

生合成マシナリーを用いた天然物合成

北海道大学大学院理学研究院

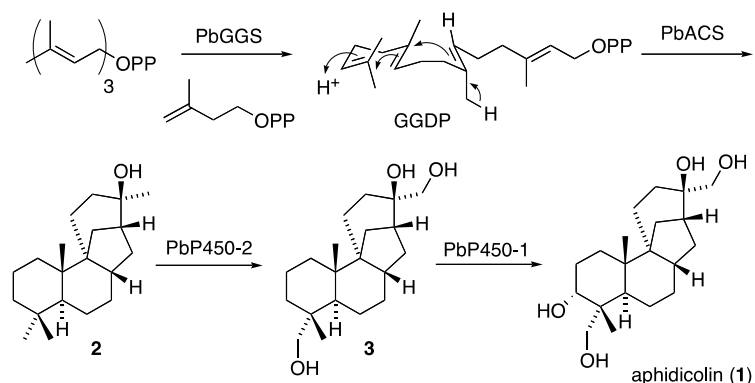
及川英秋

1. はじめに

強力な生物活性を持つ天然物の全合成は有機合成の華とも呼ばれ、その複雑な構造を如何にエレガントに合成するかは、合成化学者の腕の見せ所であり、優れた研究者が効率の良い合成法を報告してきた。しかし有機合成による天然物の合成は、化合物種により工夫を凝らさねばならない個別的なアプローチといえよう。果たしてポリケタイド、テルペン、アルカロイドといった様々な天然物を合成する一般的な方法論はあるだろうか？一旦有機合成から離れ、天然物を生産する生物がどのようにして生合成しているか考えてみよう。生物はたった一つの方法論、すなわち生体物質を原料に、補酵素および酵素という触媒を利用して合成している。つまり生物は生合成経路により出発原料を使い分け、C-C 結合形成を含めたユニークな骨格合成用酵素を用意しているが、その種類は少なく普遍性が高い。そして骨格を様々に修飾する酵素の種類も、経路に依存せず共通である。もし天然物の設計図である遺伝子が、容易に入手可能で、その発現が自在に行えるなら、立所に天然物の全合成が達成できるのではないか。今まさにこうしたアプローチが現実味をおびている。我々は天然物生合成に必要な酵素群を生合成マシナリーと呼び、それらをありふれたモデル生物中で再構築し、天然物を全生合成する方法論を検討している。

2. 4個の酵素による4環性ジテルペン、アフィディコリンの合成研究

真核生物である糸状菌由来ジテルペン、アフィディコリン(1)は、DNA複製の主役であるDNAポリメラーゼ α の特異的阻害剤である。本化合物は連続した4級炭素からなる複雑な環構造を持つことなどから、多くの合成化学者がその全合成を競い合い、これまで全合成例は10以上あ



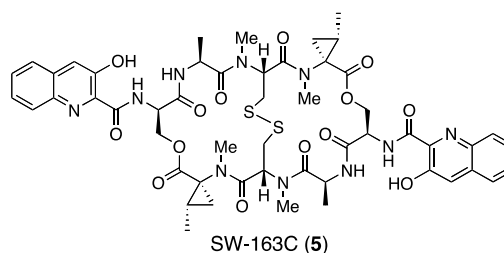
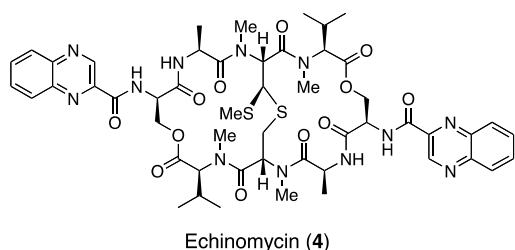
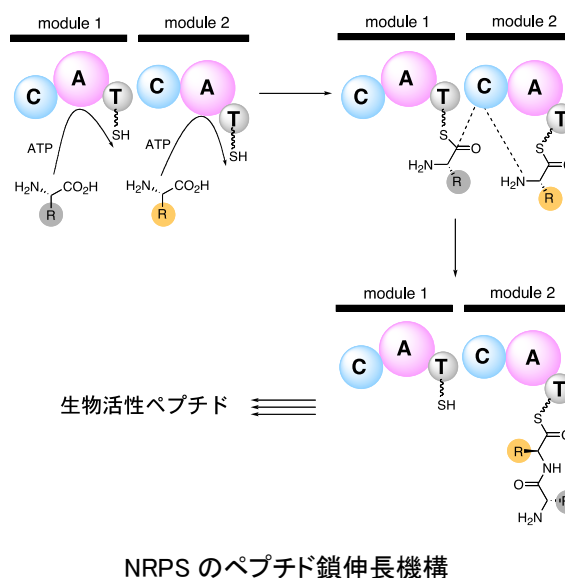
Scheme 1 アフィディコリンの生合成

