

コンビナトリアル合成

尾仲 宏康

富山県立大学工学部微生物工学講座

はじめに

微生物は様々な化合物を生合成することが知られているが、コンビナトリアル合成とは遺伝子工学的手法を用いて、微生物の生合成経路を改変し、新しい化合物を微生物に生産させる技術である。特に原核生物においてもっとも多様な二次代謝産物を作ることが知られている放線菌においては、1980年頃から「ハイブリッド抗生物質」という概念とともにコンビナトリアル合成技術が進展した。本講義では放線菌の抗生物質生産におけるコンビナトリアル合成技術について概説する。

1、ハイブリッド抗生物質

微生物の二次代謝生合成系を用いて新しい抗生物質を作るという技術は遺伝子工学技術が発達する以前から存在していた。歴史的には1974年にアミノグリコシドの neomycin 生産菌の deoxystreptamine 生合成閉鎖株に streptamine 誘導体を添加培養して得た hybrimycin (図1) が最初である¹⁾。この様な方法を行うためには生合成閉鎖株を取得せねばならず、遺伝子操作技術が未発達時代にはなかなか大変な作業であったことから、あまり発展はしなかった。その後、1983年に大村らのグループが生合成閉鎖株を取得するかわりに酵素阻害剤を用いて生合成阻害をおこした状

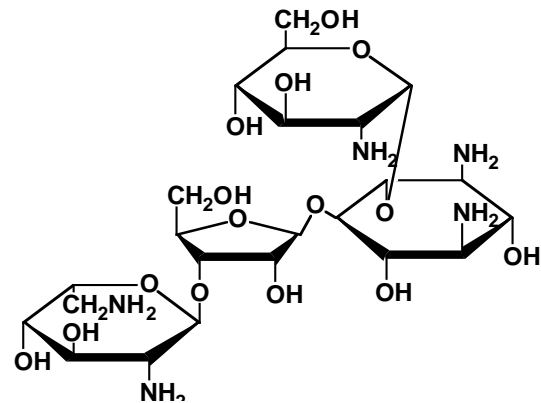


図1 Hybrimycin C1

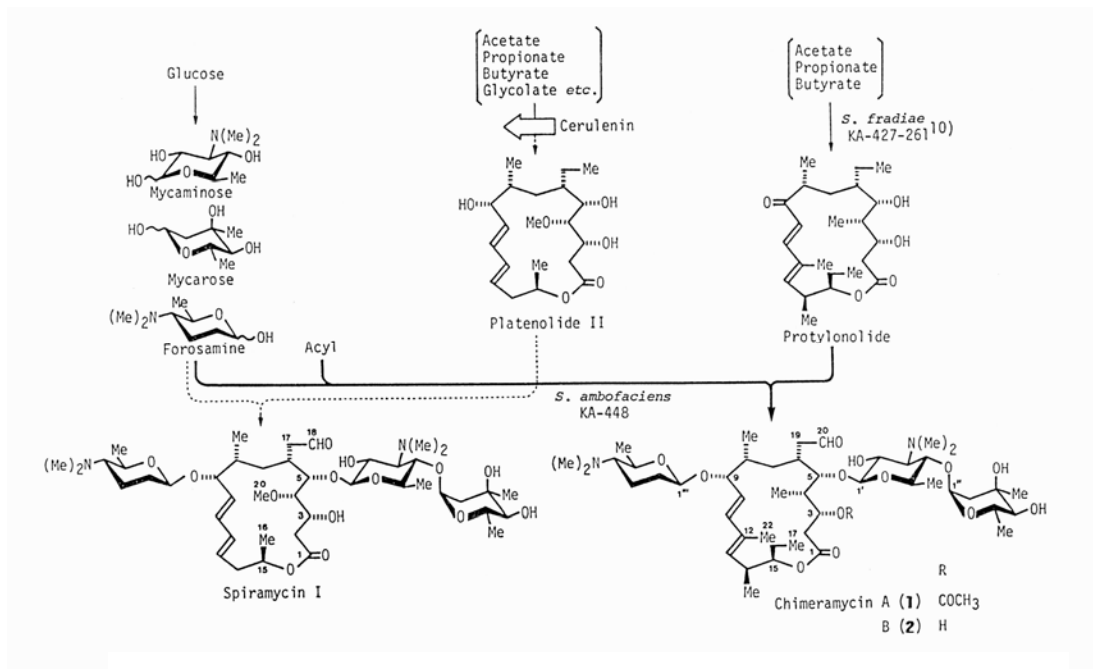


図2 キメラマイシンの生合成経路を利用した合成方法 (文献10)

態にして、ハイブリッド抗生物質を作ること成功した²⁾。彼らはポリケタイド生合成酵素の阻害剤であるセルレニン培地中に添加し、ポリケタイド化合物を生産できない状態にし、そこに異なる骨格のポリケタイド化合物を添加培養することによって chimeramycin という抗生物質の生産に成功した (図2)。しかしながら、この方法についても酵素阻害剤として適当な物が存在しなければ行うことができないという問題点があった。

遺伝子組換え技術を用いてハイブリッド抗生物質を作製した最初の例は1985年に Hopwood, Omura, Floss の共同研究として報告されている³⁾。アクチノロージンとよく似た構造のメデルマイシンを生産する放線菌に、*act* 遺伝子を導入したところ、この菌で、メデルマイシンの他にアクチノロージンに特有の水酸基がついた2種類のメデルマイシン誘導体 (メデルロージン A, B) が生産された。一方、グラナチシン及びジヒドログラナチシン生産菌である *Streptomyces violaceoruber* に *act* 遺伝子を導入すると、側鎖の立体構造がアクチノロージンと同じであるジヒドログラナチシンが生産された (図3)。

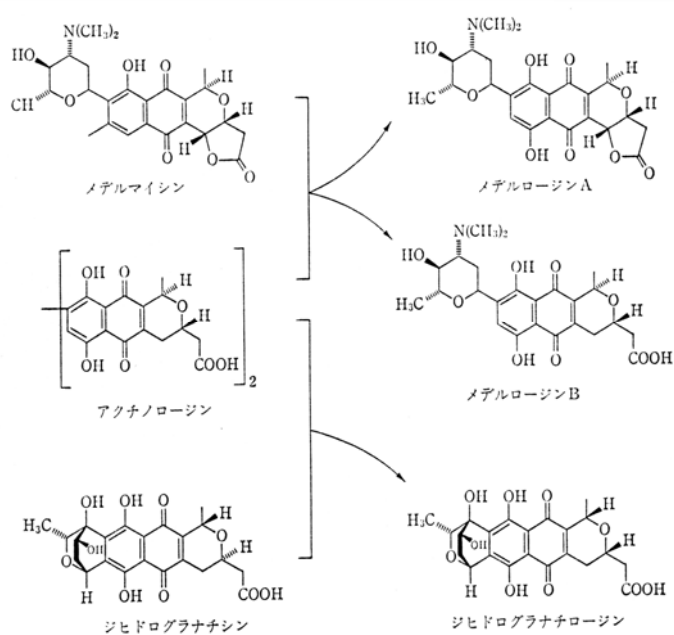


図3 *act* 遺伝子を用いたハイブリッド抗生物質の作成方法 (文献10)

