

## リベロマイシンA生合成にかかわる未知酵素の解明 スピロアセタール環化酵素の発見

微生物は、臨床的に重要な薬剤として使われているさまざまなポリケチド化合物（エリスロマイシン，エポチロン，ラバマイシン，ロバスタチンなど）を生産する。ポリケチド合成酵素（PKS）により生合成された中間体はそのままでは活性を示さず，さまざまな酵素の修飾を受けて多様な構造を形成した後に生理活性を獲得するため，構造多様化にかかわる酵素反応を解明することは，新しい薬剤開発に必要な生合成理論構築につながる。筆者らは，バクテリア，渦鞭毛藻，海綿動物から広く見いだされているポリケチド化合物のなかで，さまざまな生理活性（イオノホア，プロテインホスファターゼ阻害，駆虫作用，抗菌作用など）をもつことで知られており，立体特異的構造の形成機構が不明なスピロアセタール化合物に着目した。

1991年に長田らは，がん細胞の増殖を阻害する物質として放線菌（*Streptomyces* sp. SN-593）よりリベロマイシンA（RM-A）を見いだした<sup>(1)</sup>。これまでに，RM-Aの細胞内標的分子は，イソロイシルtRNA合成酵素であり，破骨細胞選択的にアポトーシスを誘導し骨吸収を阻害する活性を有すること<sup>(2)</sup>，肺がんや前立腺がんによって誘導される骨転移を阻害することを明らかにしている<sup>(3,4)</sup>。また，RM-Aのスピロアセタール立体構造の構築は難題であったが，多くの有機化学者が魅了し，多段階のステップを経て合成が達成されている<sup>(5)</sup>。一方，生合成に関しては情報がなく，遺伝子クラスター取得により生合成機構を解明することは，効率的な化合物の創製に重要な知見を与えると考えられた。

スピロアセタール環化機構は大きく2つに大別できる。一つは，ポリエーテル化合物のモノエンシンA生合成におけるエポキシド・ケトン中間体経路の環化反応<sup>(6)</sup>であり，もう一つは，エバーメクチン，トウトマイシン，スピランギエンの生合成においてジヒドロキシケトンを経由する脱水環化反応である。エバーメクチン<sup>(7)</sup>，トウトマイシン<sup>(8)</sup>の生合成ではI型PKSにより直接環化前駆体であるジヒドロキシケトンを生成し，スピランギエンAの生合成ではI型PKSが環化前駆体（トリオール構造）を生成した後にP450がジヒドロキシケトンを誘導して非酵素的に環化すると考えられている<sup>(9)</sup>。広範

な解析にもかかわらず，スピロアセタール形成にかかわる脱水環化の生化学的機構は全く証明されていなかった。筆者らは，これらの疑問に答えるために，化学，分子生物学，生化学的手法を用いて脱水環化機構が予想されるRM-Aの生合成機構を包括的に解析することにした。

放線菌二次代謝産物の生合成遺伝子はクラスターを形成している。遺伝子クラスターを取得するには，特徴的な化学構造の形成に必須の遺伝子をプローブとして，ハイブリダイゼーションにより類似遺伝子を検出する手法が一般的である。RM-Aの場合，スピロアセタール構造形成やサクシニル基転移にかかわる遺伝子が不明であり，関与が予想できるP450およびI型PKSは，放線菌ゲノム中に相同性の高い遺伝子が多数存在するため，特異的なDNAプローブをデザインすることが困難であった。そこで，高生産培地を開発し，RM-A生合成遺伝子群を選択的に増幅する手法を考えた。通常，*Streptomyces* sp. SN-593が作るRM-Aの生産量は少ないが，トマトエキスを加えて培養すると，RM-A生産性が飛躍的に向上する。そこで，高生産培地と低生産培地での遺伝子発現の差を利用すれば，RM-A生産時に特異的に発現するPKS遺伝子の同定が可能である。RT-PCRにより，特異的に発現が増大するPKS遺伝子断片を取得し，さらにこれをプローブとして，フォスミドライブラリーから遺伝子探索を行った。*Streptomyces* sp. SN-593ゲノムのドラフト解析も同時に行ったが，PKS遺伝子配列の連結が困難であることから，フォスミドクローンの情報を統合することで配列を解析した。その結果，RM-Aの炭素骨格の生合成にかかわるPKS遺伝子群（*revA*, *revB*, *revC*, *revD*）と発現制御や構造修飾にかかわると予想される21個の遺伝子を含む約91 kbに及ぶ遺伝子クラスターを見いだすことに成功した<sup>(10)</sup>（図1A）。