る¹⁾。既に我々は、GGDP合成酵素(PbGGS)、環化酵素(PbACS)、2種の水酸化酵素(PbP450-1, PbP450-2)をコードする遺伝子からなる1の生合成遺伝子クラスターの解析に成功していた²⁾。そこで麹菌(*Aspergillus oryzae* NSAR1株)に対して、これらをコードする遺伝子PbGGS、PbACSおよびPbP450-2を形質転換したところ、導入株は3-deoxy体3を、この株にさらにPbP450-1を導入した株では1を生産した³⁾。これによ

り Scheme 1 に示すようにジテルペンの普遍的前駆体 GGDP から 4 環性アルコール **2** が生成した後、PbP450-2 が 2 箇所をさらに PbP450-1 が 1 箇所を水酸化して **1** を与えるという極めて単純な経路で生合成することが判った。既に環化に関しては詳細な検討をしており⁴⁾、酵素が変換する個々の反応を明らかにした形で、**1** の全生合成を達成した。現在、やはり 4 個の酵素で生合成されるポリケタイド系植物毒素ソラナピロンの合成も検討している⁵⁾。

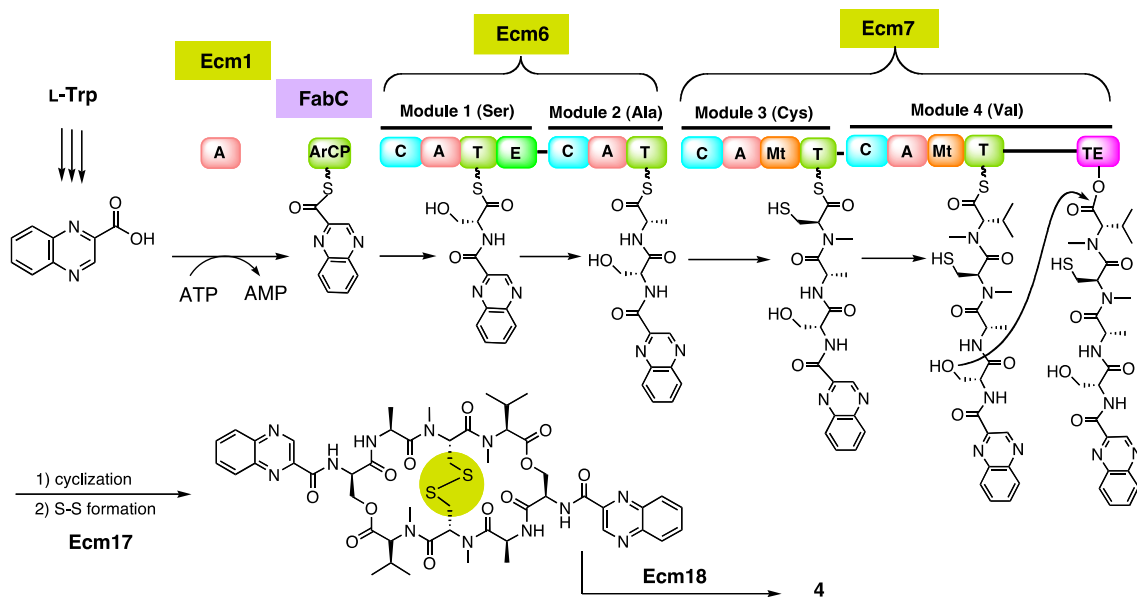
3. 13 個の酵素による抗腫瘍性環状ペプチド、エキノマイシンの合成

