

非天然型プレニル化芳香族化合物合成系の構築とその利用

● 葛山 智久

東京大学生物生産工学研究センター

<研究の目的と進め方>

一つの細胞をシステムとして完全に理解するためには、その細胞が利用している代謝経路と、それに関わる全ての遺伝子を同定することが必要不可欠である。しかしながら、全ゲノム配列が明らかにされた大腸菌や枯草菌をはじめとする微生物ですら、すべての代謝経路の全貌は解明されていない。近年、大腸菌や枯草菌を中心とした精力的なポストゲノム研究により、必須遺伝子が同定されつつあり、一次代謝経路に関してはその全容解明に向けて大きく進展している。一方、二次代謝経路に関しては、個々の細菌に特異的であることが多いこと、機能未知遺伝子が多いことから、一次代謝経路の研究に比べてはるかに遅れているのが現状である。本研究課題では、多くの二次代謝産物を生産する放線菌を研究材料として、新しい代謝酵素を発見、その機能解析を行い、さらには、その酵素を有用物質の生産に利用することを目的としている。より具体的には、放線菌の生産するイソプレノイド、特に、これまで生合成が未解明であったジメチルアリル化 (C₅) やゲラニル化 (C₁₀) といった修飾を受けた二次代謝産物に注目し、その生合成における鍵酵素であるプレニル基転移酵素やその他の生合成酵素の詳細な機能解明を通して、真正細菌におけるイソプレノイド生合成のシステム的理解を目指す。

<2007年度の研究の当初計画>

本研究課題では、プレニル基転移酵素を大量発現させた大腸菌の形質転換体を用いた微生物変換を基本的な原理として、ジメチルアリル化芳香族化合物やゲラニル化芳香族化合物の合成系構築を目指す。そのためには、プレニル基転移酵素の詳細な機能解明に加え、プレニル基を供給するメバロン酸経路という生合成システムの理解が必要不可欠である。

放線菌、*Streptomyces* sp. CL190 株の生産するイソプレノイドーポリケチド融合化合物、ナフトルピンの生合成遺伝子クラスターに見出した *nphB* のコードするタンパク質は、ゲラニル 2 リン酸 (GPP, C₁₀) をプレニル供与体とし、*naringenin* をゲラニル化することのできるゲラニル基転移酵素である。これまでに、大腸菌で発現させた組換えタンパク質を用いて、*naringenin* 以外にも *daizidein* と *genistein* といったフラボノイドが修飾されることを見出した。これらのゲラニル化されたフラボノイドは、これまでに天然からは単離されておらず、その生理活性にはたいへん興味を持たれる。また、*nphB* のホモログとして、*S. coelicolor* A3(2) 由来の SCO7190 の機能解析を行い、本酵素も、*NphB* ほどではないが基質特異性が広く、ジメチルアリル 2 リン酸 (DMAPP, C₅) をプレニル供与対として、生理的基質ではない *naringenin*、*olivetol*、*resveratrol* と反応することができることを明らかにしている。2007年度は、新たに取得した *NphB* ホモログの機能解析とプレニル基転移酵素の詳細な反応機構を解明することを目的とした。新たな *NphB* ホモログとしては、以下の 2 つの遺伝子産物について生化学的解析を行った。(1) 一つめは、*furaquinocin*

生産菌、*Streptomyces* sp. KO-3988 由来の *Fur7*、(2) 二つめは、抗生物質 *novobiocin* 生産菌である *S. niveus* 由来の *NovQ* である。

