

学 位 論 文 題 名

Biosynthetic Studies on the Antitumor Antibiotics
Involving Nonribosomal Peptide Synthetases

(抗腫瘍性抗生物質の生合成における

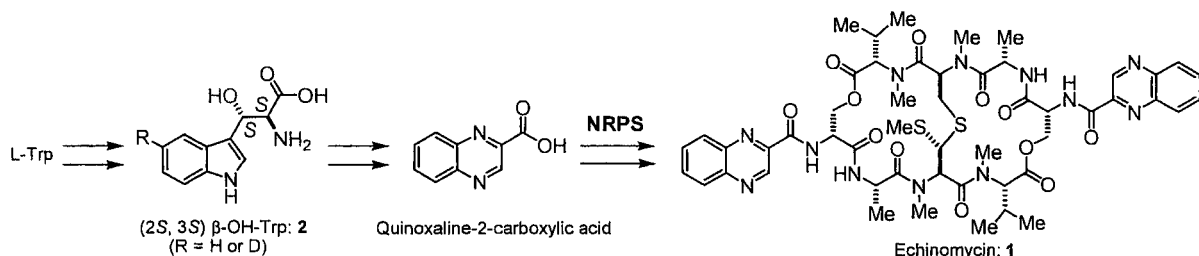
非リボソーム依存性ペプチド合成酵素の機能解析)

学位論文内容の要旨

微生物や海洋生物からは、多様な骨格を有する二次代謝産物が数多く単離される。抗生物質バンコマイシンや界面活性剤サーファクチンなど、多くの二次代謝産物は、顕著な生理活性を有しており、医薬品候補として有用である。近年の遺伝子工学、タンパク質工学の進歩により、これらペプチド系二次代謝産物は、巨大合成酵素である非リボソーム依存性ペプチド合成酵素 (NRPS) により、生合成されることが明らかとなった。一般的な NRPS の反応機構は十分に研究されてきたが、未知の修飾反応により生合成される、より複雑な構造を持つ化合物も数多く存在する。複雑な構造を有する二次代謝産物の詳細な骨格構築機構を解明することで、酵素法や発酵法による効率的な物質生産が可能になると期待される。

第一章は、ペプチド系抗腫瘍性抗生物質エキノマイシン (1) の生合成研究について述べている。

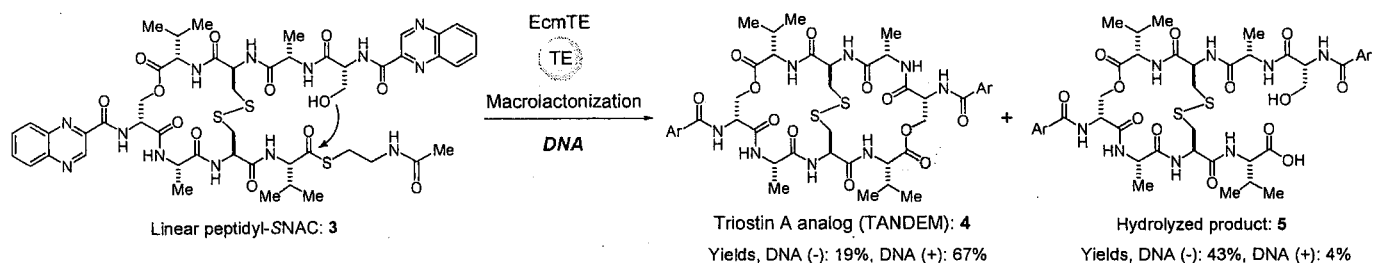
本化合物は、 C_2 -対称型の環状オクタペプチド骨格に 2 つのキノキサリン環が連結した構造を持つ。このキノキサリン環部位は、トリプトファンを出発原料とするが、その詳細な生合成経路は、不明であった。申請者は、エキノマイシンの生合成遺伝子情報を基に、 β -ヒドロキシトリプトファン (2) が中間体であると予想した。この仮説を証明するために、重水素標識を導入した 2、および、その 3 位のエピマーを立体選択的に化学合成し、エキノマイシン生産菌への投与実験を行った。その結果、(2*S*, 3*S*)-体 2 のみが 1 へ変換されたことから、2 が生合成中間体であることを証明した。