2、ポリケタイド化合物のコンビナトリアル生合成

(1) 芳香族ポリケタイド化合物

1990年代に入り、DNA解析技術が進展し、長距離シーケンスも容易に行われるようになると、それに合わせて放線菌をはじめとする二次代謝生合成遺伝子の解析も進展した。放線菌の二次代謝産物のうち、もっとも多くを占めるのはポリケタイド (polyketide) と呼ばれる化合物群である。ポリケタイドはケタイド (ketide、図4) と呼ばれるアシル CoA から作られる炭素2個のユニット構造を単位として、これらが結合した状態の化合物をいう (図5)。ポリケタイド化合物は大きく分けて芳香族ポリケタイドとマクロライド化合物の二つに分けられる (図6)。マクロライド化合物のうちエリスロマイシンは最も使用頻度の高い抗生物質の一つであるし、エパーメクチンは抗寄生虫薬、タクロリムスは免疫抑制剤として実用化されている。

最初にコンビナトリアル生合成と呼ぶべき手法によって、論理的に多数のポリケタイド化合物を作製したのは Khosla らであり、1995年のことである⁴⁾。既に、芳香族ポリケタイドであるアクチノロージンの生合成遺



図4 ケタイド化合物の例

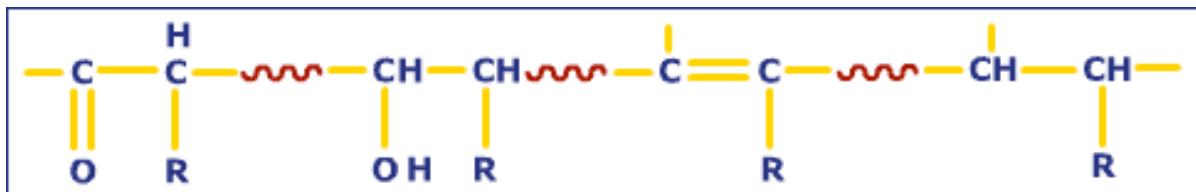


図5 ポリケタイド化合物の構造

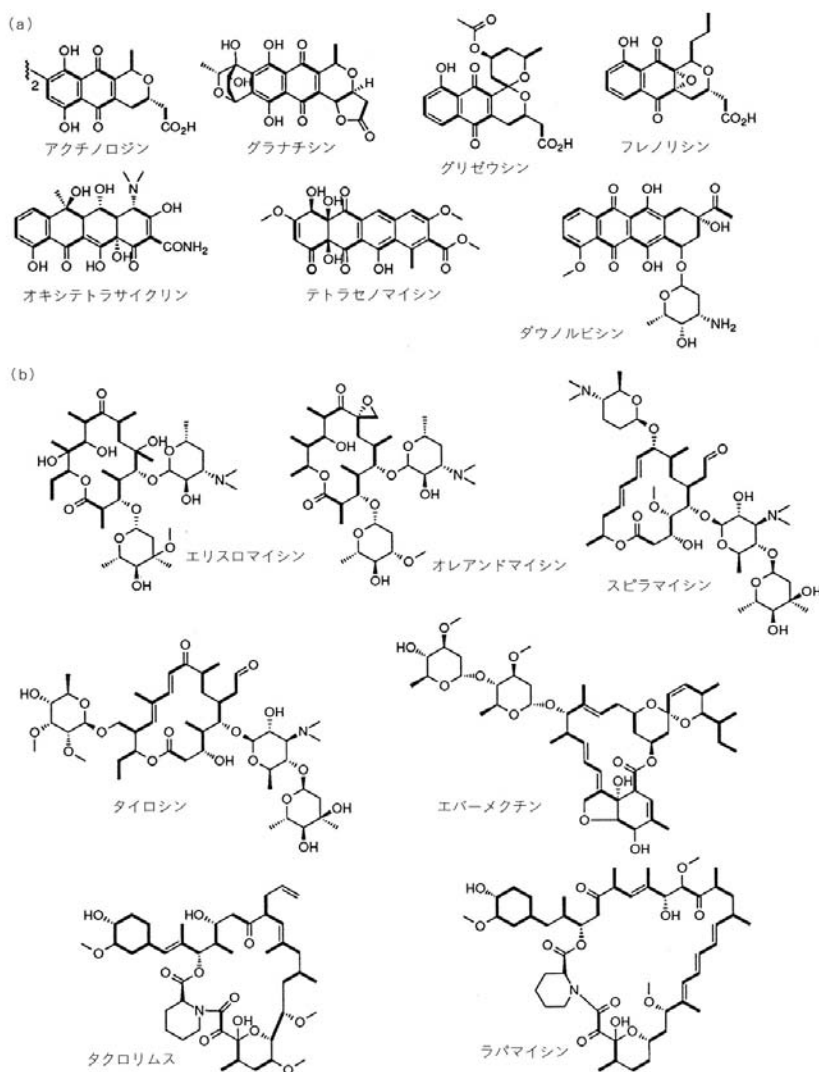


図6 芳香族ポリケタイド(a)とマクロライドポリケタイド(b) (文献10)

伝子の解析から、ポリケタイド骨格を合成するには、ketosynthase(KS), acyl carrier protein (ACP), chain length factor (CLF), acyltransferase (AT)の4種類の酵素があれば十分であることが明らかになっており、これらはセットで minimal PKS と呼ばれている。彼らはこれら minimal PKS が、芳香族ポリケタイド生合成において保存されていることに着目し、アクチノロージンをはじめ、テトラセノマイシン、フレノ

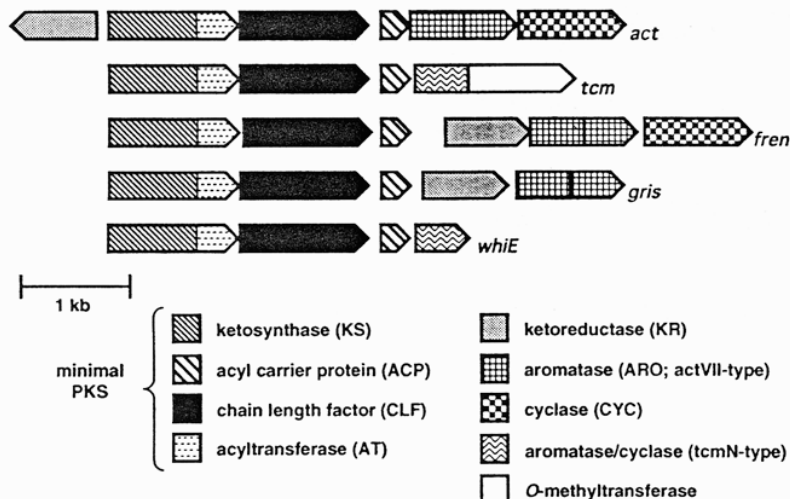


図7 芳香族ポリケタイドの生合成遺伝子クラスター (文献4)

リシン、グリセウシン、*whiE* 色素の5種類の生合成遺伝子をクローニングし(図7)、これらの遺伝子を論理的に組み合わせることにより、生産物を予想しながら生合成を行った。具体的な論理回路は図8に示したようなものである。化合物の炭素骨格の長さは minimal PKS 内の chain length factor (CLF) によって規定され、これらは前述の五種類のポリケタイド由来 minimal PKS

