

## 微生物天然化合物の構造・機能多様性を創出する新規合成酵素・機構に関する研究



北海道大学大学院工学研究院応用化学部門 大 利 徹

## はじめに

微生物の生育に必須である一次代謝経路は、主に大腸菌や出芽酵母を用いて明らかにされ、全て共通であると考えられてきた。しかし様々な菌株のゲノム配列が明らかになるにつれ多様性があることがわかってきた。例えばイソペンテニル二リン酸 (isopentenyl diphosphate: IPP) は全てのテルペノイド化合物の出発原料であり、その生合成経路は出芽酵母を用いて明らかにされたメバロン酸経路が知られていた。しかし大腸菌のゲノムには、出芽酵母で同定された遺伝子と相同な遺伝子は見いだされず、精力的に解析された結果、新規な 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) 経路が見出された。筆者は本研究に触発され、呼吸の電子伝達成分として知られているメナキノンやペプチドグリカンの生合成で、既知経路とは異なる経路・機構があることを見出した。また、様々な生理活性を示す二次代謝産物は、一次代謝産物に比べ複雑な構造を持つものが多い。筆者は、これらの構造がどのような酵素反応により構築されるか興味を持ち、テルペノイド化合物、ペプチド化合物、多価不飽和脂肪酸を題材に生合成機構の解明を試みてきた。ここではそれらの概略について紹介したい。

## 1. 新規一次代謝経路の発見と解明

## 1-1. メナキノン新規生合成経路 (フタロシン経路)

種々の微生物のゲノム解析により、ピロリ菌を含む一部の微生物が、電子伝達成分であり生育に必須なメナキノンの既知生合成経路遺伝子群を持っていないことに気付いた。新規経路の存在を予想し、①既知経路保有株と非保有株のゲノム配列を詳細に比較し、後者に特異的な遺伝子を特定後、②特定した遺伝子の破壊株からメナキノンに依存して生育した株を選抜し、③選抜株が蓄積した中間体を精製し構造決定した。さらに、④選抜遺伝子の組換え酵素と精製中間体を基質に用いた *in vitro* 解析を行い、コリスミ酸と S-アデノシルメチオニンを出発基質とする、新規な 5 酵素反応からなる経路を完全解明した (図1)。また乳酸菌などの有用腸内細菌は既知経路を利用することから、ピロリ菌に特異的な抗生剤の開発を目的に、新規経路阻害剤を微生物二次代謝産物に探索し 6 つの化合物を得た。

## 1-2. ペプチドグリカン新規生合成機構

ペプチドグリカン生合成では、異性化酵素により L-Glu から供給される D-Glu が中間体基質 (UDP-MurNAc-L-Ala) に結合する。しかし、イネ白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae*) などは Glu 異性化酵素遺伝子を持っていないことから、新規な経路の存在が予想された。そこで Glu 異性化酵素遺伝子欠損大腸菌を宿主に、イネ白葉枯病菌のゲノム DNA を供与体を用いた相補実験を行い、相補に必須な 2 つの遺伝子を同定した。次いで組換え酵素を用いた *in vitro* 解析を行い、MurD2 酵素が UDP-MurNAc-L-Ala に L-Glu を結合し、次いで新規酵素 MurL が生

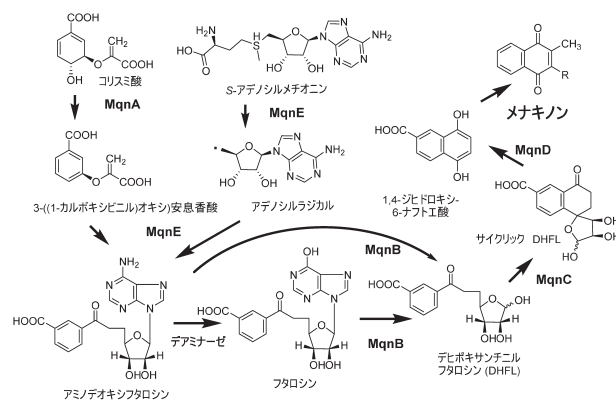


図1 メナキノン新規生合成経路

成物末端の L-Glu を、異性化酵素として最初の例となる ATP を補酵素に用いる反応で、D-Glu に異性化することを明らかとした。またイネ白葉枯病菌に特異的な農薬の開発を目的に、新規酵素の阻害剤を微生物二次代謝産物に探索し 1 つの化合物を得た。