二次代謝産物の中には、ペニシリン、バンコマイシン（抗生物質）、シクロスポリン（免疫抑制剤）などの臨床上重要なペプチドが数多く知られる。これらの化合物は、タンパク合成とは全く異なる合成装置、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。多くの NRPS は、複数の酵素（機能ドメイン）が繋がったモジュールと呼ばれる基本単位からなる巨大ポリペプチドであり、アミド結合形成反応を触媒する⁶⁾。我々は、DNA 二本



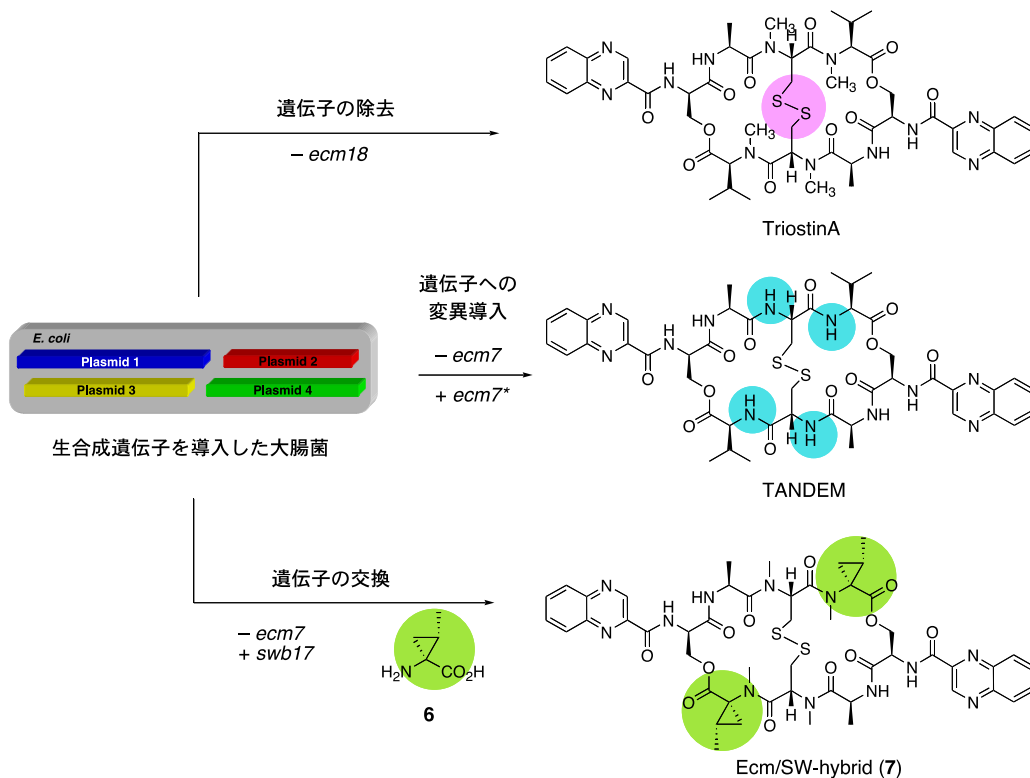
鎖へのインターカレーター能を有し、強力な抗腫瘍活性を示す二量体型ペプチド系抗生物質エキノマイシン(**4**)を酵素合成すべくその生合成遺伝子クラスターを同定し、このうち生合成に必須な全生合成遺伝子 16 個（13 個が酵素用）を骨格合成（2 個）、基質供給（8 個）およびその他（6 個）を仕分けし組み込んだ 3 個の発現用プラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) に導入した。形質転換菌を培養した結果、**4** の生成が確認でき、大腸菌内で前駆体を添加することなく **4** の *de novo* 合成に成功した⁷⁾。この過程でクロモフォアが L-Trp より 7 工程で生合成されること⁸⁾、最後のメチルアセタールの形成は、メチル基転移酵素による特異な反応であることを明らかにしている⁷⁾。