*Streptomyces* sp. SN-593の代謝産物を解析することにより，RevA, RevB, RevC, RevDの機能ドメインから推測された環化前駆体（RM-A1a）を見いだすことができた（図1B）。RM-A1aが反応副産物ではなく，生合成中間産物であることを確認するために，ポリケチド骨格を生合成できないPKS遺伝子破壊株にRM-A1aを添加し

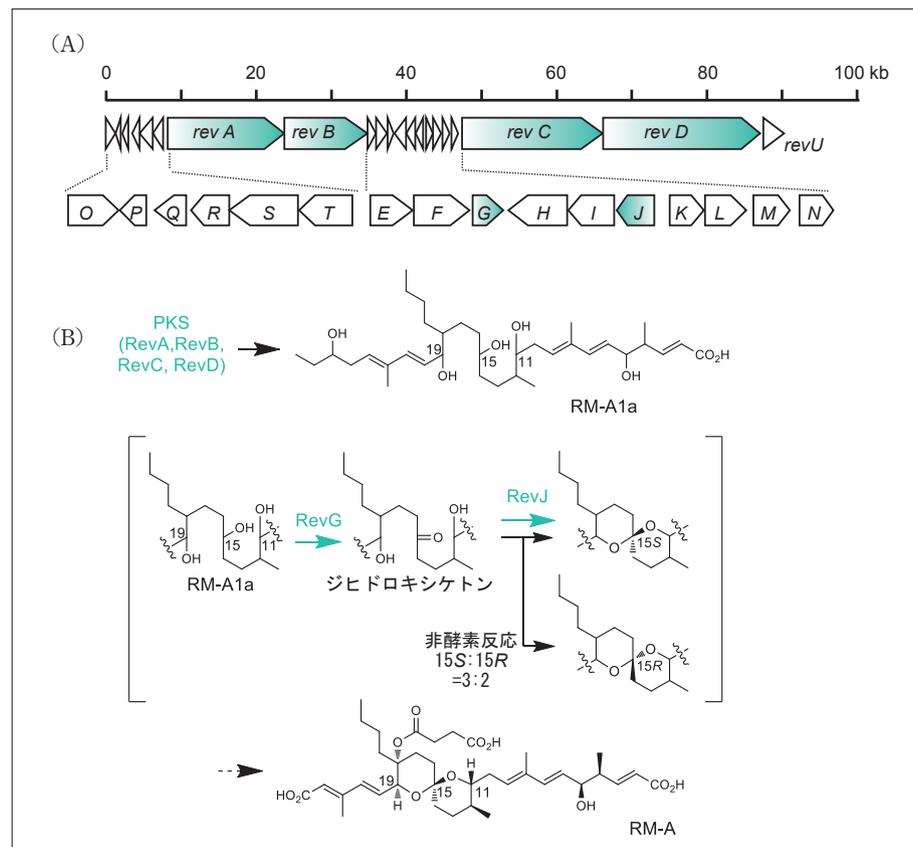


図1 ■ リベロマイシン生成遺伝子クラスター (A), RevGおよびRevJによるスピロアセタール環化反応 (B)

たときにRM-A生産が回復することを確認した<sup>(10)</sup>. RM-A1aの同定によりスピロアセタール形成がC11, 15, 19トリオール構造からの脱水環化であることが予想されたが, 確証を得るために, [1-<sup>13</sup>C,<sup>18</sup>O] 酢酸および [1-<sup>13</sup>C,<sup>18</sup>O] プロピオン酸の取り込み後にNMR解析を行うことでC-O結合の起源を解析した結果, RM-A合成はエポキシド・ケトン経由ではなく, ジヒドロキシケトンを経由する脱水環化機構であることが証明された<sup>(10)</sup>. 次に, 脱水素酵素と機能アノテーションされるRevGによるジヒドロキシケトン生成を予想しrevG遺伝子破壊株を解析したところ, 予想どおり前駆体としてRM-A1aを蓄積することが判明した. RevGは, RM-A1aを基質として脱水素反応を行うことが強く示唆されたため, 精製酵素を用いて反応産物を解析したところ, 補酵素NAD<sup>+</sup>存在下でジヒドロキシケトンを生産することが判明した. 溶媒にギ酸を含むHPLC条件では, RevG反応産物は非酵素的環化を起こし, 15Sおよび15Rの立体構造の異なるスピロアセタール化合物を3:2の割合で生成した (図1B). しかしながら, *Streptomy-*