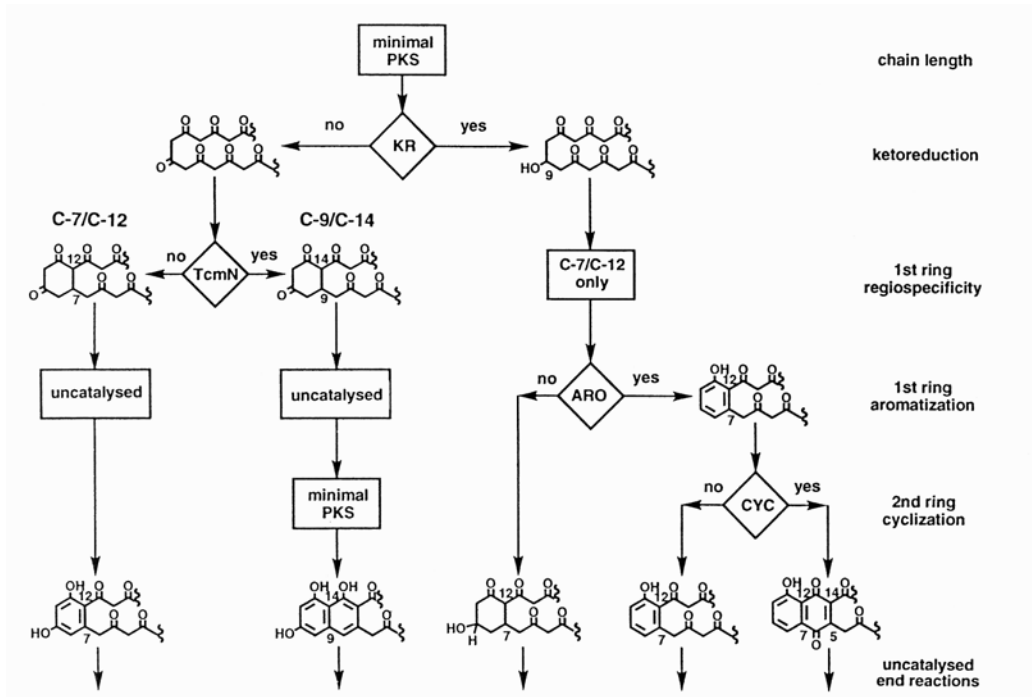


図8 芳香族ポリケタイドの論理的作製のためのアルゴリズム

のどれを使うかによって選ぶことができる。次に ketoreduction を行うかどうかをアクチノロージンの ketoreductase 遺伝子を組込むかどうかで選択する。次に一個目の環化(1st ring regioselectivity)を行うかどうかを選択する。これにはテトラセノマイシンの *tcmN* 遺伝子を組込むかどうかで選択できる。そして、aromatization も aromatase を加えることによって選択できる。ここで加えるアロマターゼは炭素骨格の長さによってアクチノロージン、フレノリシン、グリセウシン由来のどれかを使うことで行うことができる。さらに2番目の環化についてもアクチノロージンの cyclase を使うことによって導入することが可能である。

以上のような遺伝子を組み合わせてプラスミドベクターを構築し、*Streptomyces lividans* に形質転換して培養した結果、図9に示すような化合物の生産に成功した。

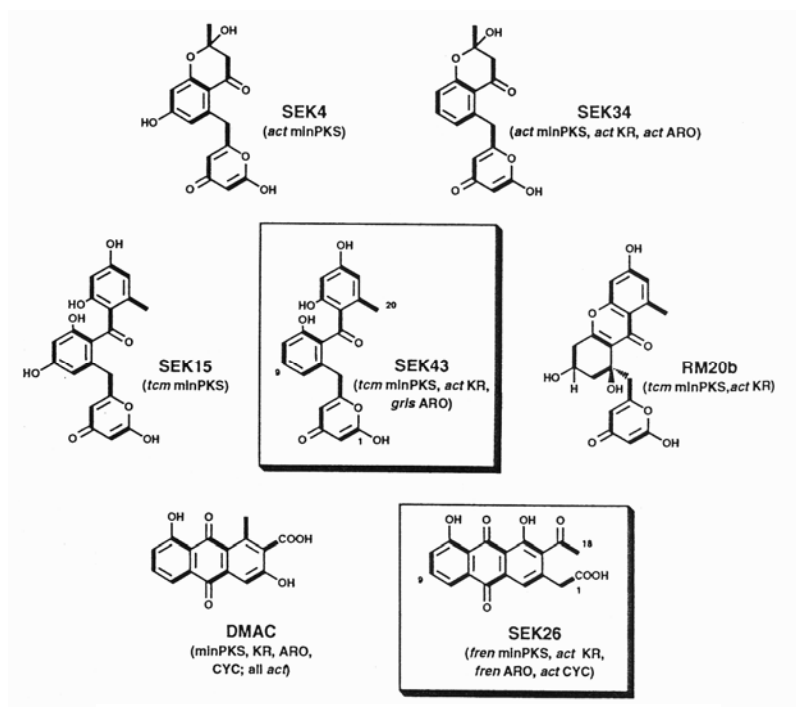


図9 遺伝子組換え技術を用いて新しく生合成された芳香族ポリケタイド (文献4)

(2) マクロライド化合物

マクロライド化合物はI型ポリケタイド合成酵素といわれる酵素群によって生合成されることが知られている。I型ポリケタイド生合成酵素は分子量が30万Daぐらいの大きな酵素であり、一つの酵素が、複数の機能を有する multi-function enzyme である。すなわち、芳香族ポリケタイド生合成における、ketosynthase(KS), acyl carrier protein (ACP), acyltransferase (AT)の役割を一つの酵素が担っている。さらに、I型酵素では、オプションとして、ketoreductase(KR), dehydratase(DH), enoylreductase(ER)の機能を有していることがある(図10)。I型ポリケタイド合成酵素の反応は図10に示したエリスロマイシン

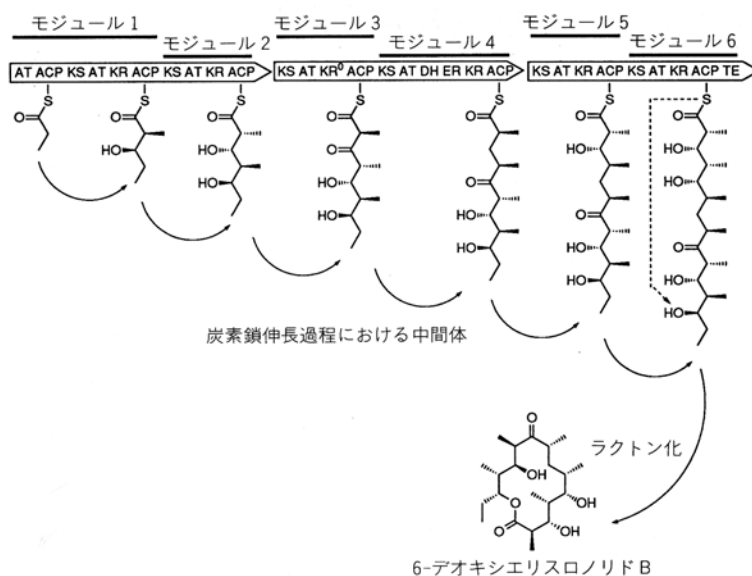


図10 エリスロマイシンのアグリコン部分の生成過程 (文献10)

