

# ゲノム研究基軸放線菌における抗生物質生合成鍵酵素の構造予測と機能解析

●市瀬 浩志

東京大学大学院薬学系研究科

本研究は「ゲノム研究基軸放線菌における抗生物質生合成遺伝子機能の網羅的解析(2000～2002年)」として実施し、2003年に標記の研究課題名に発展的に変更となっている。

## 〈研究の目的と進め方〉

### (2000～2002年)

ゲノム研究基軸放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3 (2) の生産する抗生物質アクチノロジン (ACT) 並びにこれと類縁の他のベンゾイソクromanキノン (BIQ) 系抗生物質に注目し、その生合成を司る構造遺伝子群の機能・制御を解析し、二次代謝制御を通じた遺伝子ネットワーク解明さらには生命現象の網羅的理解に資することを目的に、4 観点 (遺伝子破壊と表現型; 再構築遺伝子群の同時発現; 構造遺伝子の個々の過剰発現と合成基質を用いた酵素化学的検討; 比較ゲノム解析) から検討する。

### (2003年)

*S. coelicolor* A3 (2) の生産する代謝経路的に独立した4種の抗生物質のひとつでポリケタイド (PK) 経路由来のアクチノロジンに注目し、その生合成に関与する構造遺伝子うち鍵酵素タンパクをコードするものに関してその産物の構造及び機能について比較ゲノム・タンパクモデリング・酵素化学の観点から解析し、ゲノム中での二次代謝関遺伝子機能の分子進化的位置付けを解明する。

## 〈研究開始時の研究計画〉

### (2000～2002年)

- 1) 抗生物質生合成遺伝子クラスター内において当該物質の生合成に直接関わる構造遺伝子並びにそれを制御する転写制御遺伝子等を取り上げ、その機能を明らかにすべく遺伝子破壊体の作成し、その表現形を物質レベルで精査する。
- 2) 多段階酵素反応である抗生物質生合成の機構を網羅的に解析するため、ACT生合成酵素遺伝子の多重遺伝子発現系をその制御遺伝子並びにプロモーター遺伝子を利用して構築する。構築した発現系はACT遺伝子クラスターを予め欠損させてある *S. coelicolor* を宿主として発現させることにより、導入遺伝子機能を選択的に解析できるシステムを利用する。
- 3) ACT生合成遺伝子の中で抗生物質生合成の鍵となる酵素を取り上げ、その酵素機能を重点的に解析する。鍵酵素としては、抗生物質の生理活性機能の発現に必須の構造因子である立体化学制御遺伝子を取りあげる。立体化学制御酵素の一つに還元酵素が知られるが、本研究では還元酵素の各種アナログ基質を合成化学的手法により供給し、その還元性のエナンチオ選択性を検証するとともに、各種点変異導入実験を行い、酵素機能のメカニズムを探る。
- 4) 抗生物質生合成遺伝子機能の網羅的解析の一環として、比較ゲノム解析を行うこととし、ACTと同じBIQ系抗生物質の生合成遺伝子クラスターを異種放線菌株

からクローニングし、生合成遺伝子クラスター内での各遺伝子の配置状況などゲノムレベルの構造比較を行う。

### (2003年)

- 5) ACT生合成に関わる鍵生合成酵素として actVI-ORF1 (RED1)、*S. villosioruber* より gra-ORF6 (RED2) を同定している。両者は異なるファミリーに属するケト還元酵素類であり、まず、ゲノム解読を終了した基軸放線菌を中心とする各種生物種でそれらの類縁遺伝子をデータベース上で探索する。BLASTで有意な相同性のあったものから一次代謝・二次代謝に関与すると思われるものを選択し、立体構造既知のタンパク配列とアラインメントが取れたものに関してホモロジーモデリング法 (FAMS) を用いて立体構造の予測を行う。
- 6) モデリング結果を基に、既に機能同定を行った上記2者のケト還元酵素との全体構造、鍵残基等の比較により構造と機能の関係を推定する。この間、前年度までに準備を進めてきた、*in vitro* 系での還元酵素類の活性検出系の最適化を行い、酵素学的検討を進める。