第二章は、DNA 共存下での、酵素的マクロラクトン化によるトリオスチン A アナログの合成を述べている。

エキノマイシンチオエステラーゼ (EcmTE) は、エキノマイシン生合成の過程で、鎖状テトラペプチドの二量化、および、マクロラクトン化を触媒し、環状ペプチドを生成する。実際、融合タンパク質として発現した EcmTE は、鎖状ペプチジル-SNAC チオエステル 3 を基質とし、目的とするトリオスチン A アナログ (TANDEM) 4 への変換を触媒したが、生成物の加水分解が競合し、相当量のカルボン酸 5 が副生した。そこ

で、この問題を解決すべく、エキノマイシン様二量体型環状ペプチドが DNA に特異的に結合するという特性を利用したアプローチを考案した。つまり、DNA を酵素反応液に加えておくことで、環化生成物を DNA に捕捉させることができ、酵素による環化生成物の再開裂を抑制できると考えた。実際、DNA 非存在下では、

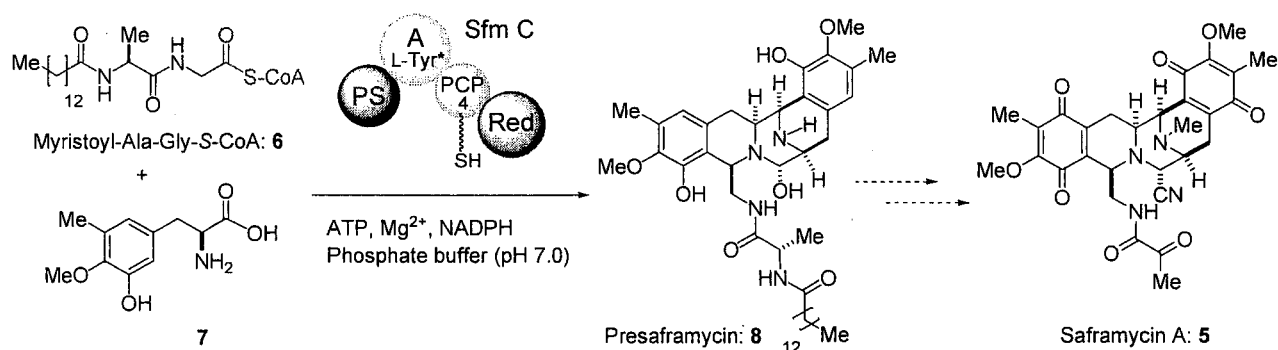


環化生成物が 19%、加水分解産物が 43%の収率であったのに対し、DNA 存在下では、環化生成物の収率が 67% にまで向上し、加水分解産物の副生を 4% に抑えることに成功した。DNA 共存下の酵素反応は、環化生成物とその標的分子である DNA との特異的相互作用を利用したものであり、これまで報告された手法とは異なる新しいアプローチによる誘導体合成法を確立することができた。

第三章は、抗腫瘍性抗生物質サフラマイシン A 合成における非リボソーム依存性ペプチド合成酵素による 5 環性骨格の構築について述べている。

微生物や海洋生物からは、複雑な骨格を有する多環性テトラヒドロイソキノリンアルカロイドが数多く単離されている。これらはいずれも強力な抗腫瘍活性を示すため、医薬品候補として有用である。放線菌 *Streptomyces lavendulae* から単離されるサフラマイシン A (6) は、この一群の中でもっともよく知られた化合物であるが、この複雑な 5 環性骨格が生体内で合成される仕組みは、十分に解明されていなかった。申請者は、詳細な多環性骨格構築機構の解明を目指し、本化合物を対象とした生合成研究に取り組んだ。

まず、還元 (Red) ドメインを持つ NRPS である SfmC が骨格構築に重要な役割を担うと考え、大腸菌で大量発現した。次に、これまで見逃されてきた遺伝子の機能に着目し、SfmC に認識され得る基質アナログとして、*N*-myristoyl-L-Ala-Gly-S-CoA (7) を設計、化学合成した。実際に、ATP、NADPH 存在下、アナログ 7 とチロシン誘導体 8 に、SfmC を作用させたと、一挙に 5 環性テトラヒドロイソキノリン化合物 9 が生成することを見出した。さらに、酵素反応の詳細な解析から、単独の NRPS である SfmC が一挙に 7 段階もの反応を触媒し、本骨格を作り上げることを証明した。