*ces* sp. SN-593が生産するRM-Aは15Sのスピロアセタール構造のみを立体特異的に生産することから, 非酵素的に環化するのではなく, 立体制御酵素の存在を予想した. そこで, 合成遺伝子クラスターに存在する機能不明遺伝子の破壊解析を進めたところ, RM-A生産減少にかかわる遺伝子 (*revJ*) を見いだした. 立体特異的環化反応を試験管内で証明するために, RevGおよびRevJの精製酵素を調製し, RM-A1aを基質とするカップリング反応を解析したところ, RevJが反応系に存在するときのみ, 非酵素的反応が進まない弱アルカリ条件でもスピロアセタール環化が効率良く進行し, 反応産物はすべて15Sであることを見いだした<sup>(10)</sup> (図1B). スピロアセタール合成酵素 (RevJ) と高い相同性を示す遺伝子は, スピロファンジンA生産菌のゲノム配列中にもみ見いだされる非常にユニークなものである. スピロアセタール立体構造は生理活性に重要であり, 立体構造制御にかかわるRevJの結晶構造解析は今後の研究進展の鍵となるだろう.

長い間, ジヒドロキシケトン生成に続く脱水環化によ



るスピロアセタール形成は、熱力学的に安定な立体構造が非酵素的に選択されると考えられていたが、RM-A合成においては、2つの酵素、ジヒドロキシケトン合成酵素 (RevG)、スピロアセタール合成酵素 (RevJ) により立体選択的に生合成されていることが明らかとなった。生物の遺伝子探索から解明された効率的な生合成機構を用いることによって、生命科学・医薬分野に貢献する新たな生理活性化合物創製研究の進展が期待される。

- 1) H. Osada *et al.* : *J. Antibiot.*, **44**, 259 (1991).
- 2) J.T. Woo *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 4729 (2006).
- 3) H. Muguruma *et al.* : *Clin. Cancer Res.*, **11**, 8822 (2005).
- 4) A. Yano *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 15541 (2008).
- 5) T. Shimizu *et al.* : *Org. Lett.*, **2**, 2153 (2000).
- 6) M. Oliynyk *et al.* : *Mol. Microbiol.*, **49**, 1179 (2003).
- 7) H. Ikeda *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9509 (1999).
- 8) W. Li *et al.* : *J. Biol. Chem.*, **283**, 28607 (2008).
- 9) B. Frank *et al.* : *Chem. Biol.*, **14**, 221 (2007).
- 10) S. Takahashi *et al.* : *Nat. Chem. Biol.*, **7**, 461 (2011).

(高橋俊二, 長田裕之, 理化学研究所)

## プロフィール



高橋 俊二 (Shunji TAKAHASHI)

＜略歴＞1992年千葉大学園芸学部農芸化学科卒業／1994年同大学園芸学研究科農芸化学科修了／1997年同大学大学院自然科学研究科博士課程修了 (理学博士)／同年東京大学日本学術振興会研究員／1998年千葉大学大学院医学研究院助手／2002年米国ケンタッキー大学博士研究員／2005年理化学研究所長田抗生物質研究室協力研究員／2007年同長田抗生物質研究室専任研究員／2011年同化学情報・化合物創製チームチームヘッド, 現在に至る＜研究テーマと抱負＞天然物の生合成機構を明らかにする＜趣味＞熱帯魚飼育



長田 裕之 (Hiroyuki OSADA)

＜略歴＞1978年東京大学農学部農芸化学科卒業／1983年同大学大学院農学系研究科博士課程修了, 博士 (農学)／同年理化学研究所抗生物質研究室研究員／1992年同主任研究員 (現職)／2008年同ケミカルバイオロジー研究領域領域長 (現職)／2009年同ケミカルバイオロジー研究基盤施設施設長 (現職), 現在に至る＜研究テーマと抱負＞バイオプローブを用いたケミカルバイオロジー研究＜趣味＞飲酒談笑