## 〈研究期間の成果〉

### (2000～2002年)

- 1) ACT生合成遺伝子クラスター中に存在する遺伝子 actVI-ORFA はデータベースからその機能が推定できないものの後述の比較ゲノム解析からはBIQ系抗生物質の他、多くの芳香族系PK抗生物質生合成遺伝子クラスター中に広く分布していることが判明した。本遺伝子の破壊体の代謝産物を精査したところ、新規シャント化合物である (S)-NHAB を見出した。炭素13及び重水素を用いた標識実験を行うことによりNHABがACT生合成経路から派生することを証明した(論文5)。また、本遺伝子破壊体は最終産物のACTを野生株と比較して約20%生産しており、actVI-ORFAが構造遺伝子の転写制御に関わっている可能性も示されたので、ACT生合成の初発段階、後期過程に関わる酵素遺伝子を各転写単位毎にRT-PCR法にて解析したところ、ACT生合成後期過程で機能する遺伝子の転写レベルが低下していることが判明した。
- 2) ACT生合成酵素遺伝子6個をACT生合成遺伝子クラスター内に見出されたプロモーター配列直下に結合して構築した多重遺伝子発現系を利用し、ACT生合成後期過程で鍵となる遺伝群を付加的に加えて酵素遺伝子総数で7～10の多重遺伝子発現系を構築した。この中でactVI-ORF1遺伝子はACT生合成の立体化学を決定するケト還元酵素であることが判明し、その立体 (エナンチオ) 選択性はACT生合成中間体DNPAの段階で特異的 (100%) に (S)-体を与えることが判明した。本系を利用して、BIQ抗生物質ジヒドログラナティシン (DHGRA) 生産菌から gra-ORF6 遺伝子がACTとは逆の立体特異性を有するケト還元酵素であることが見出された(論文1, 2)。DHGRAは基本骨格上ACTと逆の立体

化学を有しており、gra-6がactVI-ORF1とは逆の特異性を有する還元酵素をコードすることが見出されたことは妥当な結果だと考えられる。また、actVI-ORF1とgra-ORF6は遺伝子レベルまた翻訳アミノ酸レベル共に一次配列上で有意な相同性を示さない。両遺伝子がコードする還元酵素は同一のBIQ生成中間体を認識すると考えられ、二次代謝系でこのような例が見出されたのは初めてであり、抗生物質生成遺伝子クラスターの分子進化を考える上でも興味深い知見である。

- 3) 上記で見出した興味深い還元酵素遺伝子actVI-ORF1並びにgra-ORF6がコードする酵素タンパクを遺伝子と明確に区別する意味でRED1並びにRED2と称し機能解析を進めることにした。RED1は、ACT生成中間体の $\beta$ -ケトエステル部分を認識し、 $\beta$ -ケト位を立体特異的に還元する酵素であると考えたので、 $\beta$ -ケトエステル部分を有する11種類の人工基質を合成し、RED1の放線菌における効率的な発現系として構築したCH999/pIJ5675系を利用し、本基質のバイオトランスフォーメーションによる還元性を検証した。各 $\beta$ -ケトエステルのうち、10種の人工基質については95~99%の選択性で対応するキラルアルコールに還元されることが判明した。本研究により、RED1は $\beta$ -ケト酸以外の部位を広く基質として受容する酵素であることが判明した(論文6)。一方、RED2は同様の発現系において人工基質を認識して還元生成物を与えることはなく、RED1に比較して基質認識が厳密であることが示唆された。
- 4) 比較ゲノム研究の一環として、異種放線菌株からのBIQ系抗生物質の全合成遺伝子クラスターを取得することを目的にStreptomyces sp. AM-7161株よりメダマイシン(MED)生成遺伝子クラスターのクローニングを試みた。MEDは立体制御を含むPK基本骨格がACTと同一であり、ACTがBIQの2量体であるのに対して、デオキシヘキソース(DOH)部分を有することがACTと異なっている。PK基本骨格を形成するのに必須であるポリケタイド合成酵素(polyketide synthase: PKS)並びにDOH生成経路の初発段階で機能するTDP-glucose 4,6-dehydrataseをコードする遺伝子についてHomology-based PCRを行い、AM-7161株よりMED生成遺伝子断片と考えられる遺伝子断片を得た。本断片をプローブとしてAM-7161ゲノム遺伝子のコスミドライブラリーをスクリーニングし、MED遺伝子生成遺伝子を全て含むと考えられるインサート長約36キロ塩基対のコスミドを取得した。インサートの全遺伝子配列(36,202bp)を決定し、フレーム解析に付したところ、34個のORFが見出された。本コスミド全インサートをゲノム組込み型発現ベクターに組込み、異種放線菌に導入したところ、形質転換体でMED生産が認められたことから本コスミドにMED生成経路に必要な遺伝子が全て含まれることが証明された。また、同定された34個のORFの遺伝子産物をデータベース検索並びに既に筆者らが得ている、ACT並びにDHGRA生成遺伝子の全クラスターと併せて3種類の全BIQ生成遺伝子クラスターの比較ゲノム解析を行った。その結果、MED遺伝子クラスターの長さは約30キロ塩基対、29個のORFからなることが示唆された。機能未知ながら3クラスターに共通に存在する相同遺伝子が3種類あり、そのうちの1つは本研究課題でも先に検討したactVI-ORF6遺伝子(相同遺伝子としては、gra-ORF31, med-ORF10)であり、比較ゲノム解析から