ンアグリコンを例にとると、ACP、AT、KS の働きで炭素鎖が2個伸長する。そして、このままの状態だと側鎖はカルボニル基であるが、KR が存在すると水酸基に、さらにこれに続いて DH が働くと炭素骨格間が二重結合に、そして ER が働くと還元され、側鎖は deoxo の状態になる (図 1 1)。一つの module が炭素鎖を2個伸ばし、β位炭素の多様性を生み出し、この module が6個以上集まって炭素が12個以上つながった直鎖状の骨格ができあがり、最後にチオエステラーゼで切り出され、ラクトン化して環状になる。(図 1 0)。

そこで、この module の部分に該当する遺伝子を組み換えれば、炭素数の長さや、β位炭素の修飾を制御することが可能である。McDaniel らは 1999 年にこの様なストラテジーのもとにエリスロマイシンのアグリコン(骨格)の生合成に必要なポリケチド生合成遺伝子を使って、全部で50種類以上の化合物を作り出すことに成功した⁵⁾(図 1 2)。

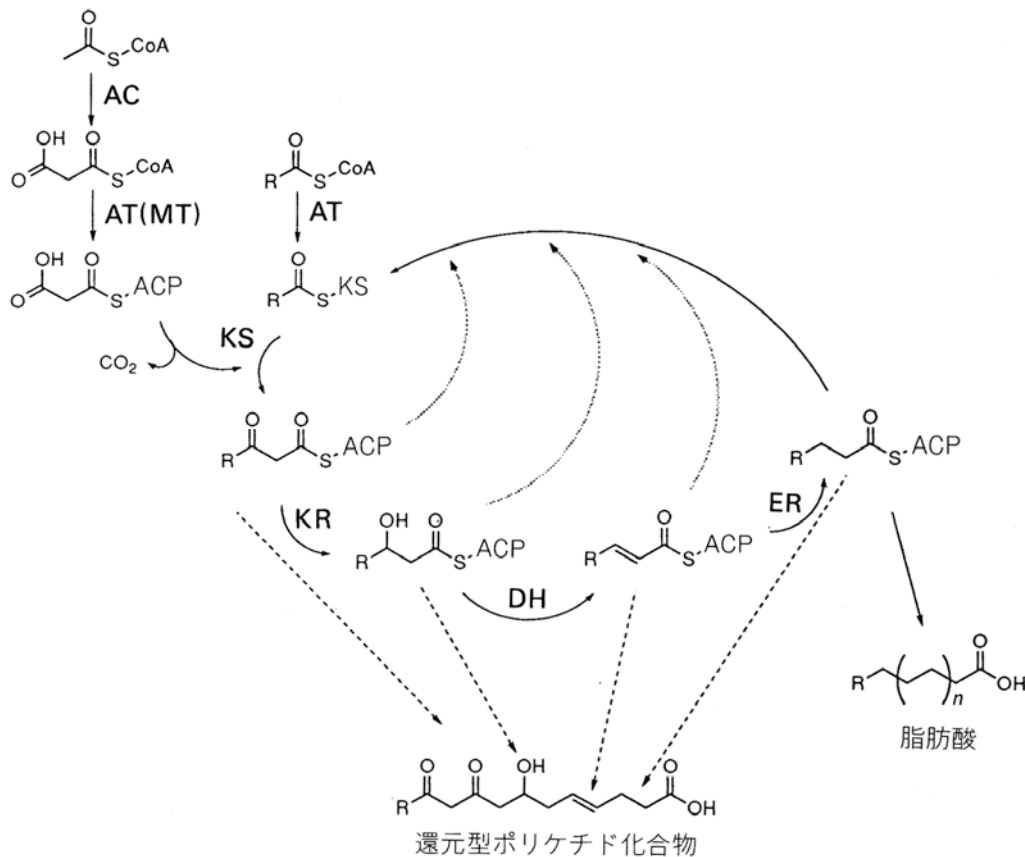


図 1 1 ポリケチド化合物の生合成機構

(文献 1 0)

