

酵素を使った天然物合成の新展開

北海道大学大学院理学研究院

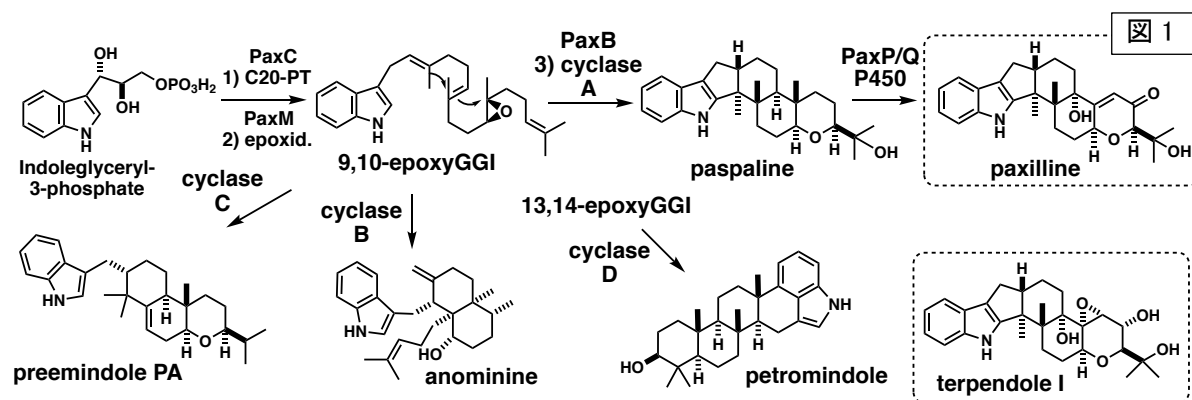
及川 英秋

1. はじめに

天然物と称する小分子は、生産生物を利用する生物活性と共に分子進化した化合物と考えられる。これゆえ、その複雑な構造と共に有機分子の中で特異な存在である。10年前、新学術領域「生合成マシナリー」が開始した際、本セミナーで膨大な生合成遺伝子クラスター (BGC) と呼ばれる設計図が見つかるので微生物由来の天然物を酵素合成すると宣言させて頂いた。現在、天然物の酵素合成に関しては、種々のメディアで特集号が出る程、認知されてきた。また設計図となる遺伝子には、生産生物と設計図を構成する遺伝子群の情報が紐づけられており、進化や水平伝搬などの情報が付随し、間接的に生物活性とも関係がある。本講演では、特定の天然物群の BGC を使った網羅的合成、ゲノム上に眠る天然物生産能を利用した新規物質を生産、全く新しい天然物群を合成する試みと共に分子進化についても触れてみたい。

2. インドールジテルペンの網羅的酵素合成

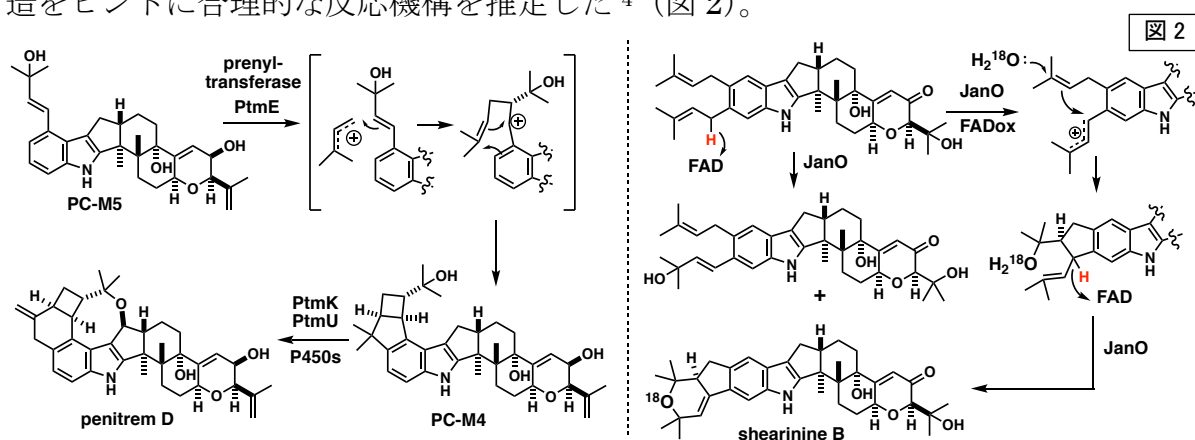
天然物はマクロライドやポリエーテルといった類似の構造モチーフを持つファミリーとして見つかる。その初期生合成経路は機能相同な酵素によって、共通骨格を有する中間体を經由して合成される。つまり中間体から段階的に分岐して多様な分子が合成されるため、鍵中間体を調達できれば、少ない労力で個々の天然物が網羅的に合成できるはずである。酵素の異種発現法を整備しながら、効率よく生産する方法を開発してきた¹。BGC という設計図を用いて経路解明と酵素合成を達成した例として、我々が行ってきたインドールジテルペン (IDT) の研究について紹介する。