も本遺伝子の重要性が裏付けられた(論文3)。また、本研究課題終了後の発展的成果として、MED生成遺伝子クラスター中に見出されたmed-12遺伝子については先に機能解析したactVI-ORF1と同一の機能(RED1としての立体特異的還元酵素)であることを本研究課題で使用したのと同様の手法で証明した(論文7)。

#### (2003年)

- 5) ACT生成に関与する立体化学制御タンパク(RED1)遺伝子としてactVI-ORF1遺伝子、並びにACTとは逆の立体配置を有するDHGRAの生成に関与する立体化学制御タンパク(RED2)遺伝子として、gra-ORF6を見出したことを受けて、両遺伝子産物の基質認識機構及び3次元構造を探るべく、両還元酵素の3次元構造をホモロジーモデリング法(FAMS: ゲノム情報科学班員北里大学梅山秀明教授・岩館満雄博士のご協力)により予測した。RED1はヒト由来3-ヒドロキシシアシルCoAデヒドロゲナーゼRED2は真菌由来のヒドロキシナフトレン還元酵素をそれぞれ鋳型とする有意な3次元構造モデルを得ることができたが、両者の3次元構造に有意な相同性は見出されなかった。また、RED1に関してはゲノム解析においてアノテーションの終了したS. coelicolor A3(2)ゲノム全タンパクからBLAST スコア(100bits以上)の相同タンパクが9種、さらにゲノムデータベース全体でも少なくとも45種以上の相同タンパクが見出された。見出された相同タンパクのうち、二次代謝関連と推定される6種のタンパクについてもFAMSによりホモロジーモデリングを行い、RMSD値においてプログラムの基準を満たすモデルの作成を行うことができた。
- 6) モデリング結果から推定されたRED1とRED2に関してその触媒機能の発現に重要なアミノ酸残基に点変異を導入し、両還元酵素活性をin vivoでの還元酵素生成物の生産レベルで解析した結果、RED1についてはH129とE141、RED2についてはS144、Y157とK161いずれも活性の消失または著しい低下がみられた。この結果を受けて、活性残基の活性発現への寄与を推定すべく、モデリングタンパクに補酵素(NADPH)結合させた複合体モデル FAMS Ligand & Complex (北里大学薬学部梅山秀明教授・志鷹一竹田真由子助教のご協力)を用いて作成した。その結果、初期のホモロジーモデリングの結果から予測された重要なアミノ酸残基は、補酵素ニコチンアミド部位からハイドライドの酵素反応基質への供与に際して、基質へのプロトン供与体または補酵素のリボース部分への水素結合供与体として機能することが示唆された(論文4)。また、RED1については、actVI-ORF1をC末端にHisタグを導入したpET21a(+)ベクターによる大腸菌発現系を構築し、先述した $\beta$ -ケトエステル系人工基質を利用してin vitro酵素活性検出系を確立した。RED1タンパクは可溶性タンパクとして回収され、ニッケルキレートカラム並びにゲルろ過カラムクロマトグラフィーによりSDS-PAGE上で単一バンドになるまで精製した。actVI-ORF1配列から算出される予想分子量は34.7 kDaであり、ゲルろ過での本タンパクの挙動から推定される分子量63.8 kDaであったことを考えるとホモダイマーとして存在することが示唆された。本実験結果は先のホモロジーモデリングからも妥当なホモダイマーコンプレックスが得られたことにも符合する。さらに、精製RED1を利用して酵素生成物の経時的変化を追尾した