(3) また、*NphB* を用いて、酵素学的パラメーターを求めることにより、その反応機構を明らかにすることを計画した。

<2007年度の成果>

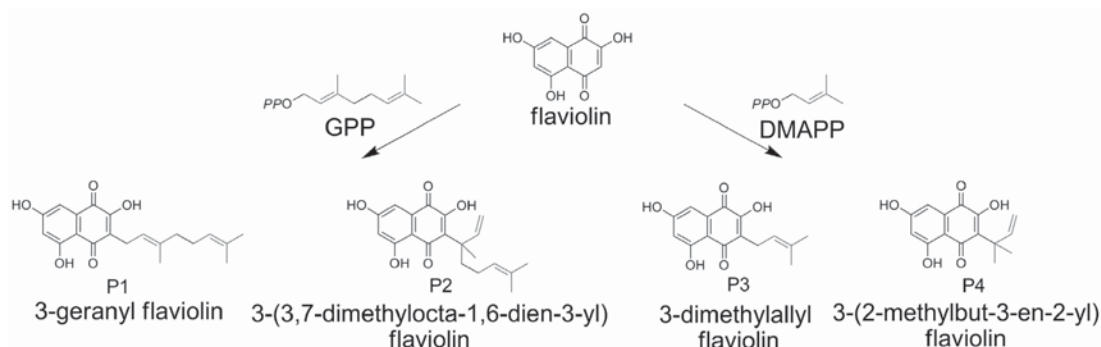
(1) *furaquinocin* 生産菌、*Streptomyces* sp. KO-3988 株由来の *Fur7* の機能解析

Streptomyces sp. KO-3988 株から *furaquinocin* 生合成遺伝子クラスターがクローニングされたので、その中にコードされている *NphB* ホモログ、*Fur7* (*NphB* と 35 % の相同性を示す) の機能解析を行うため、大腸菌での発現系を構築した。発現ベクター *pHIS8* に *fur7* 遺伝子を導入したプラスミドを構築し、大腸菌 BL21(DE3) 株で発現させて組換えタンパク質を取得した。次に、精製した組換えタンパク質 *Fur7* を炭素数 10 のゲラニル 2 リン酸または炭素数 5 のジメチルアリル 2 リン酸存在下、フラボノイドとしては *naringenin*、*daizidein*、*genistein*、*curcumin*、*galangin*、*isochlorogenic acid*、*feruloyl p-coumaric acid* としては *p-coumaric acid* と *caffeoyl p-coumaric acid*、*polyketide* としては *orietanol*、*resveratrol*、*flavonol* を使用し、反応を行った。その結果、予想に反して、試したフラボノイドとは反応せず、*resveratrol* と *flavonol* のみが反応することが判明した。次に、反応スケールを大きくして、反応産物の精製を行い、NMR と MS 分析によって反応産物の構造を決定した。その結果、次頁の図に示したように、GPP をプレニル供与体として使用した場合には、3-geranyl flavonol と 3-(3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-yl) flavonol が、DMAPP の場合には 3-dimethylallyl flavonol と 3-(2-methylbut-3-en-2-yl) flavonol が反応産物であることが判明した。また、*stilbenes* の一種である *resveratrol* を基質として使用した場合には、2-geranyl *resveratrol* が生成することが明らかになった。また、この反応の場合には、DMAPP は基質として利用されなかった。

次に、*Fur7* の金属要求性について検討した。その結果、金属イオンの有無で活性に変化がないこと、また、1 mM EDTA 存在下においても、プレニル化活性は変化しないことが判明した。ただし、*CuCl₂* 存在下では反応が 40 % 程度に低下した。さらに、酵素内に金属が含まれているか否かを、Inductively Coupled Plasma-Atomic emission spectrometry (ICP-AES) を用いて分析したところ、Mg、Mn、Fe、Co、Cu、Zn のいずれも検出されず、この結果から、*Fur7* は真に反応には金属イオンを要求しないことが判明した。

(2) *novobiocin* 生産菌、*Streptomyces niveus* 由来の *NovQ* の機能解析

Streptomyces niveus から *novobiocin* 生合成遺伝子クラスターがクローニングされたので、その中にコードされている *NovQ* (*NphB* とはわずか 17 % の相同性を示すにすぎない) の基質特異性を解



析するため、大腸菌での発現系を構築した。

NovQ はこれまでの研究で、DMAPP をプレニル基供与体、4-hydroxyphenyl pyruvate (4-HPP) をプレニル基受容体として、二価金属イオン非存在下で、dimethylallyl 化された 4-HPP を生成することが報告されている。しかしながら、4-HPP の構造アナログである tyrosine や hydroxyphenyl lactate、hydroxybenzoate とは反応しないことが明らかにされており、それ以上の基質特異性については調べられていない。

