

## 論文の要約

報告番号	甲 第 1007 号	氏名	宮澤 岳
学位論文題目	放線菌二次代謝産物reveromycin Aの生合成研究		
論文の要約			
<p><b>背景</b></p> <p>放線菌 <i>Streptomyces reveromyceticus</i> の生産するポリケチド化合物 reveromycin A (RM-A) は破骨細胞選択的に細胞死を誘導することから、骨関連疾患治療薬としての開発が期待されている。RM-A 生合成機構の理解は生産性の向上や、より安定で活性の高い新規類縁体創製に繋がる可能性がある。これまでの研究で、7 つの malonyl-CoA、5 つの methylmalonyl-CoA、1 つの butylmalonyl-CoA を伸長単位として用い、ポリケチド鎖を形成後、RevG、RevJ により立体特異的にスピロアセタール環が形成される事を明らかにしている。一方、RM-A のスピロアセタール環の C18 位には butylmalonyl-CoA 由来の脂肪酸 acyl 側鎖並びに、ヘミサクシニル基が存在しているが、その生合成機構は明らかになっていない。そこで、本研究では RM-A 生合成の分子基盤解明を目指し、butylmalonyl-CoA 生合成及び C18 位の修飾反応の反応機構の解析を行った。</p> <p><b>結果</b></p> <p><b>2-alkylmalonyl-CoA生合成機構の解析</b></p> <p>(1) RM骨格形成に関わる2-alkylmalonyl-CoA生合成</p> <p>RM生産菌はRM-Aの他にC18位のアルキル側鎖の異なる類縁体RM-C、D、Eを生産し、これらの多様性は2-alkylmalonyl-CoA (butylmalonyl-CoA、isobutylmalonyl-CoA、pentylmalonyl-CoA、hexylmalonyl-CoA) をポリケチド伸長基質として取り込む事に起因する。ポリケチド化合物は主にmalonyl-CoAとmethylmalonyl-CoAを伸長単位として用いることから、2-alkylmalonyl-CoAの生合成機構の解明はポリケチド化合物の構造多様化に繋がる可能性がある。</p> <p>RM生合成遺伝子クラスターから2-alkylmalonyl-CoA生産に関与すると予想される3遺伝子 (<i>revR</i>, <i>revS</i>, <i>revT</i>) に着目し、各遺伝子破壊株の解析を行った。その結果、<i>revR</i> 遺伝子破壊株では全てのRM類縁体のうちRM-Aの生産量のみが選択的に減少し、<i>revS</i> 遺伝子破壊株では全てのRM類縁体の生産量が減少した。また、<i>revT</i> 遺伝子破壊株ではRM類を全く生産しなかった。以上より、<i>revR</i>, <i>S</i>, <i>T</i> 遺伝子はRM類縁体の生合成に関与することが示唆された。</p> <p>次に、生化学的に各酵素の機能解析を行った。RevSはadenylate forming enzymeと相同性を示したことから、遊離の脂肪酸を活性化して2-alkylmalonyl-CoAの前駆体供給に関与すると予想した。脂肪酸の活性化には二通りの経路が知られている。Fatty acyl-AMP ligase (FAAL) は脂</p>			

脂肪酸をacyl-ACPに活性化し、ポリケチドやペプチド等の二次代謝産物のスターター基質を供給する。一方、fatty acyl-CoA ligase (FACL) は脂肪酸をacyl-CoA体へと活性化し、リン脂質合成やエネルギー産生等に寄与する。RevSがFAALとFACLのどちらの活性を有しているか検討する為、大腸菌を用いてRevSを異種発現・精製し種々の脂肪酸と反応させた。その結果、RevSはFAAL活性を有せず、中鎖脂肪酸特異的FACL活性を有している事が明らかとなった。また系統解析の結果、非典型伸長単位を取り込むRevSホモログはFAALのクレード内で分岐したグループを形成しており、FAALからFACLに分岐した新しいFACLである事が強く示唆された。

次に、RevTはcrotonyl-CoA carboxylase/reductase (CCR) と相同性を示すことから、(E)-2-enoyl-CoAから2-alkylmalonyl-CoAへの変換を担うと予想した。放線菌を用いてRevTを異種発現・精製し、合成した(E)-2-hexenoyl-CoAと(E)-2-octenoyl-CoAを基質として酵素反応を検討したところ、それぞれbutylmalonyl-CoA及びhexylmalonyl-CoAへの変換を確認することができた。一方、RevSにより活性化された脂肪酸の炭素鎖長はC8からC10であるのに対し、RevTの基質となる(E)-2-enoyl-CoAの炭素鎖長はC6からC8であることから、活性化された脂肪酸acyl-CoAは、β酸化を経てRevTの基質となる(E)-2-enoyl-CoAまで切り縮められると予想した。そこで、[1,2,3,4-<sup>13</sup>C]octanoic acidを添加して培養を行ったところ、実際にRM-Aのアルキル側鎖へ取り込まれることを確認することが出来た。さらに、RevS、RevTのカップリング反応を検証するために、ATP、NADPH、NaHCO<sub>3</sub>の存在下で各精製酵素と(E)-2-hexenoic acidを混合して反応を行ったところ、butylmalonyl-CoAへの変換に成功した。以上の結果から、RevSが遊離脂肪酸を活性化した後、脂肪酸の分解経路を経て、RevTにより2-alkylmalonyl-CoAが生合成される経路の存在が示唆された。

