

二次代謝産物生合成研究を基盤とする有用酵素の探索と機能解析

勝山 陽平 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

aykatsu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

微生物の生産する二次代謝産物は農業用殺菌剤カスガマイシンや抗フィラリア動物薬ミルベマイシンに代表されるように、農学上、重要な化合物が数多く含まれる。このように有用な生理活性を持つ化合物を多数微生物が生産することは、微生物が多様な化学反応を触媒する酵素をその進化の過程で獲得してきたことを示している。そのため、これらの生合成経路を解析することで、ユニークな反応を触媒する有用な酵素が見つかることが期待される。また、得られた二次代謝産物生合成経路の情報を利用し、経路の改変を行うことで新たな薬の開発が可能になる¹。発見された酵素を利用することで、生理活性物質のみならず、様々なファインケミカルの生産が可能になると期待される。そのため、微生物の生産する二次代謝産物の生合成経路を解明することは、基礎だけでなく応用においても重要である。本発表では演者がこれまで取り組んできた二次代謝産物の生合成研究とそれにより見つかった新規酵素群について紹介する。

(1) ジアゾ基含有化合物であるクレメオマイシンの生合成経路から見つかった新規亜硝酸生合成経路

クレメオマイシンは放線菌の生産する二次代謝産物であり、ジアゾ基を有する化合物である。ジアゾ基を持つ二次代謝産物は放線菌から複数見出されているが、当時、それらの化合物の生合成経路に関する知見は全くなかった。そこで、ジアゾ基の生合成機構を明らかにすべくクレメオマイシンの生合成研究に取り組んだ。クレメオマイシンの生合成遺伝子クラスターをクローニングし、*Streptomyces albus* に導入した結果、クレメオマイシンの生産が確認された。さらに、この異種発現系を利用して、遺伝子破壊実験を行った結果、クレメオマイシンのジアゾ基の生合成には CreE, CreD と名付けた二つの酵素が必須であることを示された²。さらに、これらの酵素の組換えたんぱく質を調製し、*in vitro* 機能解析を行った。その結果 CreE はアスパラギン酸を3回酸化し、ニトロコハク酸を合成する反応を触媒した。また、CreD はニトロコハク酸から亜硝酸を脱離する反応を触媒した²。これら2つの酵素により生合成される亜硝酸がクレメオマイシンのジアゾ基の生合成に用いられる。我々はこの亜硝酸生合成経路を基質と中間体の名前から ANS (aspartate-nitrosuccinate) 経路と命名した (図 1A)。ゲノムデータベースを解析した結果、この特徴的な代謝経路はクレメオマイシン生産菌のみならず、様々な放線菌 (500 種以上) が持つことが示唆された。また、この経路遺伝子の多くは二次代謝産物生合成遺伝子の近傍にコードされていたため、クレメオマイシン以外の二次代謝産物の生合成経路も担っていることが予想された。

そこで、この経路により生合成される二次代謝産物を探索すべく、まず *Streptomyces davawensis* に着目し研究を行った。この菌の持つ CreE, CreD ホモログの活性を *in vitro* で試験したところ、これらのホモログも亜硝酸合成を担うことが示された。