発現ベクター pHIS8 に *novQ* 遺伝子を導入したプラスミドを構築し、大腸菌 BL21(DE3) 株で発現させて組換えタンパク質を取得した。次に、精製した組換えタンパク質 NovQ を炭素数 5 のジメチルアリル 2 リン酸存在下、フラボノイドとしてはナリンゲニン、ダイゼイン、ゲニステイン、クリシン、ガランギン、イソスクラネチン、フェニルプロパノイドとしては *p*-クマル酸とカフェ酸、ポリケチドとしてはオリベトール、レスベラトロール、フラビオリンを使用し、反応を行った。その結果、予想に反して、NovQ はいくつかのフラボノイドと反応すること、さらには、*p*-クマル酸と反応して、ドゥルパニンを生産することが判明した。また、レスベラトロールとも反応し、そのプレニル化の位置は、これまでのプレニル化反応とは異なることが示唆された。それぞれの反応産物の構造については現在解析中である。

(3) NphB を用いた反応機構の解明

NphB を用いた詳細な酵素学的パラメーターの解析からは、この反応が逐次定序反応で進行することを明らかにした。さらには、結晶構造解析から、GPP が第一基質であること、GPP から生じるゲラニルカチオンが芳香族基質上の電子と作用することで C-C 結合が形成されることが示唆された。

<国内外での成果の位置づけ>

Fur7 のように、通常のプレニル化反応とリバースプレニル化反応の両活性を併せ持つ酵素はこれまでに、furanonaphthoquinone 生産菌から取得されている。しかしながら、Fur7 は炭素数 10 のゲラニル基のみならず、炭素数 5 のジメチルアリル基をも付加することができる点で、新規なプレニルトランスフェラーゼである。これまでに取得されたプレニルトランスフェラーゼはいずれも、ゲラニル基かジメチルアリル基のいずれかのみを基質として利用するのに対して、Fur7 は両方の基質を利用できるはじめてのプレニルトランスフェラーゼとして注目に値すると考えている。

NovQ に関しては、これまでに、芳香族化合物として、4-HPP のみが基質として利用されることが報告されていたが、この研究

によって、様々なフラボノイドとも反応できることが明らかになった。しかも、そのプレニル化の位置は、これまで解析された NphB、SCO7190、Fur7 とは異なることが示唆された。今後、反応産物の構造を決定することで、NovQ 反応の新規性をより詳細に証明するつもりである。また、NovQ が *p*-クマル酸と反応して、ドゥルパニンを生成することを明らかにしたが、これはドゥルパニンを生合成するはじめての酵素の例である。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

結晶構造が明らかになっている NphB と、Fur7 とではアミノ酸レベルで 35 % の相同性を示す。一方で、Fur7 の活性検出の結果から明らかになったように、Fur7 は反応に Mg²⁺ は不要であるが、NphB では Mg²⁺ は必須である。そこで、NphB の結晶構造データを用いてホモロジーモデリングにより、Fur7 の構造を予測し、次いで、金属イオンの要求性に強く関与していると予測されるアミノ酸残基を同定し、NphB に部位特異変異により金属イオン要求性の関与を証明することを試みた。しかしながら、予想に反して、酵素活性が消失したのみであった。一方、Fur7 にも同様に変異酵素を作製したが酵素活性を失っていた。このように、ホモロジーモデリングだけでは酵素反応に関わる重要なアミノ酸を同定しきれないことから、今後は、Fur7 の結晶化と構造解析を行うことで、より詳細な反応機構を解明する必要があると考えている。

<今後の課題>

NphB 以外のプレニルトランスフェラーゼの結晶化と構造解析を行うことで、より詳細な反応機構が解明されると考えている。また、NphB のような芳香族基質プレニルトランスフェラーゼは基質特異性が寛容であることから物質生産に関して応用性が高いと考えられるため、より多くのプレニルトランスフェラーゼのパラエティーをそろえるために、土壌から直接、プレニルトランスフェラーゼ遺伝子をクローニングするための PCR プライマーの設計が重要であると考えている。また、このようにクローニングしたプレニルトランスフェラーゼを利用してさらに多様性に富んだプレニル化合物ライブラリーの構築につなげていくことが今後の課題である。

<成果公表リスト>

801211530 (その他)

Kuzuyama, T., テルペノイド-ポリケチド融合化合物の生合成とその鍵酵素を利用した有用物質生産, 蛋白質 核酸 酵素 Vol. 52, 1736-1741, (2007).