

## 17. 酸化的合成反応を触媒する酵素の機能解析

渡辺 賢二

静岡県立大学 薬学部 生薬・天然物化学分野

Key words : 天然物, 生合成, 酸化反応, 抗生物質, 創薬

### 緒言

#### 1. 抗腫瘍性生物活性物質 spirotryprostatin 類

Spirotryprostatins A (1), B (2) は静岡県大井沖海底土壌より分離された糸状菌 *Aspergillus fumigatus* BM939 株より単離された化合物である<sup>1)</sup>。本化合物は哺乳動物細胞株に対し G2/M 期にて細胞周期の停止を促すことから、新たな抗がん剤のリード化合物となり得る。ところが、培養液約 400 L からわずかに数 mg ほどしか得られない微量成分であることが障害となり、作用機序解析や臨床応用への道が閉ざされている。本化合物は 5 つの環が縮環した特異な化学構造を持つ。なかでも、オキシインドール環とジケトピペラジン環がスピロ炭素を介して連なる点は非常に興味深い。ところが、そのスピロ環構造が生成する機構については一切不明であった。我々は、その化学構造に含まれる特異なスピロ環構造の構築機構の解明を目指すとともに、spirotryprostatin 類生合成遺伝子を用いて異種宿主生物による生物全合成を行うことを目指した。

### 方法

#### 1. 出芽酵母を宿主とした遺伝子強制発現システム

Spirotryprostatin 類はその化学構造から tryprostatin 類から生合成されると考えられた。これらの化合物群の生合成経路については、既に長田らの先行研究によってその全容が明らかにされている<sup>2)</sup>。Spirotryprostatin 類生物全合成に向け、まずはその推定前駆体を生合成するために必要な全ての遺伝子について、出芽酵母の遺伝子強制発現システムを利用して生物合成を行うこととした。*A. fumigatus* より調製したゲノム DNA または cDNA をもとに、非リボソーム依存性ペプチド合成酵素 (nonribosomal peptide synthetase, NRPS) (FtmA)、プレニル基転移酵素 (FtmB)、シトクロム P450 酸化酵素 (FtmE) および出芽酵母由来 NADPH-シトクロム P450 還元酵素 (Ncp1) の各遺伝子をガラクトース誘導にて発現可能な自立複製型プラスミドへと導入した。一方で、出芽酵母のゲノムを改変することで効率的に二次代謝産物を産生させることを目指した。*Aspergillus nidulans* 由来ホスホバンテテニル基転移酵素 NpgA およびマロニル-CoA 合成酵素 MatB などの遺伝子を特定の遺伝子座に導入した出芽酵母株 SCKW5 を構築した。本株について先述したプラスミドを導入し、プラスミドコピー数を上昇させた後、ガラクトース存在下で培養を行い、LC-MS にて代謝産物を解析した。その結果、spirotryprostatin 類の予想生合成中間体である brevianamide F (3, 49.3 mg/L)、tryprostatin B (4, 35.6 mg/L) および demethoxyfumitremorgin C (5, 3.4 mg/L) の産生を再現性よく確認することができた (図 1)。