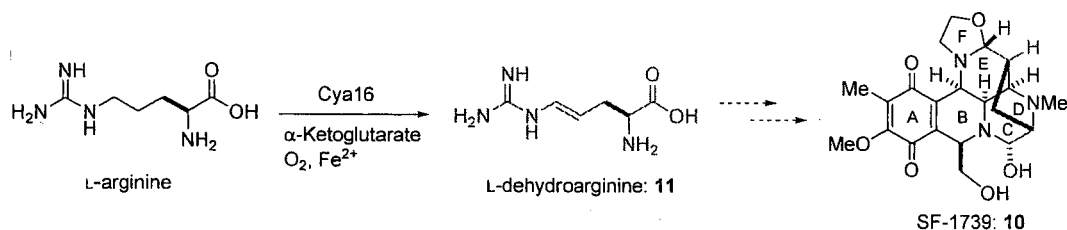


第四章は、テトラヒドロイソキノリン系抗腫瘍性物質 SF-1739 の生合成研究について述べている。

SF-1739 (10) は、放線菌 *Streptomyces griseoplanus* SF-1739 から単離されるテトラヒドロイソキノリン系抗生物質である。特徴的な 6 環性縮環骨格は、サフラマイシンと類似する A、B、C 環、および、オキサゾリジ

ン環 (F 環) を含むユニークな架橋構造を持つ D、E、F 環から構成される。本化合物の生合成について、サフラマイシン A との構造類似性から、A、B、C 環の構築機構は推定可能だが、D、E、F 環の構築機構については、合理的な説明はできなかった。そこで、申請者は、本化合物の生合成経路の解明を検討した。

初めに、SF-1739 生合成酵素の遺伝子情報を得るために、生産菌のゲノムより、28 個の遺伝子で構成される生合成遺伝子クラスターを取得した。そして、その中にアミノ酸の β 位炭素を水酸化する酵素と高い相同性を示す遺伝子 (*cya16*) を見出した。Cya16 の機能解析のため、大腸菌で大量発現し、種々のアミノ酸を基質として酵素反応を検討した。その結果、L-アルギニンに選択的な酸化反応が進行することを見出した。ESI-MS、NMR を用いた構造解析により、生成物は新規化合物 L-(E)-4, 5-デヒドロアルギニン (**11**) であることが判明した。本化合物の同定と先のサフラマイシン骨格構築機構を基に、SF-1739 の合理的な生合成経路を考案することが可能になった。



学位論文審査の要旨

主 査 教 授 及 川 英 秋
副 査 教 授 鈴 木 孝 紀
副 査 教 授 谷 野 圭 持
副 査 教 授 高 岡 晃 教
副 査 准教授 大 栗 博 毅

学 位 論 文 題 名

Biosynthetic Studies on the Antitumor Antibiotics Involving Nonribosomal Peptide Synthetases

(抗腫瘍性抗生物質の生合成における

非リボソーム依存性ペプチド合成酵素の機能解析)

微生物からは、複雑な骨格を有するテトラヒドロイソキノリンアルカロイドが数多く単離されている。これらはいずれも強力な抗腫瘍活性を示すため、医薬品候補として有用である。中でも、海産のホヤ (*Ecteinascidia turbinata*) から単離されるエクチナサイジン 743 は、極めて強い抗腫瘍活性を有しており、臨床用抗がん剤として使用されている。エクチナサイジンの供給は、類似化合物であるシアノサフラシン B からの半合成により行われているが、必ずしも効率的な方法ではない。申請者は、テトラヒドロイソキノリン誘導体の酵素法や発酵法による生産を目指して、これらに共通する多環性骨格の構築機構解明に取り組んだ。単純な出発物質から複雑な骨格を一挙に組み上げる機構を明らかにすることで、その生合成酵素を利用した物質生産が可能になると期待される。