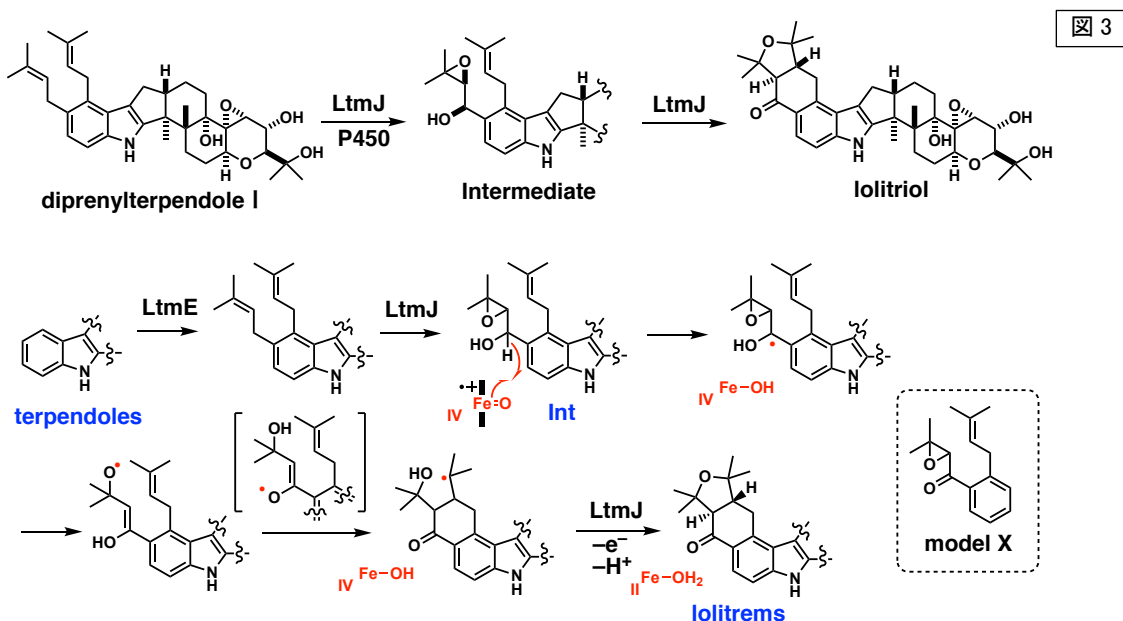
まず IDT の構造多様性の源となる基本反応を知るため paxilline の酵素合成を行った² (図 1)。インドール環の由来を調べつつ、最初の 3 段階の反応が、1) C20-プレニル化; 2) エポキシ化; 3) 環化と進行し、paspaline に変換される (反応 2, 3 は二回繰り返す) ことを突き止めた。これら基本反応 [1] 鎖長 (C15/C20)、2) 酸化位置 (9,10- or 13,14-)、3) 異なる環化モード (>5 種)] で、多様な IDT が生成可能となる。次いで P450 による特徴的修飾反応 (減炭 +1 or 2 回の 3 級炭素の水酸化) で paxilline のような複数の鍵中間体が得られる (図 1)^{2b}。