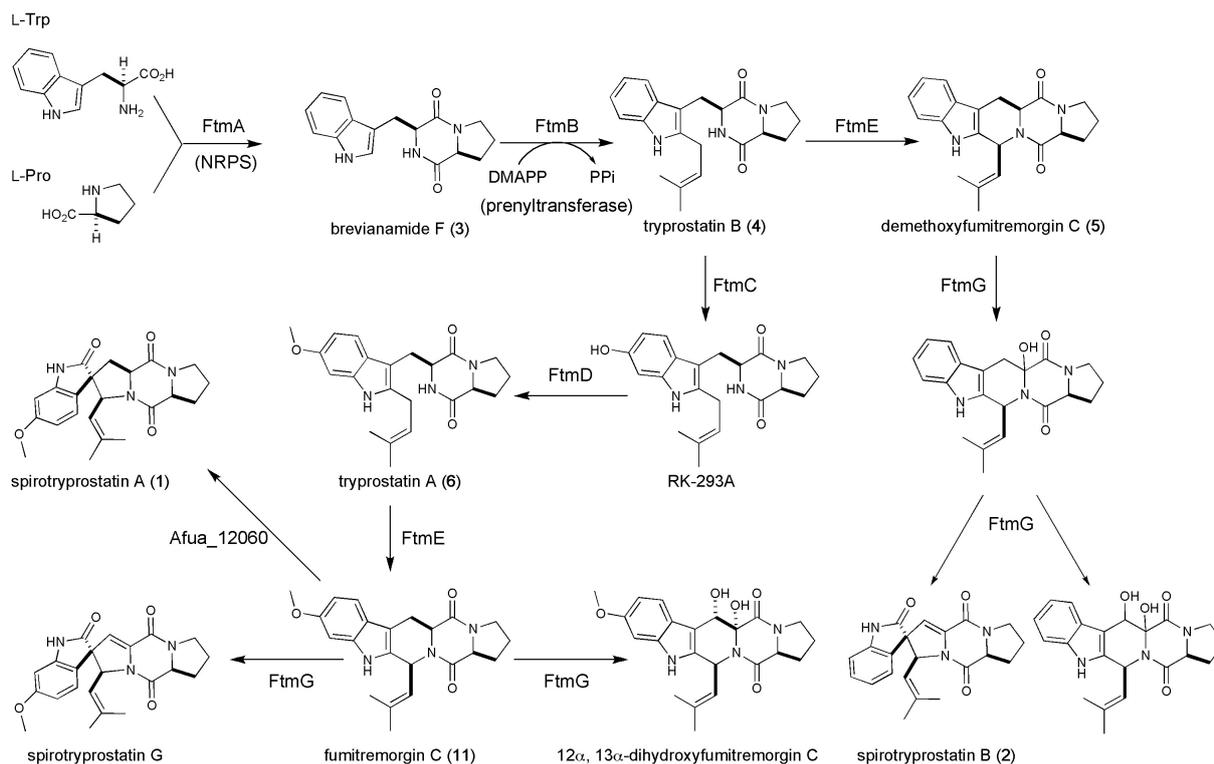


図1. Spirotryprostatin 類の推定生合成経路  
生合成中間体および酸化酵素を含む生合成酵素を記載。

それぞれの化合物は単離精製を行い、NMR 等によりその化学構造を確認した。従来出芽酵母は二次代謝産物を生合成しないことから、これら生産物の精製は非常に簡便である。加えて、天然物の単離精製にて時折問題となる極微量な高生物活性成分のコンタミネーションも起こらないため、工業化への応用も期待できる。

## 結果

### 1. スピロ環化酵素遺伝子 *Afua\_12060* の同定

続いて我々は、spirotryprostatin 類が生合成される上で鍵となる、スピロ環構築の反応機構を解明することを目指した。Spirotryprostatin 類全合成の研究過程において、インドール環の NBS による酸化と、続く自発的なセミピナコール型転位反応の進行により、オキシインドール環の形成が報告されている<sup>3)</sup>。さらに最近、notoamide E を基質とし notoamide C への変換反応を触媒する酵素 NotB の推定反応機構が示された<sup>4)</sup>。これは FAD 依存型酸化酵素である NotB が一旦エポキシインドール中間体を与えた後、スピロ炭素を形成するものであった (図2)。

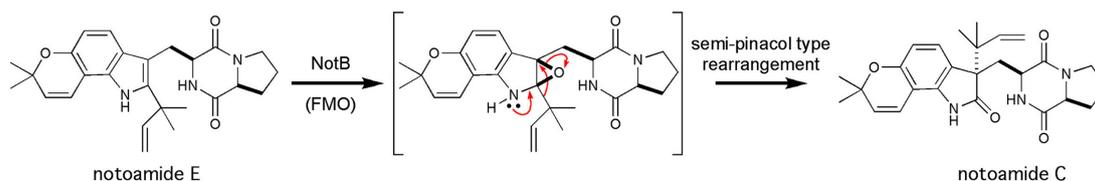


図2. Notoamide C の推定生合成機構

Notoamide E を基質とし NotB が一旦エポキシインドール中間体を与えた後、スピロ炭素を形成し notoamide C を与える。

我々は、これらの情報をもとにスピロ炭素の生合成に関与する遺伝子をバイオインフォマティクス解析により推定した。その結果、*A. fumigatus* 第6染色体上においてアミノ酸配列上 NotB と72%の相同性を示す *Afua\_12060* 遺伝子を見出した。続いて大腸菌発現系によって *Afua\_12060* を大量発現させ精製酵素を得た。得られた酵素を用い、各種推定基質に対する試験管内反応を検討した。その結果、用いた基質のうち、**3**や**5**は本酵素による変換を受けないのに対し、**4**および tryprostatin A (**6**) については速やかな基質の消失が確認された。ここで各種反応条件の検討を行ったものの、本酵素は基質に対して触媒回転することなく働き、完全な基質の消失のためには等量の酵素が必要であることが示唆された。その生成産物についてNMRによる構造解析を行い、**4**からはジオール体 (**7**) が、**6**からは2種類のジオール体 (**8, 9**) とセミピナコール型転位が進行した **10** が生成していることを確認した (図3)。

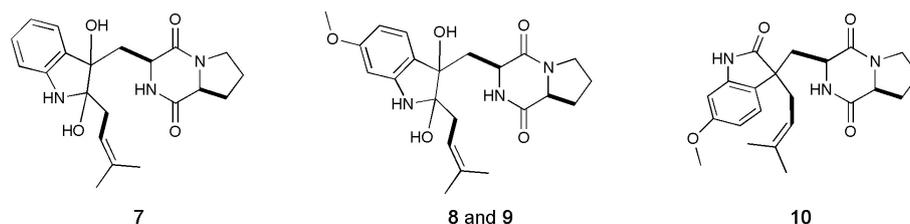


図3. 酸化酵素 *Afua\_12060* による生成物

ジオール体 (**7**) が、**6**からは2種類のジオール体 (**8, 9**) とセミピナコール型転位が進行した **10** が生成していることを確認。