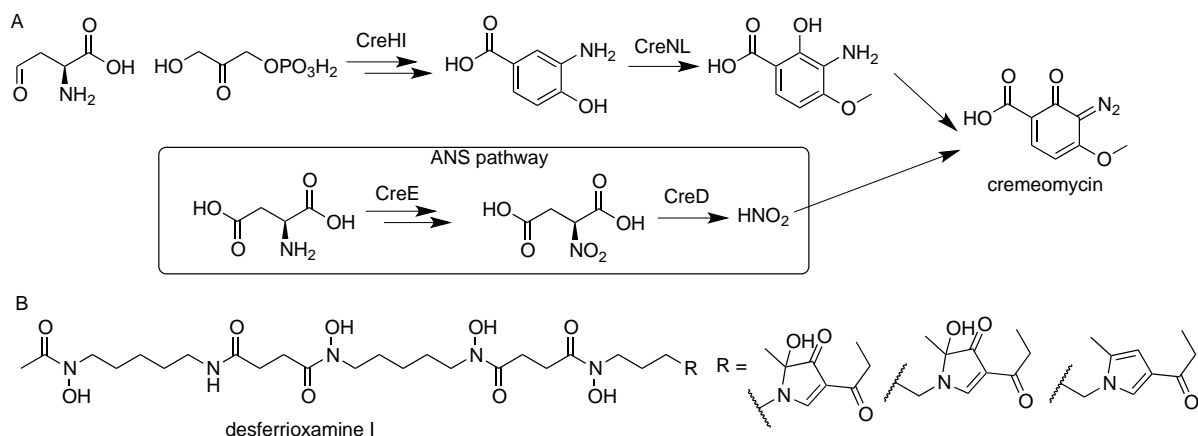


図1 クレモマイシンの生合成経路 (A) とデスフェリオキサミン I の構造 (B)

さらに *creE* 遺伝子ホモログの破壊株と野生株を様々な条件で培養し、生産する化合物を比較した結果、野生株が得意的に生産する化合物としてシデロフォア的一种であるデスフェリオキサミン I を見出した (図 1B)³。この化合物はデスフェリオキサミン B の末端に特徴的な五員環が結合した新規化合物出会った。また、この化合物以外にも、この経路により生合成される化合物を複数見出しており、現在それらの生合成機構を解析している。

CreD はニトロコハク酸からの亜硝酸の脱離を触媒する、アスパルターゼ/フマラーゼスーパーファミリーに属する酵素である。このファミリーに属する酵素群はアミンや水の脱離を触媒するが、亜硝酸を脱離する酵素は知られていなかった。そこで、この酵素の亜硝酸脱離機構を明らかにすべく、X 線結晶構造解析と部位特異的の変異導入により解析を行なった。その結果、CreD の触媒する亜硝酸の脱離にアルギニンを経路とするユニークな触媒機構が存在することを示した⁴。

(2) 非リボソームペプチド生合成における非タンパク質性アミノ酸生合成機構

非リボソームペプチドはリボソームに依存せず、非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) と呼ばれる酵素群により生合成される二次代謝産物である。抗生物質であるバンコマイシンや免疫抑制剤であるシクロスポリンに代表されるように有用な生理活性を持つ化合物が数多く含まれる。NRPS により生産されるペプチドの最大の特徴は、リボソームでは用いることのできない非タンパク質性のアミノ酸を多数利用することができる点である。そこで、本研究では NRPS に利用される非タンパク質性のアミノ酸の生合成機構の解明に取り組んだ。ルフォマイシンは抗結核活性を持つ環状ペプチドでありいくつかの非タンパク質性アミノ酸をその構造中に含む。その中でも、ニトロチロシンに着目し、その生合成機構を解析した。その結果、このアミノ酸は一酸化窒素を利用して芳香族化合物のニトロ化を触媒するシトクローム P450 (RufO) により生合成されることを示した (図 2A)⁵。本酵素は芳香環に直接窒素原子を導入することができるため、微生物を用いたモノづくりにおいて有用な酵素である。また、別の非リボソームペプチドである、JBIR-34, JBIR-35 の生合成機構を解析したところ、この化合物は α -位にメチル基を持つアミノ酸 α -メチル-L-セリンを利用して生合成されることが示唆された。さらに解析を行った結果、このアミノ酸は FmoH と名付けた酵素が触媒するヒドロキシメチル化により、D-alanine から生合成されることが示された (図 2B)⁶。