## 2. 複雑な骨格を持つ二次代謝産物を構築する生合成酵素・遺伝子

## 2-1. 抗生物質生合成遺伝子の同定

二次代謝産物の生合成遺伝子に関する情報が乏しかった 1990 年代初めに、抗生剤 fortimicin と chlortetracycline 生産菌の宿主・ベクター系を確立し、各々の全生合成遺伝子を取得した結果、これらは染色体上でクラスターを成していることを明らかにした。この過程で、fortimicin に formimidoyl 基を導入する酵素と tetracycline 骨格にクロロ (Cl) 基を導入する酵素遺伝子を初めて同定した。

## 2-2. 天然テルペノイド化合物に構造多様性をもたらす新規生合成酵素・遺伝子

5 万種類以上が知られている天然テルペノイドは、どれも炭素数 5 (C5) の IPP から生合成されるが多様な構造を持つ。2000 年前後に、構造多様性をもたらす機構の解明が gibberellin に代表される真核生物起源の生産物を題材に行われていたが、原核微生物の放線菌も生産する報告があったことから (図2)、以下の解析を行った。① 4 分子の IPP が付加重合した直鎖状 C20 基質ゲラニルゲラニル 2 リン酸を環化し、terpentecin と viguiepinol の基本骨格を形成する、原核生物起源として初の例となるジテルペン (C20) 環化酵素の諸性質を明らかとした。また、② C10 のモノテルペンとポリケチド (furaquinocin), C15 のセスキテルペンと糖 (BE-40644), ジテルペンとアミノ酸 (brasiliardin A) からなるハイブリッド化合物の生合成遺伝子群、および③ KS-505a の生合成において、8 分子の IPP が付加重合した直鎖状 C40 基質オクタプレニル 2 リン酸を環化し、天然物で唯一の多

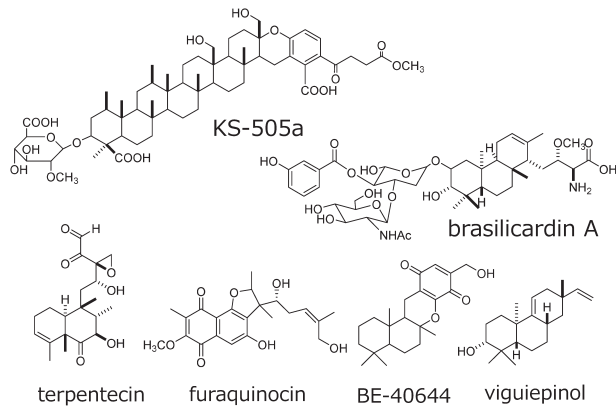


図2 生合成研究を行ったテルペノイドの構造

環テトラテルペン (C40) 骨格を形成する生合成遺伝子を取得し解析した。また、④二次代謝テルペノイドを生産する放線菌は、原核微生物が IPP の供給に利用する MEP 経路に加え、メバロン酸経路も併せ持ち、二次代謝生産に連動して IPP を供給することを明らかとした。さらに糸状菌が生産する⑤インドールジテルペン paxilline の生合成酵素の諸性質、⑥ジテルペン fusicoccin/brassicicene の生合成経路を完全解明し生合成酵素の諸性質も明らかとした。

### 2.3. 天然生理活性ペプチドに構造多様性をもたらす新規生合成酵素・遺伝子

天然生理活性ペプチドは、分解酵素に対する防御や多様な生理活性をもたらすため特異で複雑な構造を持つ (図3)。それらの生合成に関与する、①pheganomycin の生合成においてフェニルグリシン誘導体のカルボキシル基と 5 アミノ酸からなるペプチドの N 末アミノ基でアミド結合を形成する酵素、②ketomemycin の生合成において、ペプチド結合の窒素が炭素に置換された、偽フェニルアラニンジペプチドを形成する酵素群、③リボソームペプチド MS-271 の生合成において、C 末端 L-Trp を D 体に異性化する酵素を発見し、何れも組換え酵素を用いて詳細に解析した。また、④ $\gamma$ -ポリグルタミン酸に含まれる D-Glu は、伸長鎖に取り込まれた L-Glu が異性化されて生成することも明らかとし、さらに、⑤リボソームで合成され 21 アミノ酸からなる grisemycin に含まれる D 体 9 アミノ酸残基の生成に関与する *grmL* 遺伝子を同定した。

