第50回天然有機化合物討論会(福岡)
2008年9月30日
- ② 田口貴章、岡本晋、越智幸三、市瀬浩志
Actinorhodin 生合成における ActVA-5, ActVA-6 の機能解析
日本放線菌学会 2008年度大会(山梨)
2008年7月11日
- ③ 田口貴章、岡本晋、伊藤崇敬、海老塚豊、越智幸三、市瀬浩志
ベンゾイソクロマンキノン(BIQ)抗生物質の生合成研究(28)
-actVA-ORF5 破壊体の生産する新規化合物の単離・構造決定-
日本薬学会 第128年会(横浜)
2008年3月26日
- ④ 田口貴章、岡本晋、伊藤崇敬、増田智代、海老塚豊、越智幸三、市瀬浩志
ベンゾイソクロマンキノン(BIQ)抗生物質の生合成研究(27)
-actVA-ORF5 破壊体の生産する新規化合物の単離と構造解析-
日本放線菌学会 2007年度大会(尾道)
2007年6月1日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田口 貴章 (TAGUCHI TAKAAKI)
武蔵野大学・薬学研究所・助教
研究者番号: 80409383

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

様式 C-19 (記入例)

科学研究費補助金研究成果報告書