ところ、基質である $\beta$ -ケトエステルはエステル部分が加水分解されて $\beta$ -ケト酸となり、真の基質となって還元反応が進行することが示唆された。これを証明するため取扱いが難しい $\beta$ -ケト酸基質を反応直前に調製し、吸光度法により酵素反応をリアルタイムでモニターするアッセイ系を確立して検討したところ、 $\beta$ -ケト酸型基質に対して親和性が極めて高い(Km値=15マイクロM)ことが判明した。

#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

##### (2000-2002年)

各生物種のゲノム研究が進行する中で基軸モデル種(株)の他に同属他種のゲノム構造を続々と明らかになっている。Streptomyces属放線菌も本研究課題で取り扱ったS. coelicolorの他にも全ゲノム配列が明らかになったものが1種、現在進行中のものも1種ある。単一種(株)のゲノム研究で一般に全ゲノムタンパクの3~4割が機能未知タンパクであるとされる中、比較ゲノムを行うことにより機能が未知ながら共通の表現形に關与する重要遺伝子の存在が明らかになってきた。ポストゲノム研究の対象としてこの種の重要遺伝子の優先順位が高いのは明らかであり、本研究では抗生物質生合成という特化した表現形に関して、今後の課題は残しているものの、パイオニアとして研究例を示すことができたと考えている。

##### (2003年)

生合成の鍵遺伝子の機能研究に関しては、その機能研究を行うにあたり、本ゲノム研究領域での班員協力を十分に活用し、バイオフィーマティクスと連携した酵素機能解析を行うことができた。今後別の鍵遺伝子に関しても同様の研究手法を展開しようと考えている。

本研究課題で対象としたRED1遺伝子に関しては本研究の結果、本来の生合成基質以外にも幅広い基質を認識し、極めて高いエナンチオ選択性で還元することから、本酵素に関する海外からの共同研究の申し入れがあり、発展的研究として英国研究者と鋭意共同研究を進めている。

以上を総括すると本研究は、有機化学を基盤とする機能ゲノム科学研究としてポストゲノム研究の一翼を担うことが期待される他、未利用遺伝子資源の活用に向けた新たな研究領域を開拓する可能性を有するものと位置付けられる。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

##### (2000~2002年)

- 1) 多段階生合成系全体の制御に関わると考えられる機能未知タンパク(actVI-A産物)の機能解析に関して、タンパク機能を直接的に証明する実験データが得られていない。先述した通り、本遺伝子ファミリーはその配列上からは機能既知のタンパクとは相同性が認められず、転写制御因子には容易に見出されるDNA結合領域配列も見出されない。比較ゲノム解析で見出された遺伝子間の機能相補実験も試みたがmed-10遺伝子によるactVI-ORF欠損相補は部分的にしか確認できなかった。
- 2) 特になし。
- 3) 人工基質に対する還元活性をRED1タンパクに関しては、見出せたが、RED2に関しては見出せていない。RED1とRED2の共通の基質はBIQ生合成の中間体であり、 $\beta$ -ketoエステル構造から容易に脱炭酸と環化を受けると考えられるため化学的に供給することができない。RED1の機能解析ができたのは、環化に關与する

