

論文の要旨

氏名 手島 愛子

論文題目 Functional analysis of P450 monooxygenases responsible for production of highly functional secondary metabolites in Actinomycetes
(放線菌二次代謝産物の高機能化を司る P450 モノオキシゲナーゼの機能解明)

緒言

Streptomyces 属放線菌は多種多様な二次代謝産物を生産することで知られ、これまでに発見された微生物由来有用物質の約7割が放線菌から発見されている。それらは抗生物質、免疫抑制剤、抗がん剤などとして幅広く利用され、人類の健康長寿に大きく貢献しており、放線菌は産業的にも極めて重要な微生物である。

シトクロムP450は、自然界に存在する最も汎用性の高い生体触媒の一つで、生物活性を持つ天然物の生合成において重要な役割を果たしている。*Streptomyces* 属は多種多様な二次代謝産物を生産することから、普遍的に多くのP450を持ち、1菌株あたり平均30個のP450が見出されている。放線菌P450において、コンパクチンやビタミンD3の水酸化に関わるP450sca-2やVdhなどが産業利用されており、放線菌P450の徹底的機能解析を通して、高機能生理活性物質の創製に資する汎用的生体触媒の構築が期待されている。

そこで本研究では、*Streptomyces rochei* 7434AN4株の二次代謝生合成に関わるP450のうち、シグナル分子SRBおよびポリケチド抗生物質ランカマイシンの生合成に関わるP450酵素について解析を行った。

第一章 シグナル分子 SRB 生合成における P450 酵素 SrrO の機能解析

放線菌の二次代謝産物生産は、シグナル分子が特異的受容体に結合することで誘導される。本研究で対象としている *S. rochei* は、2つの抗生物質ランカサイジン (LC)・ランカマイシン (LM) を生産し、それらはシグナル分子 SRBs (*Streptomyces rochei* butenolides) により誘導される。SRB の生合成遺伝子 *srrX* の近傍には P450 水酸化酵素 *srrO* がコードされていたことから、SRB 生合成に関与することが予想された。*srrO* が SRB 生合成に関与するかを調べるため、*srrO* 破壊株を構築し、代謝産物解析を行ったところ、親株と同様に LC・LM を生産していることが明らかになった。この結果から、*srrO* は SRB 生合成には関与していない、または $\Delta srrO$ 株が生産する SRB 中間体が抗生物質誘導活性を持つ、という2つの可能性が考えられた。そこでまず、 $\Delta srrO$ 株からのシグナル分子の取得を試みた。30 L の培養液を酢酸エチルにより抽出し、ゲル濾過クロマトグラフィー、シリカゲルクロマトグラフィー、HPLC により単離・精製を行なった。ESI-MS 解析により、SRB より酸素原子が1つ少なく、水素原子が2つ多い化合物が検出された。NMR 解析では、プテノライド骨格がよく保存されていたことから、今回得られた SRB 中間体は 6'-deoxo-SRBs であり、*srrO* は 6'位の酸化反応を触媒していることが示唆された。続いて、今回得られた 6'-deoxo-SRBs の C-1'位の立体構造を決定するため、化学合成した

6'-deoxo-SRB1a [(1'R)体], 6'-deoxo-SRB1b [(1'S)体], 6'-deoxo-SRB2a [(1'R)体], 6'-deoxo-SRB2b [(1'S)体] を用いキラル HPLC に賦したところ、天然体の保持時間は 6'-deoxo-SRB1a, 2a と良い一致を示した。すなわち 6'-deoxo-SRB1 の C-1'位の立体化学は R 体であることがわかった。さらに C-1'位の立体構造の違いによる基質認識の差を調べるため、*srrO* 発現株 pNTT01 によって 6'-deoxo-SRB1 の変換反応を行った。すると、C-1'位の立体構造に関係なくどちらも SRB に変換されたが、S 体の方がより優先的に変換された。最後に、ゲルシフトアッセイによりシグナル分子受容体である SrrA タンパクとの親和性解析を行った。その結果、6'-deoxo-SRB1 は SRB1 と比べて SrrA との親和性が 100 分の 1 であった。以上、*srrO* は SRB 生合成の最終段階に関与し、シグナル分子活性の向上に寄与していることが示唆された。

第二章 ランカマイシン生合成に関与する P450 酵素 LkmK, LkmF の機能解析

14 員環マクロライド化合物であるランカマイシンは、グラム陽性細菌に対して抗菌活性を持ち、その構造はマクロライド系抗生物質エリスロマイシンと類似している。当研究室では、LM 生合成遺伝子クラスターが線状プラスミド pSLA2-L にコードされていることを明らかにしており、そのうち P450 酵素遺伝子 *lkmK*, *lkmF* および糖転移酵素遺伝子 *lkmL*, *lkmI* の機能に着目した。遺伝子破壊株の代謝産物解析により、LM の生合成経路ではアグリコン 8,15-dideoxy lankanolide に対して、LkmK (15 位水酸化)→LkmL (3 位水酸基への L-arcanose 付加)→LkmF (8 位水酸化)→LkmI (5 位水酸基への D-chalcose 付加) の順に酵素反応が進行することが示唆された。そこで、本研究では *lkmK* および *lkmF* のタンパク発現系を確立し、これらの酵素の基質認識解析及び LM 生合成経路の検証を行った。

まず、両酵素の予想基質を得るために、 $\Delta lkmK$ -*lkmL* 株、 $\Delta lkmF$ -*lkmI* 株を培養・抽出し、それぞれの株から 8,15-dideoxylankanolide、3-O-L-arcanosyl-8-deoxylankanolide を単離し、構造を決定した。発現タンパクに関して、LkmK は大腸菌発現系を用い、LkmF は大腸菌系では反応が進行しなかったため、放線菌発現系を用いて調整を行った。*lkmF* 遺伝子を放線菌大量発現ベクター pHSA81 に連結してプラスミド pYK01 を得て、*S. lividans* TK64/pYK01 株を構築した。二重破壊株から得られた基質とタンパク発現系を用いて *in vivo* 反応を行なったところ、8,15-dideoxylankanolide、3-O-L-arcanosyl-8-deoxylankanolide は各々 LkmK, LkmF によって水酸化された。また、 $\Delta lkmK$, $\Delta lkmF$, $\Delta lkmL$, $\Delta lkmI$ 株から得られたランカマイシン誘導体についても酵素による基質変換反応を行い、*lkmF*, *lkmK* の基質特異性の解析を行った。すると、LkmK の基質認識は比較的寛容であり、3 位や 5 位のデオキシ糖の有無に関係なく酸化反応が進行した。一方で、LkmF において、正味の基質である 3-O-L-arcanosyl-8-deoxylankanolide 以外の基質では反応が進行しなかったことから、基質特異性に 3 位のデオキシ糖付加が関与していることが示唆された。

総括

本研究では、*S. rochei* の二次代謝生合成に関与する P450 の分子基盤解明を目的とした。第一章では、シグナル分子 SRB 生合成における SrrO の機能解析を行い、6'位酸化反応を介した二次代謝誘導活性への関与を明らかにした。第二章では、LkmK, LkmF が抗生物質ランカマイシンの 15 位, 8 位の位置特異的酸化反応に関与すること、さらに両酵素の基質特異性についても明らかにした。本研究により得られた P450 酵素の分子基盤の知見は、分子認識の寛容化に伴う汎用性酵素触媒の構築、さらには生合成系の再設計による高機能生物活性分子の創製など、合成生物学・生合成工学に貢献することが期待される。