修飾が進んだ IDT としては 3 種類あり、それらの構造から当初これらは全て共通

の機構 (C5-プレニル化単位が 2 回/酸化環化) で環形成されると予想された。しかし実際には酵素ならではのトリッキーな変換で生合成されていた。最初の Penitrem の場合は、まず酸化酵素以外の遺伝子 (*ptmHDVI*) の導入株を使って paxilline から PC-M5 への 4 段階の変換を突き止めた (図 2)。残る 6 種の酸化酵素遺伝子 (*ptmKUNLJO*) 導入株に PC-M4 を添加した微生物変換で 5 種の酵素機能を同定した³。これら実験で残った二つの酵素を *in vitro* で前駆体に作用させ、一旦転位を伴ったアリルアルコールへの PtmO による酸化により PC-M5 へ変換したのち、最終的に PtmE による C5-プレニル化が起こると同時に環化することを確認した³ (図 2)。janthitrem/shearinine の生合成では、プレニル化酵素 JanD がジプレニル化した後、FAD 依存酸化酵素 JanO が環化することは突き止めたが、その詳細は不明であった。そこで重酸素水 ($H_2^{18}O$) 中で反応を行いエーテル環酸素の由来を決めた後、本来とは少し構造が異なる基質を用いた際、shearinine B と共に生じた副生物の構造をヒントに合理的な反応機構を推定した⁴ (図 2)。



最後の lolitrem の場合は LtmE でジプレニル化が起こった後、P450 である LtmJ で lolitriol に変換された。この時注意深い観察により少量のエポキシアルコールが蓄積することを見出し、多段階反応を触媒する LtmJ がそれを經由して最終産物 lolitriol へ変換することを確認した⁵。エポキシアルコールがラジカル経路で環化する経路の妥当性を計算化学的に検証した後、最終的にはモデル化合物 **X** に Bu_3SnH を作用させ、ラジカル経路での環化体の生成を実証した⁵。

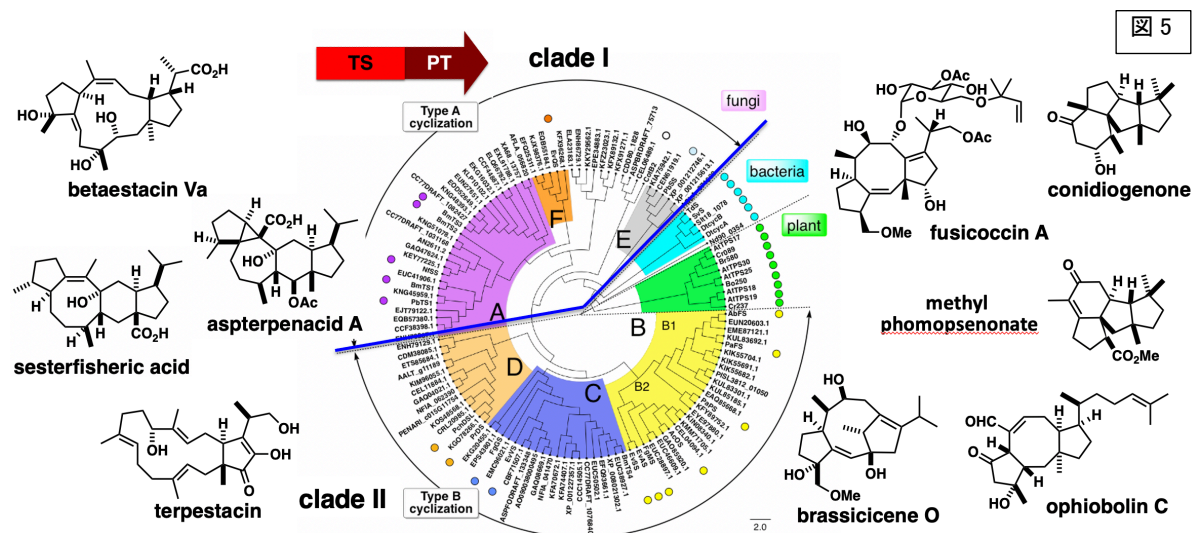
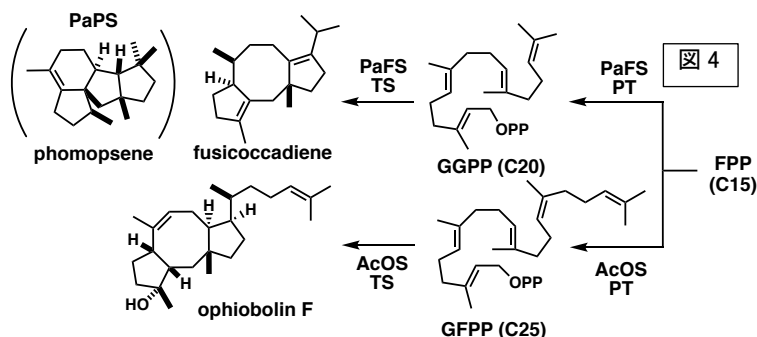