部分を構造的に欠損させた人工基質を基質として認識したからだが、RED2に関する酵素学的な解析を進めるためには人工基質の更なる構造修飾が必要と考えられる。

- 4) 特になし。

##### (2003年)

- 5) 特になし。

- 6) 特になし。

#### 〈今後の課題〉

放線菌のゲノム研究で明らかになってきたのは、その全ゲノムに二次代謝関連タンパクが著しく多いことである。本研究課題で取り上げたS. coelicolorでは全ゲノムサイズ8.6メガ塩基対のうち、366キロ塩基対、実に4.2%に達する。ゲノム研究が開始される以前から本菌株は放線菌の中で最も実験的解析が進んだモデル株とされた来たが、二次代謝関連遺伝子でみれば143キロ塩基対(1.6%)に過ぎない。放線菌は二次代謝産物の代表である、既知の抗生物質の大半を生産することが知られるなど、新たな医薬品や機能性物質の供給源としての魅力は計り知れない。これまで看過されてきた新たな物質生産系がゲノム研究の進展によって展開できる可能性があり、今後、未利用遺伝子の有効利用などポストゲノム研究としての応用研究の展開が期待される。

また、本研究結果で有用性が明らかになった通り、生物情報科学分野と実験科学系分野の共同研究は今後も積極的に推進すべきである。例えば、本研究で対象としたタンパクは還元酵素であり、酵素基質の他に補酵素を要求する。タンパクの3次元構造から酵素機能を解析する場合、本件の場合、タンパク・基質・補酵素の三位一体の複合体構造を明らかにすることが理想であるが、本研究では補酵素-タンパク複合体の構築の段階である。複合体基質認識能を更に追及するために三位一体複合体のモデリングの可能性を検討していきたい。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

##### 論文

1. 0112061746  
Ichinose, K., Taguchi, T., Bedford, D. J., Ebizuka, Y., Hopwood, D. A., Functional Complementation of Pyran Ring Formation in Actinorhodin Biosynthesis in Streptomyces coelicolor A3(2) by Ketoreductase Genes for Granaticin Biosynthesis, J. Bacteriol., 183, 3247-3250 (2001).
2. 0112061750  
Taguchi, T., Ebizuka, Y., Hopwood, D. A., Ichinose, K., A New Mode of Stereochemical Control Revealed by Analysis of the Biosynthesis of Dihydrogranaticin in Streptomyces violaceoruber Tu22, J. Am. Chem. Soc., 123, 11376-11380 (2001).
3. 0307151135  
Ichinose, K., Ozawa, M., Itou, K., Kunieda, K., Ebizuka, Y., Cloning, sequencing and heterologous expression of the medermycin biosynthetic gene cluster of Streptomyces sp. AM-7161: towards comparative analysis of the benzoisochromanquinone gene clusters, Microbiology, 149, 1633-1645 (2003).
4. 0602091440  
Taguchi, T., Kunieda, K., Takeda-Shitaka, M., Takaya D., Kawano, N., Kimberley, M. R., Booker-Milburn, K. I.,

Stephenson, G. R., Umeyama, H., Ebizuka, Y., Ichinose, K., Remarkably different structures and reaction mechanisms of ketoreductases for the opposite stereochemical control in the biosynthesis of BIQ antibiotics, *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 5917-5927 (2004).

(本特定領域研究課題成果から発展的に得た成果に関わる論文)

5.

Ozawa, M., Taguchi, T., Itoh, T., Ebizuka, Y., Booker-Milburn, K. I., Stephenson, G. R., Ichinose, K., Structure and biosynthetic implication of (S)-NHAB, a novel shunt product, from a disruptant of the actVI-ORFA gene for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Tetrahedron*, 59, 8793-8798 (2003).

6.

Booker-Milburn, K. I., Gillan, R., Kimberley, M., Taguchi, T., Ichinose, K., Stephenson, G. R., Ebizuka, Y., Hopwood, D. A., Enantioselective Reduction of  $\beta$ -Keto Acids with Engineered *Streptomyces coelicolor*, *Angew. Chem. Int. ed.*, 44, 1121-1125 (2005).

7.

Li, A., Itoh, T., Taguchi, T., Xiang, T., Ebizuka, Y., Ichinose, K., Functional studies on a ketoreductase gene from *Streptomyces* sp. AM-7161 to control the stereochemistry in mdermycin biosynthesis, *Bioorg. Med. Chem.*, 13, 6865-6863 (2005).