

放線菌由来マクロリド Labilomycin の生合成に関する研究

学位論文内容の要旨

【序論】

Labilomycin (1) は、土壌由来の放線菌 *Streptomyces albosporus* subsp. *labilomyceticus* より抗菌物質として単離された 22 員環ポリエンマクロリドである。1 は、リボソーム内の elongation factor-Tu、amino acyl t-RNA、および GTP の複合体形成を阻害することにより、原核生物の蛋白質合成阻害作用を示すことが明らかになっている。また、安定同位体による標識化合物の取り込み実験により、1 は他の放線菌由来のポリケチド化合物では見られない特異な取り込みパターンを持つことが分かっている。一般に、ポリケチド化合物の分岐メチル基はメチオニンまたはプロピオン酸のメチル基炭素に由来するが、1 の 7 位および 11 位のメチル基は酢酸のメチル基炭素に由来することが明らかになっており、生合成の観点からも興味深い化合物である。

本研究では、1 の生合成経路を明らかにする目的で、*S. albosporus* のゲノム DNA より 1 の生合成遺伝子クラスターのクローニングを行った。

【結果および考察】

Labilomycin (1) の構造研究

研究を開始した当初、1 の糖鎖は 6-deoxy- 2, 4-di- O-methyl- D-galactose (labilose) であることが明らかとなっていたが、その他の立体化学については、5 位、13 位、および 21-24 位の相対立体配置が NOESY スペクトルから推定されているのみであったため、JBCA (J-based configuration analysis) 法を用いて 1 の相対立体配置について解析を行った。2006 年に Parmeggiani らのグループは、1 と elongation factor-Tu、および GTP との共結晶の X 線結晶解析により 1 の絶対立体配置を明らかにしたが、本研究にて JBCA 法により推定した相対立体配置はこれと一致する結果であった。また、本研究では、*S. albosporus* から 1 の関連化合物として、1 の 26,27-dihydro 体 (2)、および 14,15,26,27-tetrahydro 体 (3) を単離し、2D NMR を中心としたスペクトルデータの解析により 2 と 3 の平面構造を明らかにした。

Labilomycin (1) 生合成遺伝子群のクローニング

放線菌由来マクロリドの炭素鎖は、一般に I 型 polyketide synthase (PKS) とよばれる多機能蛋白質により生合成されると考えられている。I 型 PKS の場合、1 回の炭素鎖の伸長に必須である β -ketoacyl synthase (KS)、acyltransferase (AT)、および acyl carrier protein (ACP) といったドメインと、ポリケチド鎖の修飾に関与する β -ketoacyl reductase (KR)、dehydratase (DH)、および enoylreductase (ER) などのドメインが 1 つのモジュールを形成し、これが 1 つまたは複数集まって 1 つの PKS を形成している。1 の炭素鎖は I 型 PKS により生合成されると推定されたため、既知の KS の配列からデザインした縮重プライマーを用いて PCR を行い、1 の生産株である *S. albosporus* のゲノム DNA から KS 遺伝子をサブクローニングした。この遺伝子断片は mRNA として発現していることが、RT-PCR により確認された。

また、シアノバクテリア、粘液細菌、桿菌の生産するポリケチドの中には、酢酸のメチル基炭素に由来する C₁ ユニットを持つものが報告されている。これらの C₁ ユニットの付加には 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase (HCS) に類似した酵素が関与していることが報告されていたため、1 のメチル化にも HCS が関与していることが考えられた。そこで HCS 遺伝子を増幅させる縮重プライマーを用いて、HCS 遺伝子のサブクローニングを試みたところ、

既知の HCS 遺伝子と相同性の高い遺伝子断片が単離された。

S. albosporeus の Fosmid ゲノムライブラリーを、これらの KS および HCS 遺伝子の配列を基にデザインしたプライマーを用いて PCR スクリーニングした結果、これら 2 種の遺伝子配列を含むクローン(Fosmid-10F)が見い出された。Fosmid-10F のインサート遺伝子(36kbp)をショットガンシーケンス法により解析した結果、1 の生合成に関与すると予想される遺伝子のうち、2 回のポリケチド鎖の伸長と、post-modification に関与すると考えられる領域が含まれていることが明らかになった。

