

機関番号：32680

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20510205

研究課題名(和文)ポリケチド構造修飾酵素の機能解析と新規骨格化合物創製への応用研究

研究課題名(英文)Functional analysis of the enzymes involved in the structural modification of polyketides and its application to the production of novel scaffolds

研究代表者

市瀬 浩志 (ICHINOSE KOJI)

武蔵野大学・薬学研究所・教授

研究者番号：40282610

研究成果の概要(和文): 医薬品開発においては材料となる先導化合物の構造多様性の創出が鍵である。我々は、臨床使用される大半の抗生物質を生産する放線菌に注目し、構造多様性の鍵を握る生合成酵素の研究を行っている。本研究では放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)株の生産する抗生物質アクロジン生成に関わる酸素添加酵素 ActVA-5/ActVB の機能解析を行い、本酵素がキノン骨格形成活性に加えてキノン骨格をエポキシ体に変換する新機能をもつことを明らかにした。

研究成果の概要(英文): One of the key factors for medicinal developments is the structural diversity in the lead compounds. Our research has focused on the actinomycete bacteria, which produce most of the clinically important antibiotics, to reveal the function of a key biosynthetic enzyme leading to structural diversity. In this project, we characterized an oxygenase, ActVA-5/ActVB, for the actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2), to discover its quinine-forming activity, together with an additional enzymatic function as epoxyquinone formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究代表者の研究分野：天然物化学、生物有機化学、分子遺伝学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：抗生物質、生合成、放線菌

1. 研究開始当初の背景

(1)天然物 を利用した医薬品開発においては先導化合物供給源の構造多様性を効率よ

く引き出すかが成否の鍵であり、申請者らは放線菌に注目して研究を展開している。抗生物質等、有用物質の生産源として知られる放

線菌は、そのゲノム解析の結果からも二次代謝遺伝子の存在率が 4~6%と高いことが明らかとなった。見出される主要二次代謝系には、ポリケタイド経路、シキミ酸経路、アミノ酸経路などから派生する化合物の他、テルペノイド化合物も見出されている。更に、放線菌は特異な糖質類、特に高度にデオキシ化された修飾糖を生産することが知られている。配糖化は、化合物の物性変化の他、多様な生物活性の源となる物質変換である。

(2) 遺伝子資源としての放線菌ゲノムは、他の微生物ゲノムと同様に関連する二次代謝反応酵素遺伝子群がクラスターを形成していることから多段階酵素反応遺伝子群の一括取得や同時発現も可能な場合が多い。多剤耐性菌出現の問題からくる抗生物質利用への警鐘がならされ、抗生物質に限らず、生理活性物質の供給源としての放線菌の利用価値は依然として高い。微生物ゲノム解析の成果から潜在的な二次代謝の有効利用の必要性も認識されつつあるが、国内外の製薬企業等では、従来の有望化合物獲得確率の低さから微生物をはじめとする天然資源からの医薬品探索研究から撤退、あるいは関連部門を縮小している現状もある。効率を追求する医薬品開発の現場からみればやむを得ない。一方、ゲノム解析技術の最近の進歩は著しく、純化した微生物のみならず、菌種の分離や培養過程を経ず、混在する微生物集団からゲノム DNA を調製し、直接ゲノムの解析を行う、メタゲノム解析も盛んになり、長期的には再び微生物利用が医薬品開発の牽引力となる可能性もある。

2. 研究の目的

申請者らはこれまでの放線菌由来の配糖化酵素の機能解析の成果を踏まえ、新たに見出された繰り返し機能型の糖転移酵素 (GT) 並びにアグリコンとしてポリケタイド骨格を修飾する酸化酵素を取り上げ、機能開拓を行う。機能解析には、天然物化学、微生物学、遺伝子工学、生化学、情報科学 (計算機化学的手法を含む) を駆使する学際的手法を利用する。得られた触媒機構や基質認識に関する知見を基盤として対象酵素の異種発現や生物変換系への応用を視野に入れた研究の展開し、新規骨格を有する機能分子の創製を目指す。

3. 研究の方法

(1) 機能解析対象酵素をコードする遺伝子の遺伝子破壊実験

(2) 上記破壊実験の結果生じる遺伝子破壊体の代謝産物の分析 (HPLC, LC/MS)