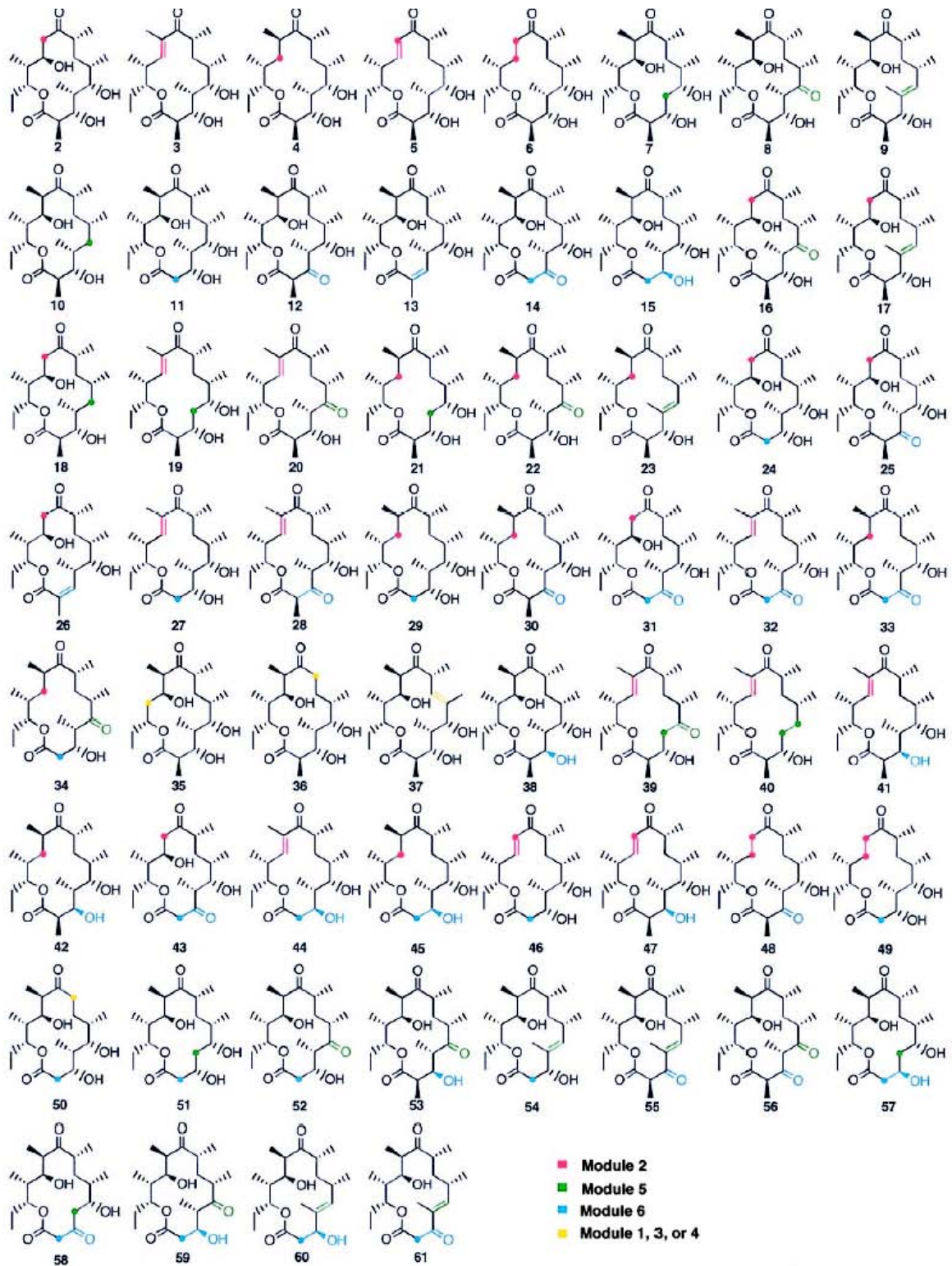


図 1 2 エリスロマイシン生合成遺伝子の組換えにより新たに作られた
 「非天然型」天然化合物 (文献 5)

3、その他の化合物のコンビナトリアル生合成—インドロカルバゾール化合物を例に—¹¹⁾

ここまでは、コンビナトリアル生合成がもっとも進んでいるポリケタイド化合物について述べたが、天然有機化合物には他にも様々な骨格を持つ物がある。もちろん、それらについてもコンビナトリアル生合成的なアプローチで多数の誘導体を作る試みがなされている。ここでは、著者らが行っているインドロカルバゾール化合物についての生合成工学について述べる。

スタウロスポリンをはじめとするインドロカルバゾール化合物（図13）には、多くの場合プロテインキナーゼ阻害活性をはじめとした生理活性が観察される。このため、従来から抗がん剤のリード化合物として期待され、多数の誘導体が有機合成されスクリーニングに供されてきた。しかしながら、生合成経路が長く不明であったため、その誘導体作製は有機合成に頼るしかなく、合成技術上の制約を受けることもしばしばであった。

ポリケタイド化合物においては何らかの生理活性が見られるものは稀であり、ほとんどの物は何も生理活性を持たない物質である。すなわち、せっきやくコンビナトリアル生合成で多数の新規ポリケタイド化合物を作製しても医薬品として期待できる物質である可能性は低い。これに対し、これまでに発見されているインドロカルバゾール化合物は全て何らかの生理活性を有するという医薬品としての潜在能力の高い化合物群である。そこで、筆者らはこの化合物に対してコンビナトリアル生合成技術を適用し、新しい誘導体を作製しようと考えた。

そこで、最初に筆者らはインドロカルバゾール化合物の生合成遺伝子クローニングを行った。当初、この骨格については全く生合成遺伝子が取得されていなかったため、クローニングは困難であると予想された。