一方、RevRは脂肪酸生合成酵素FabHと相同性を有しているため、大腸菌を用いてRevRを異種発現・精製し、FabH反応の解析を行ったが、活性を検出することが出来なかった。revR遺伝子破壊株の解析から、butylmalonyl-CoA生合成への関与が示唆されたため、butyryl-CoA特異的な反応を調べたところ、acyl-CoA:ACP transacylase活性を見出した。よって、RevRがbutyryl-CoAを利用しbutyryl-ACPを効率よく脂肪酸生合成系に送り込むことによって、butylmalonyl-CoA生合成を増強する経路の存在が示唆された。以上の結果から、RevS及びRevRは、それぞれ脂肪酸の分解系と生合成系を利用して(E)-2-enoyl-CoAを供給し、RevTが2-alkylmalonyl-CoAを生合成する機構が示唆された。

## (2) RM生合成遺伝子破壊株を用いた新規2-alkylmalonyl-CoA生合成機構の解明

非典型伸長単位のポリケチド化合物生合成には、CCR が必須であることが知られている。しかしながら、stambomycin 生合成遺伝子クラスターにはCCRが存在しないため、新規生合成機構の存在が示唆された。遺伝子機能アノテーションの結果、propionyl-CoA carboxylase と相同性を示す samR0483 遺伝子の関与を予想することが出来たが、遺伝子破壊及び生化学的解析が困難なため解析が進んでいなかった。そこで、samR0483 遺伝子をRM非生産のrevT遺伝子破壊株に導入することによりin vivoでの機能解析を試みた。構築した形質転換株に蓄積する代謝産物を解析したところ、RM-Eを生産することが判明したため、SamR0483はhexylmalonyl-CoAを選択的に合成するcarboxylaseであることが示唆された。さらに2-alkylmalonyl-CoAがこの形質転換体でSamR0483により生合成されている事を明らかにする為、重水素標識した[3,3-D<sub>2</sub>]heptanoic acidの添加実験を計画した。2-alkylmalonyl-CoAがcarboxylase/reductaseにより生合成されるならば、RevSにより[3,3-D<sub>2</sub>]heptanoic acidがCoA体へと活性化された後、acyl-CoA dehydrogenaseにより重水素が1つ欠落した2-enoyl-CoAへと変換される。その後、reductase/carboxylaseによりpentylmalonyl-CoAとなりRM-Dに取り込まれ、最終産物のMSが1 Daの上昇がすること

が予想される。一方、2-alkylmalonyl-CoA が carboxylase により生合成される経路が存在するのであれば、RevS により [3,3-D<sub>2</sub>]heptanoic acid が CoA 体へと活性化された後、carboxylase により直接 pentylmalonyl-CoA が生成される。その後、RM-D に取り込まれ、最終産物の分子量が 2 Da 上昇することが予想される。[3,3-D<sub>2</sub>]heptanoic acid を培養液に添加し、代謝産物を LC/MS で解析した結果、*samR0483* 非導入株では RM-D の 1 Da の上昇が確認されたのに対し、*samR0483* 導入株では 2 Da の上昇が確認された。以上の結果から、構築した形質転換体では *SamR0483* により 2-alkylmalonyl-CoA が生合成される事が明らかとなり、CCR に依存しない新規 2-alkylmalonyl-CoA 生合成経路の存在を証明することができた。

#### C18位の修飾反応の反応機構の解析

Spirofungin A (SF-A)は、RMと類似しているが2つの構造上の違いが存在する。RM類のC18位のアルキル側鎖に多様性があるのに対し、SF-Aではメチル基である。また、RM類はC18位にサクシニル基が存在しているのに対し、SF-Aでは修飾されていない。各生合成遺伝子クラスターを比較した所、RM生合成遺伝子クラスターには、2-alkylmalonyl-CoAの生合成を担う*revR*、*revS*、*revT* 遺伝子に加え、*revI*、*revK*、*revL*、*revM* 遺伝子が存在しており、これらがC18位のサクシニル基の形成に関与していると予測した。これ等の中で、*revI* は P450と相同性を示したことから、RevIがC18位を水酸化した後、サクシニル基が形成されると予想した。そこで本研究ではRevIの機能に着目し、生化学的に解析を行った。これまでの研究で*revI* 遺伝子破壊株が構築されており、サクシニル基がない中間体RM-Tの蓄積が確認されている。そこで、大腸菌を用いてRevIの組み換え酵素を異種発現・精製し、RM-Tを基質、NADPHを補酵素として酵素反応を行ったところ、RM-TのC18位が水酸化したRM-T1の生成を確認することができた。このことから、RevIはRMのサクシニル基形成に必須な、C18位の水酸化を担う酵素であることが明らかになった。