NRPS はその反応機構からモジュールの入替えおよびモジュールの増減が可能な酵素



Scheme 2 エキノマイシンの生合成経路

と予想されていたが、その実施例は極めて少ない。今回開発した 16 個もの放線菌由来天然物生合成遺伝子の大腸菌での発現は、様々な遺伝子改変による誘導体合成を可能にすることが期待された。そこで **4** と構造の類似した SW-163 (**5**) のハイブリッド化合物の合成を目指して、**5** の生合成遺伝子クラスター取得し、2 種の NRPS (*swb16*, *swb17*) 遺伝子を同定した。次いで新たに得られた NRPS 遺伝子 (*swb17*) と同等な機能を有する *ecm7* を入れ換えたプラスミドを構築し、この NRPS 遺伝子を搭載したプラスミドにて

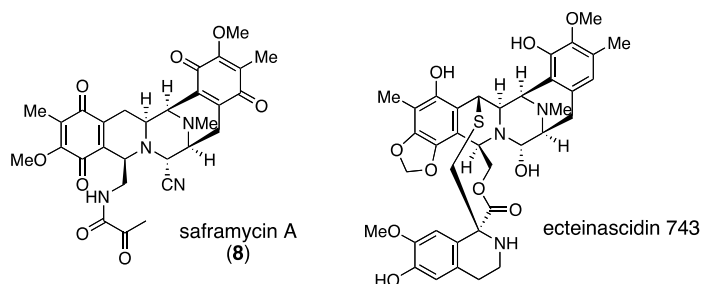


Scheme 3 遺伝子工学的的手法によるエキノマイシン誘導体の合成

形質転換した大腸菌を調製した。合成したノルコロナミン酸 (6) を培地に添加して本形質転換菌を培養したところ、予想したハイブリッド化合物 7 の生産を確認できた (Scheme 3)⁹⁾。これは異なる物質を生産する NRPS を組み合わせて骨格を構築できた最初の例である。次に遺伝子の改変 (変異導入¹⁰⁾、除去⁷⁾) では、予想した構造を持つ誘導体が合成可能であった。この他、人工的合成したオクタペプチド誘導体を NRPS 中のペプチド鎖切出し専用ドメイン TE を用いた多様なペプチド誘導体の合成にも成功している¹¹⁾。