これらの結果から、tryprostatin 類は *Afua\_12060* によってインドール環の2,3位がエポキシ化され、続く加水分解あるいはセミピナコール型の転位反応が生じていることが示唆された。一方で、*Afua\_12060* に対し fumitremorgin C (**11**) を基質として酵素反応を行うとわずかながら反応が進行し、新たな微量生成物が得られた。本生成物は高分解能MSならびに標品とのLC-MSにおける保持時間から **1** と決定した。以上の結果から、*Afua\_12060* は基質として **4, 6, 11** を受け入れ、いずれの場合においてもインドール環上のエポキシ化を担うことが明らかになり、本酵素による spirotryprostatin 類のスピロ炭素の構築を示す事ができた。

## 2. Spirotryprostatin 類生物合成に向けて

以上の結果を踏まえ、spirotryprostatin 類について、出芽酵母を宿主とし生物合成させることに取り組んだ。まず、**6** を生合成させるために必要な酵素である、P450 酸化酵素 (FtmC) とメチル基転移酵素 (FtmD) を出芽酵母に導入したところ、desmethyltryprostatin A (**12**) と **6** の生産を確認したが、その生産量は微量であった。続いて、本系に *Afua\_12060* 遺伝子を追加した。その結果、LC-MS にてわずかに **1** の生産は認められるものの、現在までに本化合物を単離し、NMR にて構造を確認するまでには至っていない。ところで、本酵素遺伝子は *A. fumigatus* において fumiquinazoline 類を生合成する遺伝子クラスター上に存在し、fumiquinazoline F のインドール環のエポキシ化を触媒することが報告されている<sup>5)</sup>。一方、tryprostatin 類の生合成遺伝子クラスターは *A. fumigatus* の別の染色体上に存在している。すなわち、本酵素は spirotryprostatin 類の生合成のための酵素と言うよりは、その広い基質許容性のために **4, 6, 11** が生体内にて変換され、spirotryprostatin 類を生み出したと推測される。天然から得られる量が極微量であるという結果と、試験管内反応における反応効率が極端に悪いという実験事実は、この推測の妥当性を支持していると考えられる。

## 考 察

以上、今回我々は spirotryprostatin 類の生合成前駆体である tryprostatin 類を出芽酵母発現系によって生物合成することを可能とした。さらに、化学構造上特徴的なスピロ炭素の生合成機構の解明に関する重要な知見を得ることができた。現在までのところ、*Afua\_12060* 酵素の反応活性の低さから、spirotryprostatin 類の量的供給が可能になったとは言えない。しかしながら、ここで得られた知見をもとに、今後は酵素の立体構造をもとにした遺伝子改変や各代謝経路の強化などにより、微量成分の生物全合成という困難な課題に挑戦するつもりである。このように生合成遺伝子、代

謝経路を自在に操ることで天然物を獲得する試みは、バイオインフォマティクスに裏付けされている点で論理的であり、これまで経験とセレンディピティに頼りがちであった伝統的な天然物獲得法に加わる、新たな天然物創出法となることが期待される。

### 共同研究者

本研究を遂行するにあたり、貴重な試料である spirotryprostatin A、tryprostatin A を快くご供与頂きました東京大学薬学研究科の福山透教授、下川淳助教（現: 名古屋大学創薬科学研究科助教）に深謝致します。

### 文 献

- 1) Cui C-B, Kakeya H, Osada H. Novel mammalian cell cycle inhibitors, spirotryprostatins A and B, produced by *Aspergillus fumigatus*, which inhibit mammalian cell cycle at G2/M phased. *Tetrahedron* 1996, 52, 12651-12666.
- 2) 鈴木宏和, 加藤直樹, 高木海, 浦本昌和, 白井健郎, 高橋俊二, 杉本芳, 長田裕之. 真菌毒 verruculogen の全合成経路の解明. 第 50 回天然有機化合物討論会, 2008, 137-142.
- 3) Edmondson SD, Danishefsky SJ. The total synthesis of spirotryprostatin A. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, 37, 1138-1140.
- 4) Li S, Finefield JM, Sunderhaus JD, McAfoos TJ, Williams RM, Sherman DH. Biochemical characterization of NotB as an FAD-dependent oxidase in the biosynthesis of notoamide indole alkaloids. *Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 788-791. doi: 10.1021/ja2093212
- 5) Ames BD, Liu X, Walsh CT. Enzymatic processing of fumiquinazoline F: a tandem oxidative-acylation strategy for the generation of multicyclic scaffolds in fungal indole alkaloid biosynthesis. *Biochemistry* 2010, 49, 8564-8576. doi: 10.1021/bi1012029