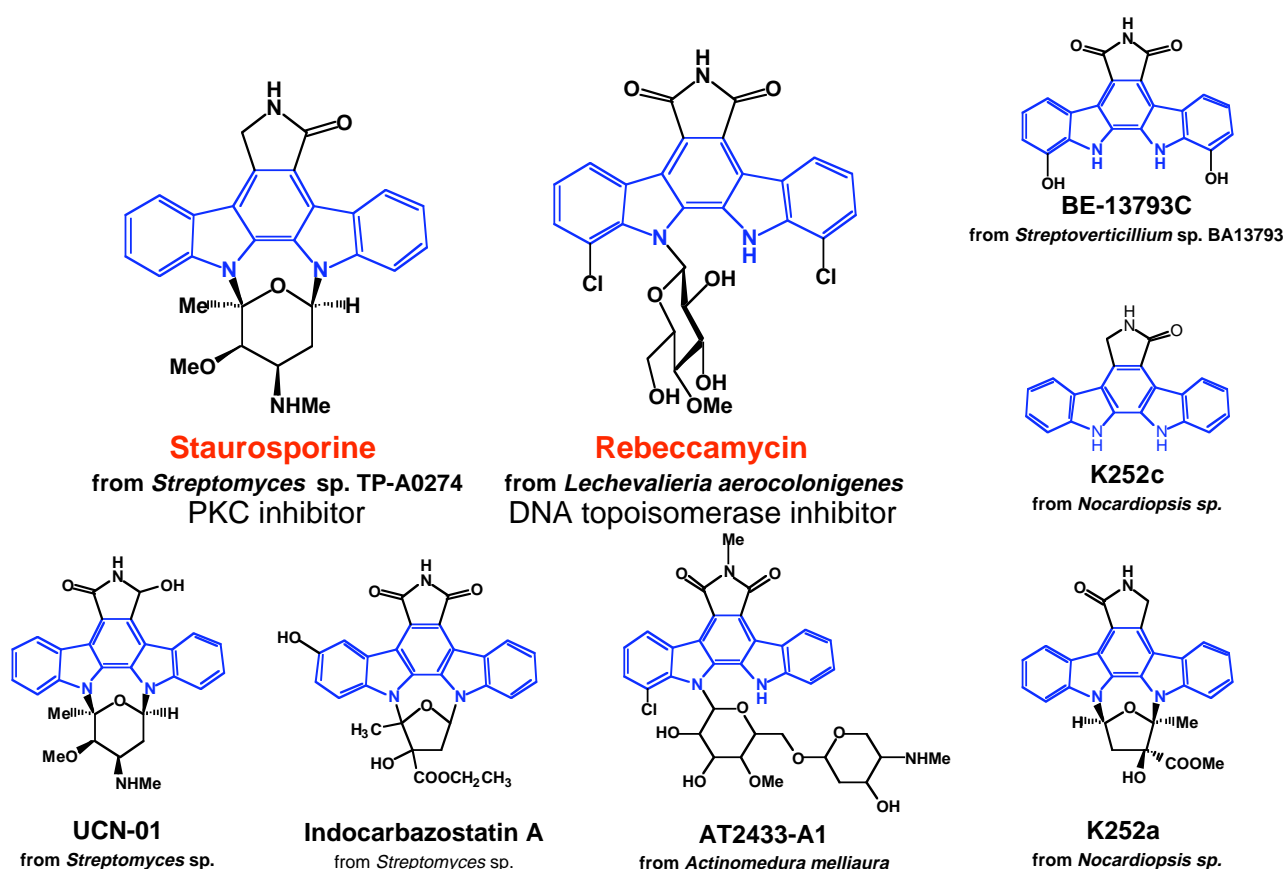


図13 インドロカルバゾール天然化合物

(1) レベッカマイシン、スタウロスポリン生合成遺伝子のクローニング

しかしながら 2000 年に萬有製薬の大内らのグループがレベッカマイシン生産菌、*Lechevalieria aerocolonigenes* ATCC39243 より N-glycosyltransferase (*ngt*) 遺伝子のクローニングに成功した。大内らは他の放線菌で見つかったインドロカルバゾール骨格分子に糖を結合させる研究の過程で、糖転移活性を *L. aerocolonigenes* 菌体に確認したために、本菌の染色体ライブラリーを作成し *Streptomyces lividans* を宿主にしてショットガンクローニングを行い、*ngt* 遺伝子断片を取得した⁶⁾。我々は、この *ngt* はレベッカマイシン生合成遺伝子クラスター内に存在していると予想し、*ngt* 周辺領域を染色体コスミドライブラリーよりクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、図 1 4 に示すように *ngt* (後に *rebG* と改称) 周辺にはレベッカマイシン生合成に関与すると思われる 9 個の遺伝子が 17 kb にわたって存在しており、これらを *reb* 遺伝子クラスターと命名した。更にスタウロスポリン生産菌、*Streptomyces* sp. TP-A0274 より *rebD* 遺伝子をプローブとしてスタウロスポリン生合成遺伝子群をクローニングし、20 kb にわたって 14 個の遺伝子からなることも明らかにした。*rebD* 遺伝子は *Chromobacterium violaceum* のビオラセイン生合成に関与する *vioB* 遺伝子と全長にわたって 36.6 % の相同性のある遺伝子であり、反応機構における類似性が予想された。*vioB* はトリプトファン 2 分子をカップリング反応する反応を触媒すると予想されていることから、*rebD* もトリプトファン誘導体 2 分子をカップリングする反応を担っていると推定でき、インドロカルバゾール骨格形成における Key Enzyme であると考えられる。

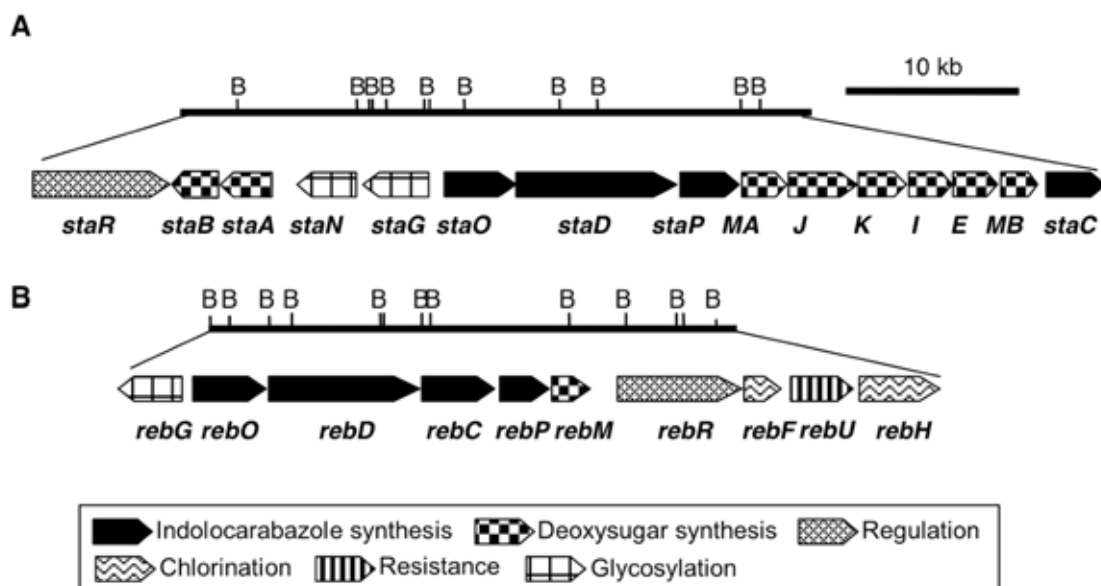


図 1 4 スタウロスポリンとレベッカマイシン生合成遺伝子クラスター

(2) レベッカマイシン生合成経路の遺伝子破壊株を用いた解析⁷⁾

レベッカマイシン生合成遺伝子のクローニングは、インドロカルバゾールにおける初めての生合成遺伝子クローニングであったため、我々の他に 3 グループの競争になった。残念ながら塩基配列の発表においては論文投稿で先を越された⁸⁾。しかしながら、この論文は遺伝子情報に基づいて、各遺伝子の機能を推定しており、どのような中間体を介してインドロカルバゾール骨格が形成されるかについては述べられていなかった。我々は、これまで報告のなかった *Lechevalieria* 属の形質転換系を新たに開発し、遺伝子破壊株を作製、解析することによって、生合成中間体の同定を行った。クローニングされた *reb* 遺伝子クラスターのうち、*rebG* (N-glycosyltransferase), *rebD*, *rebC* (monooxygenase), *rebP* (cytochrome P450), *rebM*