以上のように鍵中間体である paxilline, paspalinine や terpendole I (図 1) を用いることで反応機構を明らかにしつつ短工程で効率よく酵素合成が可能なることを立証した。今回示した複雑な IDT の生合成経路でほとんどの IDT の変換反応が予想でき、同じ戦略で天然物ファミリーの網羅的全合成が可能であることを示した^{2a}。

進化という面から天然物ファミリーを考察してみると、IDT の BGC は多数の生物種から発見されることがわかる。つまりこれは BGC ごとの水平伝搬が比較的高い頻度で起こっていると予想できる。従って高い生物活性を示す天然物は、さらなる分子進化により多くの子孫を残し、天然物ファミリー形成に貢献しているとも考えられる。実際に優れた活性を有する天然物の BGC が多くのゲノムに集積していることは、最近我々が行ったポリケタイド系天然物のケミカルスペースを扱った論文でも議論している⁶。

3. セスタテルペンのゲノムマイニング

天然物の設計図を使った酵素合成に関するもう一つのアプローチは、機能未知 BGC を異種発現して新規物質を生産 (ゲノムマイニング) することである。最近行ったのは、山形大の佐々らが長年の研究の末に発見した、原料供給 (PT: C20 直鎖中間体) とその環化 (TS) の二つのドメインを有する糸状菌由来二機能性ジテルペン環化酵素 (BFTS: bifunctional terpene synthase)⁷ を用いた研究である。当初興味深い骨格が得られることを期待して、公開データベース上に見つかった BFTS 遺伝子 *AcOS* を発現したところ、C20 ではなく C25 テルペン ophiobolin F を発見した (図 4)⁸。これは世界初の C25 テルペン環化酵素の発見であり、新規物質の発見を予感した。公開データから取得した 120 種 BFTS の系統樹解析から、未知のクレード IA に狙いを定め、一つの BFTS *NfSS* を発現して、新規 4 環性 C25 テルペン sestafisherol の単離に成功した (図 5)^{9,10}。同位体標識前駆体の取り込み実験から環化機構を調べると、2 種の経路が提唱できた^{10,11} (図 6)。一般に疎水性の高い活性部位で進行



するテルペンの環化は、気相反応として扱った分子軌道計算で環化機構をうまく説明できる¹²。NfSSに関する2種の環化機構も、全ての段階は大きなエネルギー障壁を持たず非酵素的にも進行可能なものであった¹¹。これと符合するように二種の経路中のカルボカチオン中間体から派生する2-4環性の生成物を与える酵素もクレードIAに見つかり、計算による予想が正しいことを立証できた^{9,13} (図5, 6)。

この研究を通して環化酵素 (TS) の進化がどのように起こるのかを考察してみた。BFTSによって合成されるC20/C25テルペンと構造類似の天然物は、植物や細菌からも見つかるが(図7)、最近、それらを触媒する酵素が見つかり、異なる生物由来のTSは配列相同性が低かった⁹。則ち糸状菌/細菌/植物由来の全く異なる酵素から環化モードが類似したTSに収斂進化したと考えられる。単なる確率論からすれば、環化反応はその機構から、二重結合の数が増えればより多様な生成物を与えるはずである。つまり環化モードが類似する必然性は全くない。さらに報告されたテルペンの中で、最も種類が多いのはC15であり、C20, C25の順となるのも合点がいかない。