(3) 破壊体特異的な代謝産物の大量生産と精製単離

(4) 精製化合物の各種分析法 (質量分析、NMR 等) による構造決定

(5) 酵素活性発現に関しては、対象遺伝子の異種発現系ベクターへの組込みと組換えタンパク発現と精製

(6) 酵素活性評価 (*in vitro* アッセーの確立と生産物の評価、新規化合物の構造決定)

4. 研究成果

(1) 放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) の生産する BIQ 系抗生物質アクチノロジン (ACT) の生合成における酸化・水酸化機構を解明するため、遺伝子産物の配列情報から水酸化酵素と考えられてきた ActVA-5、キノンを形成する酸化酵素と思われた ActVA-6、ならびに ActVA-5 の水酸化機能発現に必要とされた ActVB について、遺伝子破壊体の代謝産物を分析した。

本菌 M510 株を親株として作成した *actVA-5* 破壊体は ACT を生産せず、代わりペリレンキノン型の新シャント生産物であるアクチノペリロン蓄積する (T. Taguchi *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **2008**, 49, 1208) ことを既に示していたが、このことに加え、ActVB が ActVA-5 と二成分系 (ActVA-5/ActVB system) を形成しキノンを生成を触媒すること、ActVA-6 は野生株の ACT 生合成にほとんど寄与していないが、ActVB 破壊体においてはわずかながらキノンを生成を触媒し ACT 生成に寄与することを明らかにした。さらに、ActVA-5、ActVB をそれぞれ大腸菌で発現させ、精製タンパクを用いた ActVA-5/ActVB system の *in vitro assay* 系を構築した。各種アナログ基質として用いたところ、両者とも確かに対応するキノン体に変換されることを明らかにした。これら *in vivo*, *in vitro* の結果をま

とめ、ACT 生合成における 6 位のキノン生成は、主に ActVA-5/ActVB system によって触媒され、ActVB 破壊体においては ActVA-6 に触媒されるという代替性経路を提唱した(論文発表)。

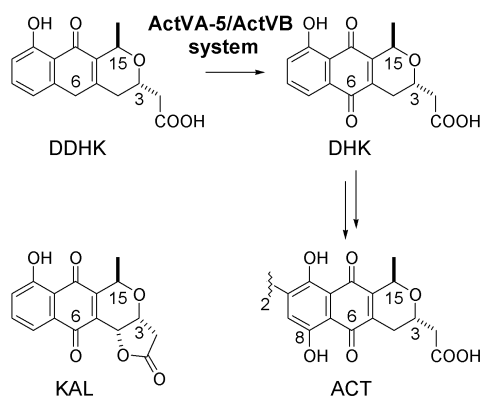


図 1 ActVA-5/ActVB の関与する反応系

(2) 従来提唱されていた ActVA-5 の DHK8 位水酸化活性の有無を我々の *in vitro* 実験系で改めて検討したところ、DHK の末端カルボン酸がラクトン環化したカラファンギン (KAL) を基質とし、更に酸素添加するという目的の活性とは異なる活性を新たに発見した。応生成物である 2 種の化合物を大量に精製し、NMR をはじめとする各種スペクトルから両生成物の平面構造を 5,14-エポキシカラファンギン (epo-KAL) と決定した。尚、生成物 2 種は互いにジアステレオマーの関係にあり、基質である kalafungin (KAL) がエポキシ化される際、酸素原子が KAL の *si* 面 *re* 面どちらからでも結合し得ることが示唆された。また、DHK を pyridine に溶解すると epoKAL 2 種のうち一方のみが生成するが、KAL を pyridine に溶解してもエポキシ化反応は進行しなかった。Pyridine 溶液中では DHK のラクトン化とエポキシ化反応が協奏的に進行すると考えられると同時に、酵素的な KAL のエポキシ化とは反応機構が大きく異なると考えられた。現在、生成物 2 種の絶対構造決定を検討中である。