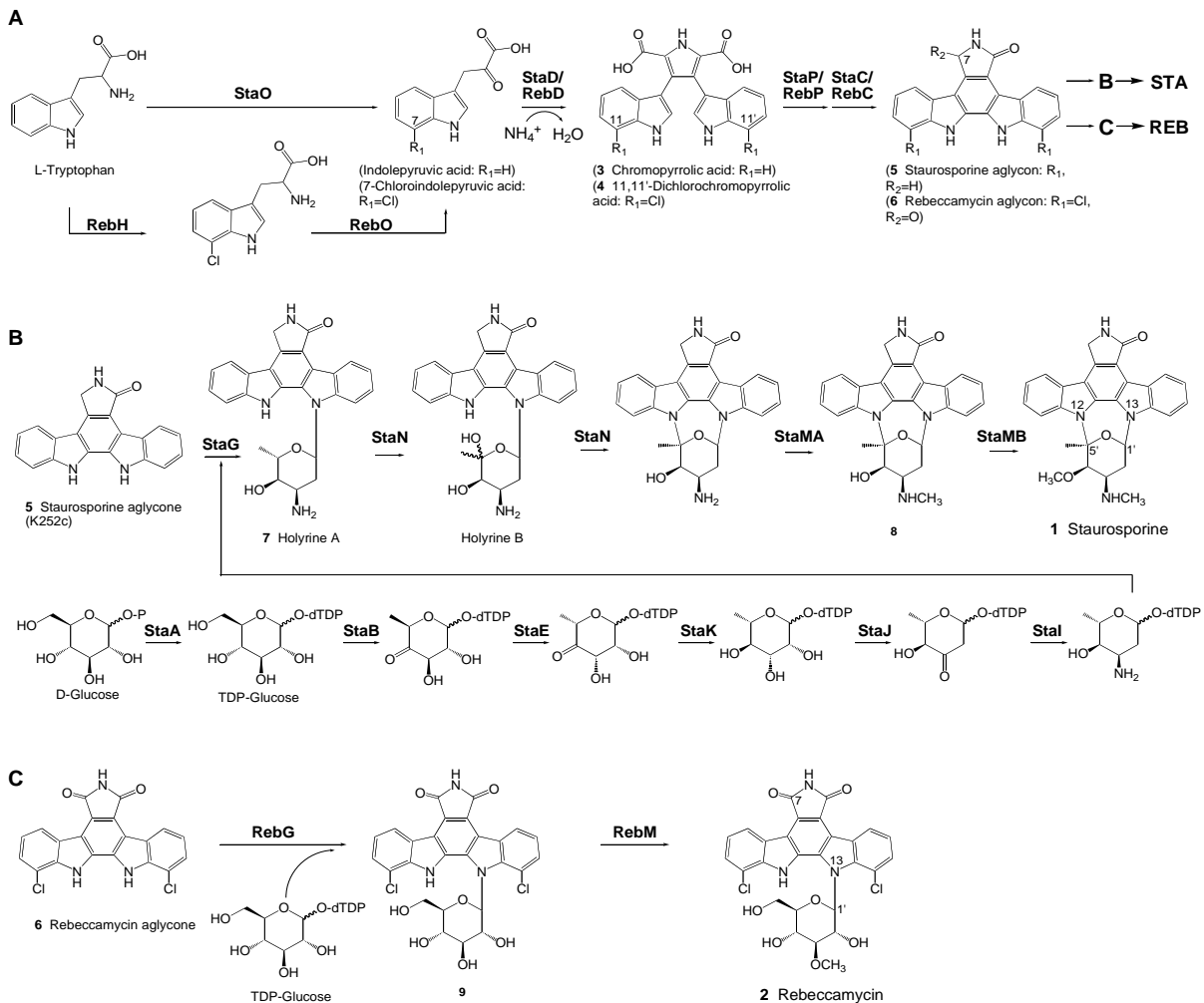


図 1 5 推定されたインドロカルバゾール骨格部位 (A)、スタウロスポリン (B) 及びレベッカマイシン (C) 生合成経路

(methyltransferase), *rebR* (transcriptional regulator), *rebH* (tryptophan halogenase), *rebT* (membrane transporter), *orfD2* の遺伝子破壊株を染色体相同組換えを用いて作製し、それぞれの生産物を同定し、NMR、MS を用いて 6 種類の化学構造を決定した。各遺伝子破壊株の生産物はその遺伝子産物酵素が変換する基質を反映していることから、図 1 5 のようなレベッカマイシン生合成経路を推定することができた。これはインドロカルバゾール化合物における世界で初めての生合成経路の同定となった。まず、tryptophan がクロル化し、7-chlorotryptophan ができ、更に酸化されて、7-chloroindole-3-pyruvic acid に変換される。その後、*rebD* によって、7-chloroindole-3-pyruvic acid 2 分子がカップリングして dichlorochromopyrrolic acid (CCA 4) ができる。この後、二段階の酸化反応後、レベッカマイシンアグリコンになる (図 1 5 A)。アグリコンへはグルコースが転移反応で結合し、最後にメチル化されて、レベッカマイシンが生合成されると考えられる (図 1 5 C)。最近、*staD* をはじめとして、*redD*, *staP*, *staC* など、インドロカルバゾール骨格形成に関与する遺伝子の組み換え蛋白発現が相次いで成功し、それぞれの酵素学的性質が明らかとなっている^{12, 13, 14, 15}。CCA 4 が生合成中間体であることは全く予期していないことであった。実は、CCA の脱クロル体である chromopyrrolic acid (クロモピロリン酸・CPA 3) はビオラセイン生産菌である *Chromobacterium violaceum* から発見されている。ビオラセインもトリプトファン 2 分子が縮合した構造を持っており、更には *rebD* はビオラセイン生合成酵素である *vioB* と唯一相同性のある遺伝子である。以上のことから、インドロカルバゾールとビオラセインは構造上の関連性もさることながら、その生合成経路についても類似点が多く、微生物間の水平進化が行われたことを強く示唆している。

(3) スタウロスポリン合成遺伝子のクローニングと生合成経路の推定⁹⁾

Streptomyces sp. TP-A0274 はスタウロスポリンを生産する菌株であり、富山県小杉町の土壌より我々が分離した。上述のように、本菌のスタウロスポリン生合成遺伝子群のクローニング、アミノ酸配列のホモロジー解析をおこなった。その結果、インドロカルバゾール骨格の形成にはレベッカマイシン生合成遺伝子群のうち *reb0*, *rebD*, *rebP* と平均 53% のアミノ酸が一致する *sta0*, *staD*, *staP* の 3 つの遺伝子が存在していることが明らかになった。また、C-7 位を酸化すると予想される *rebC* のホモログはスタウロスポリン生合成遺伝子群の末端部分に存在していた (図 1 4)。

スタウロスポリンの糖部位はレベッカマイシンに比べて複雑な修飾が行われているが、それに関与する遺伝子の特定はアミノ酸配列のホモロジーより容易に推定できた。その結果、糖の修飾には 8 個の遺伝子が関与し、図 1 5 B の様な生合成経路であると推定した。

(4) 「非天然型」天然インドロカルバゾール化合物の生産

遺伝子破壊実験から筆者らによって世界で初めてインドロカルバゾール化合物の生合成経路が同定された。そこで、いよいよコンビナトリアル生合成技術の出番となるわけであるが、既に、各遺伝子の破壊株を作製しており、これら破壊株の生産する化合物も天然にはないものである。図 1 7 に実際に生産に成功した化合物を示してある。特に赤枠で示した化合物は本実験で初めて得られた新規化合物である。現在その活性についてはアッセイ中であり、全ての化合物について活性が明らかになったわけではないが、CCA については血管伸長の信号伝達に必要な Flt-1 キナーゼの選択的阻害活性が確認されている。図中 *toxA* と命名された遺伝子は BE-13793C (図 1 3) のトリプトファン水酸化酵素遺伝子であるが、これを、スタウロスポリンアグリ