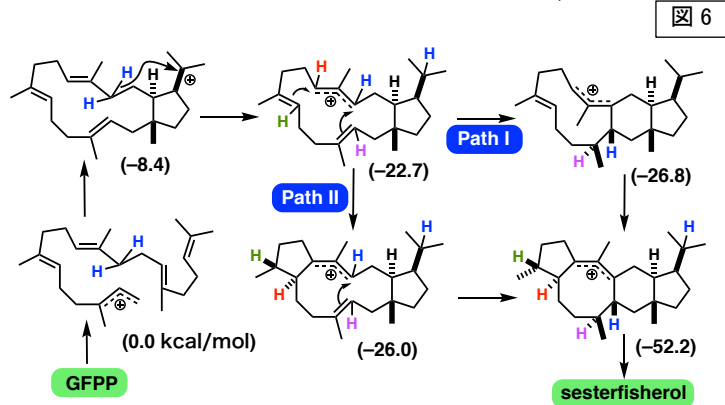


図6

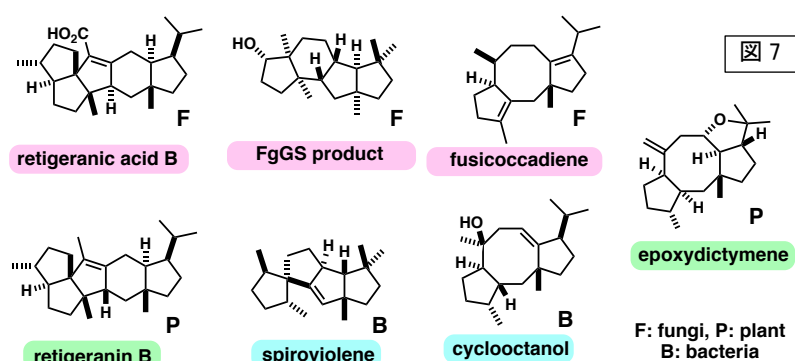
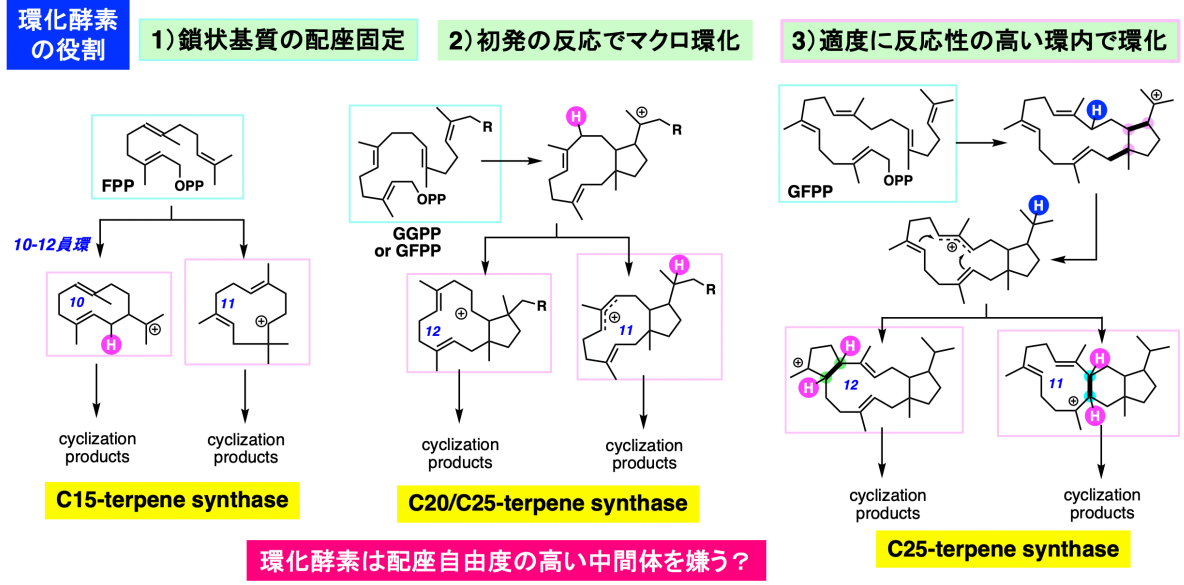