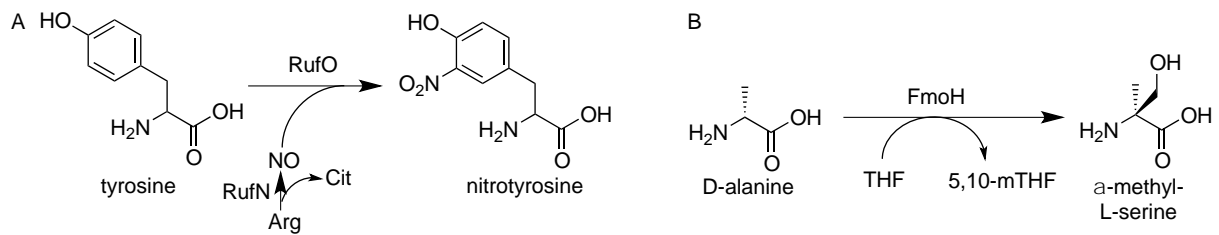


図 RufO の触媒する反応 (A) と FmoH の触媒する反応 (B)

(3) ベンザスタチン類の生合成を担う新規なシトクローム P450

ベンザスタチン類は *p*-アミノ安息香酸とゲラニルニリン酸から生合成される化合物であり細胞毒性などを持つ。これらはさらに直鎖状、インドリン環、テトラヒドロキノリン環を持つ化合物に分類することができる。特にインドリン環、テトラヒドロキノリン環形成機構に着目しその生合成機構を解析した。まず、ベンザスタチン生合成遺伝子クラスターを見出し、異種発現により解析した。その結果、この環化反応には **BezJ** (*N*-オキシゲナーゼ), **BezG** (アセチルトランスフェラーゼ), **BezE** (シトクローム P450)、3つの酵素が関わることを示された。また、中間体の投与実験や **BezG**, **BezE** の *in vitro* 解析を行った結果、**BezJ** が芳香族アミンの *N*-水酸化、**BezG** が **BezJ** により導入された水酸基の *O*-アセチル化によるアセトキシの形成を触媒することがわかった。最後に **BezE** と名付けたシトクローム P450 が酢酸の脱離を介したニトレンの形成と転移、その結果生じたアジリジン環の開環を触媒することで二つの環構造が作られる。**BezE** はニトレンの形成と転位を触媒する、天然では初めてのシトクローム P450 であった⁷。

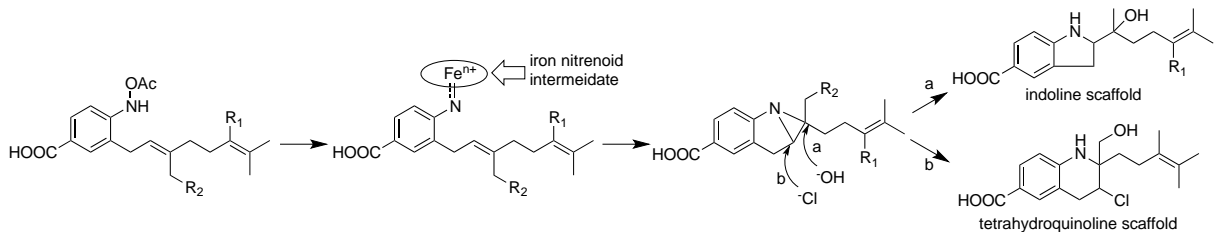


図 3 **BezE** の触媒する環化反応の反応機構

(4) ポリエンの生合成を担う新規 II 型ポリケタイド合成酵素

ポリケタイドは酢酸ユニットが多数縮合することにより生合成される化合物群であり、抗生物質であるエリスロマイシンに代表されるように有用な生理活性物質が数多く含まれる。II 型ポリケタイド合成酵素において複数の酵素が集まることでポリケタイドの生合成を担い、このタイプの酵素においては主に芳香族ポリケタイドが生合成されることが知られている。まず、転写活性化因子の過剰発現を利用したスクリーニングにより、ポリエンを持つ化合物イシガミドを見出した⁸。さらに、遺伝子破壊を用いた解析の結果、イシガミドは II 型 PKS により生合成されることが示唆された⁸。系統解析を行った結果、この II 型 PKS はすでに機能が同定されている II 型 PKS とは進化的に異なることが示唆された。そこで、この II 型 PKS に関わる酵素群の組換えタンパク質を調製し、*in vitro* において機能解析を行った結果、この II 型 PKS がポリエンを持つ脂肪酸を生合成することが示された⁹。本発見はポリエンの生合成を担う II 型 PKS が存在することを実証した世界初の報告である。