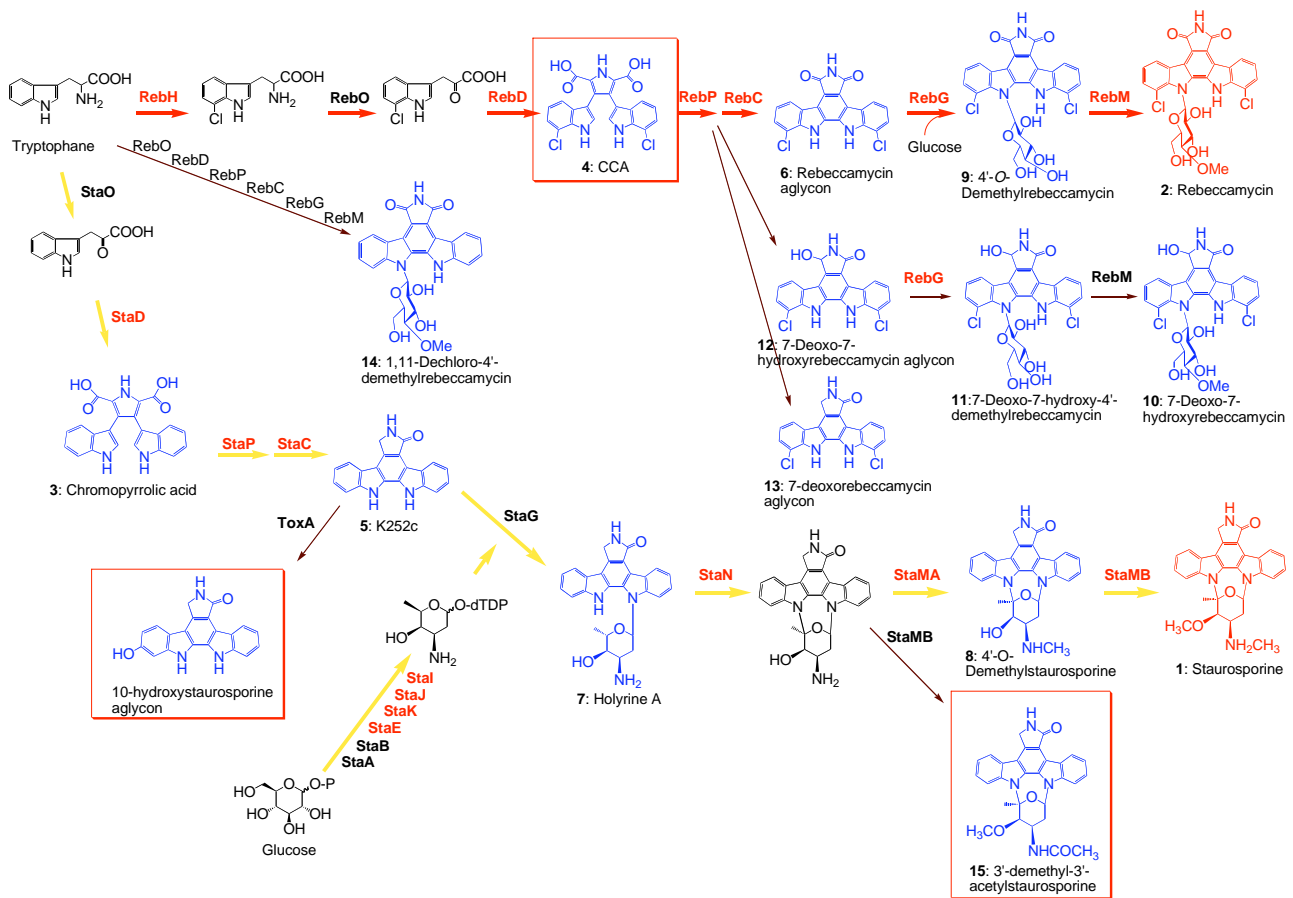


図 1 7 インドロカルバゾールのコンビナトリアル生合成

コンを生合成する菌株に導入したところ、水酸化物を得ることに成功した。また、Salas らのグループも *Streptomyces albus* を宿主とした華麗なインドロカルバゾールコンビナトリアル生合成に成功している¹⁶⁾。このようにして新たに創成された化合物がどのような生理活性を有しているのか、今後の進展が楽しみである。

終わりに

「コンビナトリアル生合成」技術は、既に人類が長い年月を掛けて成熟させてきた「有機合成」に匹敵する可能性を秘めた技術であるといえる。McDaniel らも堂々と論文の中で「これだけの物を効率よく合成することは化学合成では不可能だ」と言い切っている。もちろん、今後も有機合成技術は人類にとって必要不可欠な技術として不動の地位を占めることは間違いないし、生合成技術が有機合成を上回っている部分は現段階ではまだほんの一部分である。しかしながら、本技術はわずか20年ほど前に生まれた技術であり、未熟さ故に実用化に対して問題のある点も多いが、遺伝子組換え技術の進歩とともに必ずや技術的な壁を乗り越えさらなる発展をするであろう。今後コンビナトリアル生合成技術の進展とともに「物作り」の局面で、微生物に化合物を作らせるという選択肢はますます増えると思われる。

参考文献

1. Shier WT, Schaefer PC, Gottlieb D, Rinehart KL Jr., Use of mutants in the study of aminocyclitol antibiotic biosynthesis and the preparation of the hybrimycin C complex *Biochemistry*. 1974 13(25):5073-8.
2. Omura S, Sadakane N, Tanaka Y, Matsubara H., Chimeramycins: new macrolide antibiotics produced by hybrid biosynthesis. *J. Antibiot* 1983, 36(7):927-30.
3. Hopwood DA, Malpartida F, Kieser HM, Ikeda H, Duncan J, Fujii I, Rudd BA, Floss HG, Omura S., Production of 'hybrid' antibiotics by genetic engineering. *Nature*. 1985, 314(6012):642-4.
4. McDaniel R, Ebert-Khosla S, Hopwood DA, Khosla C., Rational design of aromatic polyketide natural products by recombinant assembly of enzymatic subunits., *Nature*. 1995, 375(6532):549-54.
5. McDaniel R, Thamchaipenet A, Gustafsson C, Fu H, Betlach M, Ashley G., Multiple genetic modifications of the erythromycin polyketide synthase to produce a library of novel "unnatural" natural products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 96(5):1846-51. Erratum in: 2000 97(9):5011. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96(10):5890.
6. T. Ohuchi, A. Ikeda-Araki, A. Watanabe-Sakamoto, K. Kojiri, M. Nagashima, M. Okanishi, & H. Suda, Cloning and expression of a gene encoding N-glycosyltransferase (ngt) from *Saccharothrix aerocolonigenes* ATCC 39243. *The Journal of Antibiot.* 53, 393-403 (2000).
7. 尾仲宏康、谷口真市、五十嵐康弘、古米保 Award for Excellence to authors publishing in *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. *Lechevalieria aerocolonigenes* ATCC39243 のレベッカマイシン生合成遺伝子群の解析 日本農芸化学会誌 vol.78, No.9, p48~49 (2004)
8. C. Sanchez, A. I. Butovich, F. A. Brana, J. Rohr, C. Mendez, & A. J. Salas, The biosynthetic gene cluster for the antitumor rebeccamycin: characterization and generation of indolocarbazole derivatives. *Chemistry and Biology*, 9, 519-531 (2002).
9. H. Onaka, S. Taniguchi, Y. Igarashi, & T. Furumai. , Cloning of the staurosporine biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. TP-A0274 and its heterologous expression in *Streptomyces lividans*. *The Journal of Antibiotics*,

55: 1063-1071 (2002)

10. 池田治生、大村智、「コンビナトリアル・バイオシンセシス」、蛋白質核酸酵素、1998年7月号
11. H. Onaka, Biosynthesis of heterocyclic antibiotics in actinomycetes and an approach to synthesize the natural compounds, *Actinomycetologica*, 20: 62-71 (2006)
12. S. Asamizu, Y. Kato, Y. Igarashi, T. Furumai, H. Onaka, Direct formation of chromopyrrolic acid from indole-3-pyruvic acid by StaD, a novel hemoprotein in indolocarbazole biosynthesis, *Tetrahedron letters*, 47: 473-475 (2006)
13. Howard-Jones A. R. & C. T. Walsh: Staurosporine and rebeccamycin aglycones are assembled by the oxidative action of StaP, StaC, and RebC on chromopyrrolic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 128:12289-12298, 2006
14. Howard-Jones A. R. & C. T. Walsh: Enzymatic generation of the chromopyrrolic acid scaffold of rebeccamycin by the tandem action of RebO and RebD. *Biochemistry*. 44:15652-15666, 2005
15. Nishizawa T.; S. Gruschow, D. H. Jayamaha, C. Nishizawa-Harada & D. H. Sherman: Enzymatic assembly of the bis-indole core of rebeccamycin. *J. Am. Chem. Soc.* 128: 724-725, 2006
16. Sanchez C.; L. Zhu, A. F. Brana, A. P. Salas, J. Rohr, C. Mendez & J. A. Salas JA: Combinatorial biosynthesis of antitumor indolocarbazole compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 461-466, 2005