サフラマイシン類の生合成研究は、過去に複数報告されている。中国の Wen らのグループは、サフラマイシン A の生合成遺伝子群の取得と一部酵素の機能解析を報告し、テトラヒドロイソキノリン骨格構築機構を Scheme 1 のように推定した。巨大合成酵素である非リボソーム依存性ペプチド合成酵素 (NRPS) により、鎖状テトラペプチドが生成され、その後、複数の分子内環化を経て、5 環性骨格中間体が構築される経路である。しかし、本骨格の酵素合成には成功しておらず、仮説の証明には至っていない。今回、申請者は、サフラマイシン A を対象とした生合成研究に取り組み、5 環性骨格の酵素合成に成功した。そして、詳細な反応解析の結果、これまでの仮説は異なり、2つのテトラヒドロイソキノリン骨格が2度の Pictet-Spengler 反応により、段階的に構築されることを証明した。

申請者は、サフラマイシン NRPS の一つである SfmA に存在するアシル-AMP リガーゼ (AL) ドメインに着目した。本ドメインは、これまでに解析された 4 種のテトラヒドロイソキノリン類の生合成遺伝子群のうち、3 種に存在していた。機能解析の結果、AL ドメインは長鎖脂肪酸を認識し、活性化することが判明した。この実験事実と NRPS の一般的な反応機構を基に、SfmC の適切な基質として、ミリスチン酸(炭素鎖 14)-ジペプチド-*S*-CoA を設計、化学合成した。実際に、ATP、Mg²⁺、NADPH 存在下、ペプチドアナログとチロシン誘導体に SfmC を作用させたところ、一挙に 5 環性テトラヒドロイソキノリン化合物が生成することを見出した。興味深い

ことに、本酵素反応は、炭素鎖 14 以上の脂肪酸が結合しているペプチドアナログを用いた時のみ進行することが判明した。また、3 種の反応中間体が検出されたことから、本骨格構築機構を提案した。まず、SfmC の還元 (Red) ドメインがペプチドアナログのチオエステル結合を還元し、アルデヒド中間体を生成する。一方で、アミノ酸は、アデニル化(A)ドメインの作用で、PCP ドメイン上に共有結合する。そして、アミノ酸のアミノ基とアルデヒド中間体が 1 度目の Pictet-Spengler 反応することで、1 つ目のテトラヒドロイソキノリン環が形成される。次に、生成した中間体のチオエステル結合が還元され、二環性アルデヒドが生じる。この間に、もう一分子のアミノ酸が PCP ドメイン上に共有結合し、このアミノ基とアルデヒドが 2 度目の Pictet-Spengler 反応をすることで、ビステトラヒドロイソキノリン中間体が形成される。最後、最終中間体のチオエステル結合が還元され、アルデヒドが生じた後、分子内環化することで、5 環性骨格が構築されたと考えた。

以上のように本学位申請論文は、強力な抗腫瘍活性を有するテトラヒドロイソキノリン系ペプチドの生合成における複雑な骨格構築機構に関する内容を扱っている。本研究で取り扱っているサフラマイシンの 5 環性骨格は、非リボソーム依存性ペプチド合成酵素 (NRPS) により構築されるが、その詳細な触媒機構は不明であった。申請者は近縁の酵素との相同性から、これまで無視されていた触媒ドメインに注目し、最終産物にはない部分構造が重要であることを見出した。さらに合成した様々な基質に対し、酵素反応を繰り返し、従来にはない 7 段階の反応を一つの酵素が触媒して、一挙に骨格合成されることを突き止めた。近縁のさらに複雑な 6 環性骨格を有する SF-1739 の遺伝子解析および鍵酵素の機能解析も行い、この骨格構築機構が広く適用可能なものであることを確認した。本研究で取り扱ったサフラマイシンと類似の骨格を持つ海産のホヤ (*Ecteinascidia turbinata*) から単離されるエクチナサイジン 743 は、極めて強い抗腫瘍活性を有しており、臨床用抗がん剤として使用されている。このエクチナサイジンの供給法は、必ずしも効率的な方法ではないため、今回機能を明らかにした酵素を用いた実用的合成法開発も夢ではなくなってきた。以上は天然物化学のみならず触媒化学分野全般において非常に高く評価される成果である。

よって著者は、北海道大学博士 (理学) の学位を授与される資格あるものと認める。