図7

図8



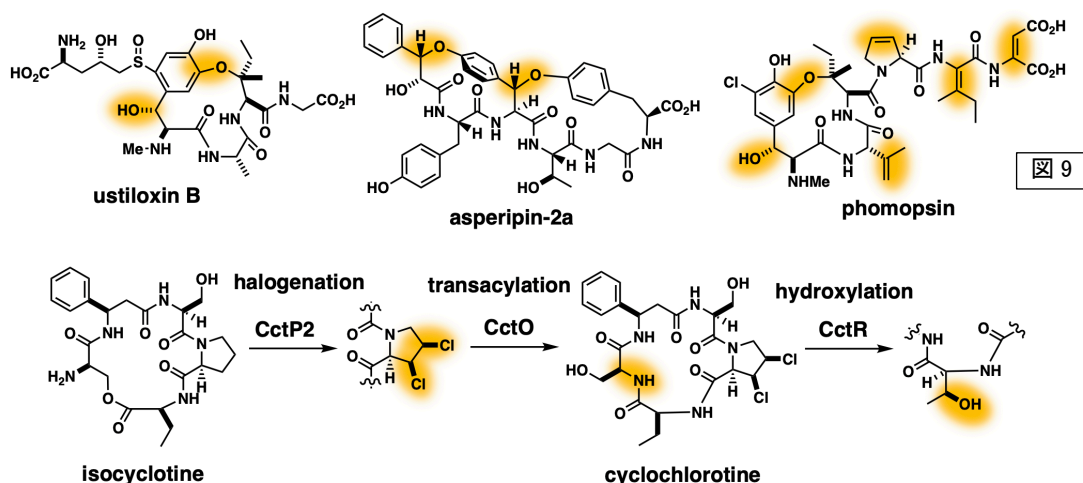
この疑問に答えるのに”生物は生存に有利となる天然物を利用している”という仮説が大きなヒントとなる。この要求に酵素が応えるためには、効率の良い環化体の

創出が重要で、その性能が高い方が淘汰されるため、これに叶った触媒を我々は目にしているのであろう。以前より TS は、鎖状基質の特定配座を固定し、カルボカチオンを発生させると殆ど何もせずとも生成物を生じる酵素と言われてきた¹⁴。想像を逞しくすれば、C15-TS の場合、配座の自由度が高すぎる中間体を嫌い、まず適度な反応性を持つマクロ環を形成することで迅速に生成物を与えると考えられる (図 8)。図に示した酵素の役割を満たすように今回見出した C20/C25-TS が、C15-TS と同じ戦略で進化しているとしたら、何故限られた環化モードしか使わず、多様性は限定的なのかが、ある程度理解できる。

4. 糸状菌で発見された新規ペプチド生合成経路

既に数多くの天然物生合成経路が解析され、新たな経路の発見は極めて稀とされていたが、8 年前に従来のような遺伝子相同性に依拠しない方法論で、糸状菌特有の新規ペプチド生合成経路が見つかった。特にその骨格構築には糸状菌にしか存在しない新規酸化酵素が関与していた。最近この酸化酵素遺伝子が他の経路の BGC でも発見されることから、その普遍性が注目されつつある。問題の環状ペプチド生合成経路は、普通のタンパク質と同様、リボソームで合成された繰返し配列を持つタンパク質が前駆体となり生合成される。我々は共同研究により、チロシンなど芳香族アミノ酸と脂肪族アミノ酸の間で酸化的エーテル環形成が起こり、骨格構築することを *ustiloxin B*^{15a} と *asperipin-2a*^{15b} の 2 つの系で実験的に証明した (図 9)。新規酸化酵素は、新たなモチーフ (DUF3328: HxxHC を 2 組) を持つ膜酵素であり、機能解析は簡単ではない。候補前駆体ペプチドを化学合成して、酵素活性の検出を試みたがこれまでのところ成功していない。

そこで微生物では一般的なリボソームに依存しないペプチド合成系 (NRPS) 由来のマイコトキシン *cyclochlorotine* を取り上げた。その設計図には DUF3328 酵素が含まれているものの、その機能は不明であった。生産菌の遺伝子破壊および酵素合成により、酸化酵素 CctP2/O/R が生合成後期の 3 段階反応を触媒することを見出した¹⁶。これら酸化酵素は、小さなタンパク質 (30–40 kDa) ながら不活性な sp³ 炭素の塩素化、水酸化、脱水素化、酸化的エーテル環化など多様な触媒活性を持つ P450 に匹敵する多機能性酵素であり、興味を持たれる。DUF3328 酵素 CctP2/O/R は特有のオルガネラ中で作用することも分かり、糸状菌の発現系が何故効率よく進行するのかを突き止めるモデル系となる可能性もある。今回 3 種の基質が特定されたことから、酵素機能の解明に期待がかかる。