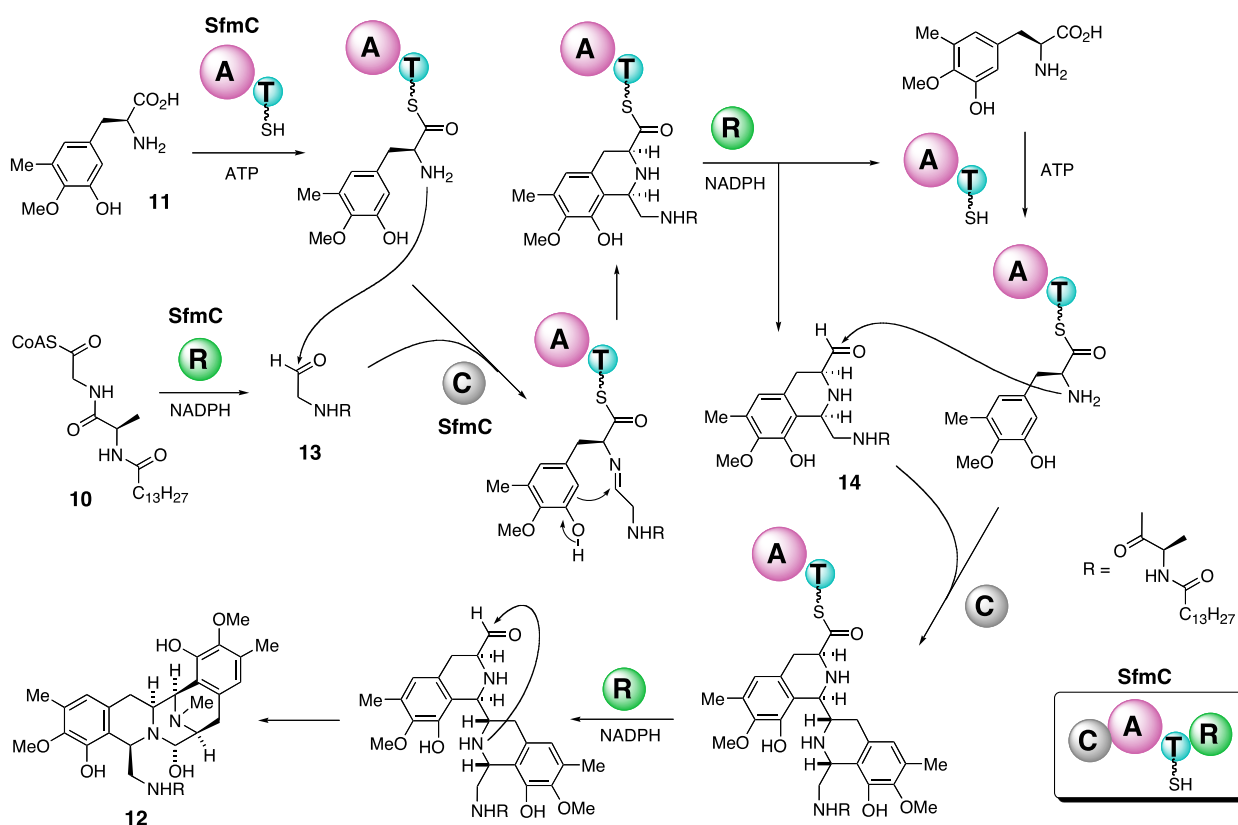
4. 単一酵素による抗腫瘍性物質サフラマイシンの骨格合成

我々が開発した多数遺伝子一挙導入システムが、有用物質の生産に適用できることを確認するため、特異なテトラヒドロイソキノリン骨格を持つ抗腫瘍性抗生物質サフラマイシン (8) の骨格合成を行ったので紹介したい。



この化合物の構造類縁体には、ホヤ由来のエクチナサイジン 743 という現在臨床用に市販されている抗ガン剤がある。本物質は、天然から少量しか単離されないため、近縁の天然物から供給されているものの、その生産効率はそれほど高くない¹²⁾。従って酵素法により供給できれば、大量供給する上での一つの解決策となり得る。全長 62 kb の 30 個の遺伝子からなるサフラマイシンの遺伝子クラスターは既に同定されていたものの¹³⁾、本来ペプチド結合形成を触媒する NRPS が、いかにして 5 環性骨格を構築するかは不明であった。バイオインフォマティクスから、最上流にある NRPS に機能不明のモジュールが長鎖アシル基の導入を触媒する可能性が浮上し、ジペプチド中間体アナログ 10 を使った酵素反応を検討した。最後のモジュールは一つの NRPS タンパク (SfmC) であり、ペプチド鎖の切り出しを行う還元ドメイン (R) を持っているため、この NRPS が単なるアミノ酸一個を付加するだけでなく、多段階の反応を触媒するものと予想した。

本来ペプチド鎖の伸長は、ホスホパンテテニル (PP) 鎖を介して NRPS に結合した形で進行するが、PP 鎖の末端構造を模した部分構造を持つジペプチド中間体アナログ 10 と有機合成的に調製したアミノ酸 11 を基質として、ATP, NADPH 存在下大量発現した SfmC による酵素反応を行ったところ、サフラマイシン型骨格を有する生成物 12 が得られた (Scheme 4)¹⁴⁾。この際、ジペプチドの還元体 13、およびジペプチドとアミノ酸が縮合した後、C-C 結合形成および末端チオエステルが還元された予想中間体 14 を得たことから、反応機構は Scheme 4 のように推定した¹⁴⁾。