Labilomycin (1) 生合成遺伝子の解析

クローニングした遺伝子が 1 の生合成遺伝子である確証を得るため、KS 遺伝子の破壊株を作製し表現系を調べた結果、1 の生産能を失っていることが明らかになった。従ってクローニングした KS と、それに連続する遺伝子群は 1 の生合成遺伝子の一部であると考えられたため、先に述べた配列の上流および下流の配列を含む Fosmid をゲノムライブラリーより取得し、ショットガンシーケンス解析を行った。配列の明らかになった約 110kbp の領域のうち、1 の生合成に関与していると推定される約 96kbp の領域は、4 つの PKS (Lab A-D)を含む 14 個のオープンリーディングフレームから構成されていることが明らかとなった。

1 の PKS には AT ドメインが組み込まれておらず、単独の酵素として別途に存在していることが明らかになった。しかし、17 個のモジュールから構成される 1 の 4 つの PKS には、ポリケチド鎖の伸長、メチオニン由来炭素によるメチル化、およびマクロラクトン化に必要な、AT ドメイン以外の全てのドメインが存在することが示された。モジュール 16 には、生合成に関与していないと推定される KS および ACP ドメインがそれぞれ 1 個ずつ存在したためシーケンスを解析した結果、活性型の KS で保存されている 2 つのヒスチジンが、それぞれセリンまたはアスパラギンに置き換わっていることが明らかになった。同様に、不活性型の ACP の場合も、活性型で保存されているアミノ酸残基の変異が確認された。

また最近、KR ドメイン中央部のシーケンスから、経験的に生合成される水酸基の絶対立体配置を推定できることが報告されている。すなわち、KR の中央に位置する特定のアミノ酸がアスパラギンである場合は、1 位のカルボニル基を基準として D 体の 2 級アルコールが生合成され、それ以外のアミノ酸の場合は L 体の 2 級アルコールが生合成されると推定できる。1 が生合成される過程で、5 位、13 位、21 位、23 位、および 33 位の水酸基は、それぞれモジュール 15、11、7、6、および 1 の KR により生合成されるが、これらのシーケンスから推定される絶対立体配置は、X 線結晶解析により明らかにされた 1 の絶対立体配置と一致した。

また、1 の生合成遺伝子クラスターには、HMG-cassette とよばれる、ACP、KS、HCS、および 2 つの enoyl-CoA hydratase (ECH)から構成される遺伝子群が存在することが分かった。この遺伝子群は数種の微生物代謝産物の生合成遺伝子に存在し、ポリケチド鎖に酢酸のメチル基炭素を付加させる働きをもつことが報告されている。これらの遺伝子群は 1 の 7 位および 11 位への酢酸のメチル基炭素の付加に関与していると推定される。

HMG-cassette の下流には、チトクロム P450 および配糖化酵素の遺伝子が存在し、それぞれ 12 位と 32 位の酸化、および 23 位への labilose の配糖化に関与していると推定される。

【まとめ】

放線菌 *S. albosporeus* の生産する抗生物質 labilomycin (1) の生合成遺伝子群のクローニングを行い、遺伝子破壊株の表現系解析から、クローニングした遺伝子群が 1 の生合成に関与していることを確認した。遺伝子解析の結果から、1 のポリケチド鎖は AT がモジュールに組み込まれていないタイプの 4 つの PKS により伸長され、4 つ目の PKS (LabD)の末端に存在する thioesterase (TE) ドメインによりマクロラクトン化を受けた後、酸化および配糖化などの修飾を受けて生合成されると推定した。また、7 位および 11 位のメチル基は、HMG-cassette により生合成されると推定した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 淳 一
副 査 教 授 有 賀 寛 芳
副 査 准教授 松 本 健 一
副 査 講 師 久保田 高 明

学 位 論 文 題 名

放線菌由来マクロリド Labilomycin の生合成に関する研究

Labilomycin (1)は、土壌由来の放線菌 *Streptomyces albosporus* より単離された22員環ポリエンマクロリドで、リボソーム内の伸長因子(EF-Tu)、アミノアシルtRNA、およびGTPの複合体形成を阻害することにより、原核生物の蛋白質合成阻害作用を示すことが明らかになっている。また、標識化合物の取り込み実験により、他の放線菌由来のポリケチド化合物では見られない特異な取り込みパターンを持つことが明らかになっており、生合成の観点から興味深い化合物である。