また、ポリケタイドに関してはイシガミド以外にもイソフラノナフトキノン¹⁰やストレプトゾン E¹¹の生合成機構を解析し、これらの骨格の生合成に関わる酵素を明らかにした。

終わりに

本研究では主に放線菌をターゲットとして二次代謝産物の生合成研究に取り組んできた。その結果、極めてユニークな反応を触媒する酵素を複数見出し、天然物化学・酵素学分野に大きなインパクトを与えた。また、これらの酵素の中には微生物による有用物質生産への応用が期待されるものも含まれている。今後も二次代謝産物の生合成研究に取り組むとともに発見した酵素の結晶構造解析や機能改変にも着手をすることで、本分野のさらなる発展に貢献したいと考えている。

謝辞

本研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科、醗酵学研究室で行われたものです。本研究を行うにあたり、様々なご指導、ご支援を賜りました醗酵学研究室・大西康夫教授に心より御礼申し上げます。また、本研究成果は醗酵学研究室メンバーの皆さま、及び共同研究者のみなさまお力添えによるものであり、改めて感謝を申し上げます。最後になりますが、本賞にご推薦いただきました、日本農芸化学会の諸先生方に厚く御礼を申し上げます。

引用文献

- 1) Choi S. S., Katsuyama Y., Bai L., Deng Z., Ohnishi Y., Kim E. S.: *Curr. Opin. Microbiol.* 45: 53-60 (2018).
- 2) Sugai Y., Katsuyama Y., Ohnishi Y.: *Nat. Chem. Biol.* 12: 73-5 (2016).
- 3) Hagihara R., Katsuyama Y., Sugai Y., Onaka H., Ohnishi Y.: *J. Antibiot.* 71: 911-919 (2017).
- 4) Katsuyama Y., Sato Y., Sugai Y., Higashiyama Y., Senda M., Senda T.: Ohnishi Y. *FEBS J.* 285: 1540-1555 (2018).
- 5) Tomita H., Katsuyama Y., Minami H., Ohnishi Y.: *J. Biol. Chem.* 292: 15859-15869 (2017).
- 6) Muliandi A., Katsuyama Y., Sone K., Izumikawa M., Moriya T., Hashimoto J., Kozono I., Takagi M., Shin-ya K., Ohnishi Y.: *Chem. Biol.* 21: 923-34 (2014).
- 7) Tsutsumi H., Katsuyama Y., Izumikawa M., Takagi M., Fujie M., Satoh N., Shin-Ya K., Ohnishi Y.: *J. Am. Chem. Soc.* 140: 6631-6639 (2018).
- 8) Du D., Katsuyama Y., Onaka H., Fujie M., Satoh N., Shin-Ya K., Ohnishi Y. *Chembiochem*: 17: 1464-71 (2016).
- 9) Du D., Katsuyama Y., Shin-Ya K., Ohnishi Y.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 57: 1954-1957 (2018).
- 10) Katsuyama Y., Sone K., Satou R., Izumikawa M., Takagi M., Fujie M., Satoh N., Shin-Ya K., Ohnishi Y.: *Chembiochem* 17: 1021-8 (2016).
- 11) Ohno S., Katsuyama Y., Tajima Y., Izumikawa M., Takagi M., Fujie M., Satoh N., Shin-Ya K., Ohnishi Y.: *Chembiochem* 16: 2385-91 (2015).