### 2.4. 多価不飽和脂肪酸合成酵素の精密解析と応用

一部の原核微生物は、ドコサヘキサエン酸 (DHA; C22:6  $\omega$ 3) (炭素鎖長が 22, シス二重結合の数が 6, メチル末端からの最初のシス二重結合の位置が 3 番目の炭素であることを示す)、エイコサペンタエン酸 (EPA; C20:5  $\omega$ 3)、アラキドン酸 (ARA; C20:4  $\omega$ 6) をマロニル-アシル-キャリアープロテイン (ACP) を伸長単位とする連続反応で合成する。これら酵素は互いに高い

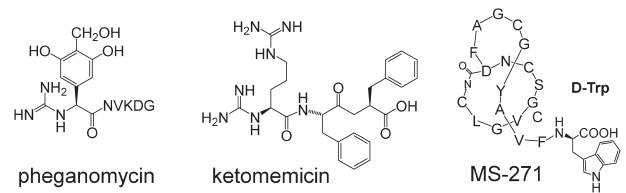


図3 生合成研究を行ったペプチド系化合物の構造

相同性を有するが、炭素鎖長や  $\omega$ 3/ $\omega$ 6 を厳密に作り分ける。そこで、各酵素の触媒ドメインの組換え酵素と、各種アシル-ACP 中間体基質を用いて詳細に解析した結果、①EPA と DHA の炭素鎖長の違いは、DHA 合成酵素に 2 つ存在する炭素鎖長伸長ドメイン (KS ドメイン) の 1 つ (KS<sub>C</sub>) が C20 から C22 へ炭素伸長できることに起因し、②EPA と ARA の違い ( $\omega$ 3 と  $\omega$ 6) は、両者の生合成で共通の中間体である炭素鎖長 6 の基質に作用する脱水ドメイン (DH<sub>FabA</sub> と DH<sub>PKS</sub>) の違いによることを明らかとした。本結果を基に、③DHA 合成酵素の KS<sub>C</sub> 活性中心の 1 アミノ酸変異により EPA 合成酵素へ改変可能なことを示した。さらに上記 EPA 生産菌は生産性が低く実用化が困難であり、現在魚油からの精製に依存している EPA の実用発酵生産を目的に、④実生産に用いられている真核微細藻類由来 DHA 合成酵素の KS ドメインに変異導入し、EPA を等量併産する酵素への改変を達成した。

### 3. おわりに

以上述べてきたように、筆者はゲノムマイニングにより有害微生物も持つ新規一次代謝経路の解明と、それらの特異的阻害剤の探索を行ってきた。また、多様な生理活性を示す複雑な構造を持つ二次代謝産物の生合成酵素の解析も行ってきた。大村先生が開発されたイベルメクチンに代表される実用化薬剤の多くは微生物代謝産物起源であること、さらに新型コロナウイルス感染症に代表されるパンデミックの際には、安価で大量供給可能な低分子薬剤が必要不可欠であることから、今回の受賞を励みに今後も微生物起源の天然生理活性物質研究を継続していきたいと考えている。

**謝辞** 本研究は、協和発酵工業(株)、富山県立大学、北海道大学において、多くの学生、ポスドク、共同研究者、所属教員の協力と科研費や民間財団の研究助成金により得られた成果であり、この場を借りて深謝致します。特に、学生時代にサイエンスの基礎を教わった、故・水島昭二先生、放線菌の基礎と面白さを教わった、長谷川護博士(協和発酵工業(株))、生合成研究の楽しさと難しさを教わった、故・瀬戸治男先生に心より感謝申し上げます。