本研究では、1の生合成経路を明らかにする目的で、本放線菌のゲノムDNAより1の生合成遺伝子群をクローニングした。

Labilomycin (1)生合成遺伝子群のクローニング

既知のI型ポリケチド合成酵素(PKS)の配列からデザインした縮重プライマーを用いてPCRを行い、1の生産株である本放線菌のゲノムDNAからケトアシル合成酵素(KS)ドメインの遺伝子をクローニングした。また、1のメチル化にHMG-CoA合成酵素(HCS)に類似した酵素が関与していることが推定されたため、HCS遺伝子を増幅させる縮重プライマーを用いてPCRを行い、既知のHCS遺伝子と相同性の高い遺伝子断片をクローニングした。

サブクローニングしたKSおよびHCS遺伝子の配列を基にプライマーをデザインし、本放線菌のゲノムライブラリーをPCRでスクリーニングした結果、これら2種の遺伝子配列を含むクローン(Fosmid-10F)を単離した。Fosmid-10Fのインサート遺伝子(36kbp)の配列をショットガンシーケンスにより解析した結果、1の生合成に関与すると考えられる遺伝子のうち、2回のポリケチド鎖の伸長と、post-modificationに関与すると考えられる領域が含まれていることを明らかにした。

Labilomycin (1) 生合成遺伝子の解析

クローニングした遺伝子の破壊株は、1の生産能を失っていることが分かったため、クローニングした遺伝子群は1の生合成遺伝子の一部であると推定した。ゲノムライブラリーよりFosmid-10Fのインサート遺伝子の上流および下流の配列を含むFosmidを取得し、1の生合成に必要と考えられる全ての遺伝子をクローニングした。シーケンス解析の結果、1) クローニングした1の生合成遺伝子群は、4つのPKSを含む14個のオープンリーディングフレームを含むこと、2) 17個のモジュールから構成される1の4つのPKSには、ポリケチド鎖の伸長、メチオニン由来炭素によるメチル化、およびマクロラクトン化に必要な、アシル基転位酵素(AT)ドメイン以外の全てのドメインが存在すること、3) 1のPKSにはATドメインが組み込まれておらず、単独の酵素として別途に存在していること、4) モジュール16には、アミノ酸配列から生合成に関与していないと推定されるKSおよびACPドメインが1個ずつ存在すること、5) 経験則に基づきケト還元酵素ドメインの遺伝子配列から推定される5個の水酸基の絶対立体配置は、X線結晶解析により明らかにされた1の絶対立体配置と一致すること、6) 1の生合成遺伝子群には、酢酸のメチル基炭素の付加に関与していると推定される、HMGカセットとよばれる遺伝子群が存在すること、7) HMGカセットの下流に、それぞれ酸化修飾および配糖化に関与すると推定されるチトクロムP450および配糖化酵素の遺伝子が存在することを明らかにした。

本研究では、放線菌 *S. albosporeus* の生産する抗生物質 labilomycin (1) の生合成遺伝子群のクローニングに成功し、1のポリケチド鎖はATがモジュールに組み込まれていない4つのPKSにより伸長され、チオエステラーゼドメインによりマクロラクトン化を受けた後、酸化および配糖化を受け、HMGカセットにより7位および11位のメチル基が生合成されることを見出した。

本研究は、遺伝子レベルで研究されていない1の生合成経路について新たな知見を種々見出すことにより、1の生合成工学的研究を可能にしたとともに、HMGカセットが関与すると考えられる渦鞭毛藻ポリケチドの特異な生合成経路の解明の足がかりを築いたものと評価できる。微生物の生産する有用二次代謝産物の生合成遺伝子を遺伝子工学的手法により有効利用する研究は、今後ますます発展が期待されることから、本研究は天然物化学の分野で優れた研究成果を上げたものといえ、博士(薬学)の学位を受けるに値する業績と判断された。