Scheme 4 SfmCによるサブライシン骨格合成の触媒機構

今回明らかになった NRPS の触媒機構は、C ドメインが本来の縮合ではなく、イミン形成と C-C 結合形成を触媒し、通常は 1 回しか使われないモジュールが 2 回使用されるほか、R ドメインが 3 回の還元反応を触媒するという特殊な例であった。たった一つの酵素が、多段階の反応を触媒する例は他にもあるが、単純な基質から一挙に複雑な骨格を組み上げるサブライシン NRPS の例は非常に興味深い。現在、他のテトラヒドロイソキノリン骨格を有する抗生物質の生合成遺伝子クラスターの解析を進めており、モジュールやドメインの入換え等遺伝子工学的手法や Chemoenzymatic な手法によるエクチナサイジン 743 の合成中間体やその誘導体の合成を検討中である。

5. おわりに

最近、今回紹介した天然物の生合成研究を通して、研究手法の進展は研究分野を一変させることを肌で感じる事ができた。次世代シーケンサーの出現によるゲノム解析の低価格化、制限酵素フリーのクローニング、合成遺伝子のオーダー化など研究支援技術の革新により、生合成研究で使う遺伝子工学的手法はさらに簡便なテクニックとなり、私が学生時代に夢想した”酵素で天然物を合成する”は、今や現実的なアプローチとなりつつある。私が長年抱いてきたもう一つの興味である”天然物の構造多様性は、どのようにして生み出されるか”という課題は、”生合成酵素は、遺伝子変異により生じた構造

の異なる中間体を受容し変換するというしなやかなしかも進化可能な触媒の集合体”と捉えれば説明できる。これについても現在進行している新学術領域研究”生合成マシナリー”の実施期間中に、実験的な証拠を得たいと考えている。

参考文献

- 1) Toyota, M.; Ihara, M. *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 5641-5679.
- 2) Toyomasu, T.; Nakaminami, K.; Toshima, H.; Mie, T.; Watanabe, K.; Ito, H.; Matsui, H.; Mitsuhashi, W.; Sassa, T.; Oikawa, H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68*, 146-152.
- 3) Oikawa, H.; Toyomasu, T.; Toshima, H.; Ohashi, S.; Kawaide, H.; Kamiya, H.; Ohtsuka, M.; Shinoda, S.; Mitsuhashi, W.; Sassa, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5154-5155.
- 4) Fujii, R.; Minami, A.; Tsukagoshi, T.; Sato, N.; Sahara, T.; Ohgiya, S.; Gomi, K.; Oikawa, H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* in press.
- 5) Kasahara, K.; Miyamoto, T.; Fujimoto, T.; Oguri, H.; Tokiwano, T.; Oikawa, H.; Ebizuka, Y.; Fujii, I. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1245-1252.
- 6) Fischbach, M. A.; Walsh, C. T. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3468-96.
- 7) Watanabe, K.; Hotta, K.; Praseuth, A. P.; Koketsu, K.; Migita, A.; Boddy, C. N.; Wang, C. C.; Oguri, H.; Oikawa, H. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 423-428.
- 8) (a) Koketsu, K.; Oguri, H.; Watanabe, K.; Oikawa, H. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4719-4722; (b) Hirose, Y.; Watanabe, K.; Minami, A.; Nakamura, T.; Oguri, H.; Oikawa, H. *J. Antibiot.*, **2011**, *64*, 117-122.
- 9) Watanabe, K.; Hotta, K.; Nakaya, M.; Praseuth, A. P.; Searcey, M.; Wang, C. C.; Inada, D.; Takahashi, K.; Fukushi, E.; Oguri, H.; Oikawa, H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 9347-9353.
- 10) Watanabe, K.; Hotta, K.; Praseuth, A. P.; Wang, C. C.; Oguri, H.; Oikawa, H. *ChemBioChem*, **2009**, *10*, 1965-1968.
- 11) Koketsu, K.; Oguri, H.; Watanabe, K.; Oikawa, H. *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 818-828.
- 12) Cuevas, C.; Francesch, A. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 322-337.
- 13) Li, L.; Deng, W.; Song, J.; Ding, W.; Zhao, Q.-F.; Peng, C.; Song, W.-W.; Tang, G.-L.; Lei, W. *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 251-263.
- 14) Koketsu, H.; Watanabe, K.; Suda, H.; Oguri, H.; Oikawa, H. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 408-410.