5. おわりに

1980年代半ばに最初の BGC が見つかったから、天然物生合成研究は、飛躍的に進展した。2000年代初めまで天然物の酵素合成など非現実視されていた時代に育った我々の世代にとって、夢のような時代に変貌している。テルペン環化酵素で紹介したように、一見複雑な反応を触媒する酵素の動作原理は単純である。生物が選択した装置の種類は限定的で、進化可能であり、反応機構は精緻な計算化学の支援で予想できる。まだ膨大な数の設計図は手付かずで残っており、タンパク質の設計、改変はさらなる進化を遂げようとしている。こうした中、独自の視点で切り込めば、酵素の機能改変と共に新たな生物活性を持った天然物の取得も夢ではない。

参考文献

1. (a) Minami, A.; Liu, C.; Oikawa, H. *Heterocycles* **2016**, *92*, 397. (b) Liu, C. W.; Minami, A.; Ozaki, T.; Wu, J.; Kawagishi, H.; Maruyama, J.; Oikawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 15519.
2. (a) Tanifuji, R.; Minami, A.; Oguri, H.; Oikawa, H. *Nat. Prod. Rep.* **2020**, *37*, 1098. (b) Tagami, K.; Liu, C. W.; Minami, A.; Noike, M.; Isaka, T.; Fueki, S.; Shichijo, Y.; Toshima, H.; Gomi, K.; Dairi, T.; Oikawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1260.
3. Liu, C. W.; Tagami, K.; Minami, A.; Matsumoto, T.; Frisvad, J. C.; Suzuki, H.; Ishikawa, J.; Gomi, K.; Oikawa, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 5748.
4. Liu, C.; Minami, A.; Dairi, T.; Gomi, K.; Scott, B.; Oikawa, H. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 5026.
5. Jiang, Y. L.; Ozaki, T.; Harada, M.; Miyasaka, T.; Sato, H.; Miyamoto, K.; Kanazawa, J.; Liu, C. W.; Maruyama, J.; Adachi, M.; Nakazaki, A.; Nishikawa, T.; Uchiyama, M.; Minami, A.; Oikawa, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 17996.
6. Minami, A.; Ugai, T.; Ozaki, T.; Oikawa, H. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 13556.
7. Toyomasu, T.; Tsukahara, M.; Kaneko, A.; Niida, R.; Mitsuhashi, W.; Dairi, T.; Kato, N.; Sassa, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 3084.
8. Chiba, R.; Minami, A.; Gomi, K.; Oikawa, H. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 594.
9. Minami, A.; Ozaki, T.; Liu, C. Oikawa, H. *Nat. Prod. Rep.* **2018**, *35*, 1330.
10. Ye, Y.; Minami, A.; Mandi, A.; Liu, C. W.; Taniguchi, T.; Kuzuyama, T.; Monde, K.; Gomi, K.; Oikawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 11846.
11. Sato, H.; Narita, K.; Minami, A.; Yamazaki, M.; Wang, C.; Suemune, H.; Nagano, S.; Tomita, T.; Oikawa, H.; Uchiyama, M. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 2473.
12. D. J. Tantillo, *Nat. Prod. Rep.*, **2011**, *28*, 1035.
13. Narita, K.; Sato, H.; Minami, A.; Kudo, K.; Gao, L.; Liu, C.; Ozaki, T.; Kodama, M.; Lei, X.; Taniguchi, T.; Monde, K.; Yamazaki, M.; Uchiyama, M.; Oikawa, H. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 6696.
14. Christianson, D. W. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3412.
15. (a) Ye, Y.; Minami, A.; Igarashi, Y.; Izumikawa, M.; Umemura, M.; Nagano, N.; Machida, M.; Kawahara, T.; Shin-Ya, K.; Gomi, K.; Oikawa, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 8072. (b) Ye, Y.; Ozaki, T.; Umemura, M.; Liu, C. W.; Minami, A.; Oikawa, H. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 39.
16. Jiang, Y. L.; Ozaki, T.; Liu, C. W.; Igarashi, Y.; Ye, Y.; Tang, S.; Ye, T.; Maruyama, J.; Minami, A.; Oikawa, H. *Org. Lett.*, accepted.