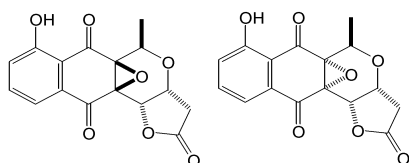


図 2 Epo-KALs の構造

(3) 本研究の新規骨格形成反応生産に関する検討の一環として、生合成酵素の発現系としての放線菌の取扱も検討した。放線菌は有用遺伝子の探索源としてばかりではなく、適切な発現宿主としての取扱ができれば、その応用範囲は大きく拡大する。放線菌 *Streptomyces* sp. AM-7161 由来の抗生物質メダマイシン (MED) は C-配糖化結合を有する抗腫瘍活性を有する抗生物質であるが、非糖部分 (アグリコン) の生合成には、ポリケチド合成酵素による基本炭素骨格合成と修飾酵素群により一連の構造変換が含まれる。既に我々は、MED 生合成遺伝子クラスターの生産菌からのクローニングに成功し (Ichinose et al., *Microbiology*, 2003, 149, 1633-1645), 前述の *actVA-5/actVB* 系の相同遺伝子も存在する。本研究をより新規化合物生産系として発展させるためには発現宿主の開発は必須の課題である。本生産菌の遺伝子操作については、過去に実験報告があったが、遺伝子導入段階の実験条件の最適化をはかり効率的な形質転換系を確立した (論文発表)。

以上、本研究では、放線菌抗生物質生合成酵素の中から新たな二成分系酸素添加酵素 ActVA-5/ActVB 系の酵素機能を解析し、ACT 生合成系には代替性の二つのキノン形成過程があることを初めて明らかにした。本知見は、モデル化合物として重要な位置を占める ACT 生合成経路の全容解明に大きな成果である。加えて、本酵素系にはキノン形成能の他、キノンからエポキシキノンへの変換活性もあることを発見した。エポキシキノン化合物は天然物としても見出される化合物であり、多くのものが抗腫瘍等の注目される活性を有する。一方、エポキシキノン化合物は構造上、高密度に官能基化された化合物であるためその合成には高度な合成化学的手法を必要とする。

本研究で見出されたエポキシキノン化活性は有用化合物生産に向けた基盤となることが大いに期待される。

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)

Susumu, Okamoto, Takaaki Taguchi, Koza Ochi, and Koji Ichinose, Biosynthesis of Actinorhodin and Related Antibiotics: Discovery of Alternative Routes for Quinone Formation Encoded in the *act* Gene Cluster. *Chem. Biol.*, **2009**, 16, 226-236. 査読有
Huiqun Deng, Xiaofeng Cai, Jianxin Peng, Huazhu Hong, Koji Ichinose, and Aiyong Li, Practical procedures for genetic manipulation systems for medermycin-producing *Streptomyces* sp. AM-7161. *J. Basic Microbiol.*, **2010**, 50, 299-301. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

- 1) 田口貴章、「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 (2008 年 7 月 11 日、山梨)
- 2) 田口貴章、「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 (2008 年 9 月 30 日、福岡)
- 3) 田口貴章、「Actinorhodin 生合成に関わる ActVA-5/ActVB 酵素系のモノオキシゲナーゼ活性の検討」日本放線菌学会 2009 年度大会 (2009 年 7 月 16 日、秋田)
- 4) Takaaki Taguchi, "Discovery of alternative routes for actinorhodin quinone formation" 15th International Symposium on the Biology of Actinomycetes (ISBA15) (2009 年 8 月 21 日、Shanghai, PRC)
- 5) 田口貴章、「アクチノロジン生合成におけるモノオキシゲナーゼ酵素系 ActVA-5/ActVB のエポキシ化活性の発見と解析」日本薬学会第 130 年会 (2010 年 3 月 29 日、岡山)
- 6) 田口貴章、「Actinorhodin 及び alunumycin の生合成に関わる二成分系モノオキシゲナーゼの機能解析」日本放線菌学会 2010 年度大会 (2010 年 9 月 3 日、東京)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕
ホームページ等

http://www.musashino-u.ac.jp/yakugaku/s_hoyakukagaku/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市瀬浩志 (Koji Ichinose)
武蔵野大学・薬学研究所・教授
研究者番号：4 0 2 8 2 6 1 0

(2) 研究分担者

田口貴章 (Takaaki Taguchi)
武蔵野大学・薬学研究所・講師
研究者番号：8 0 4 0 9 3 8 3