

アヴィラマイシン A およびランドマイシン A の生合成研究

武蔵野大学 田口 貴章
派遣期間 2004年4月4日～2005年3月26日
研究機関 Institut für Pharmazeutische Wissenschaften,
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg,
Stefan-Meier-Str. 19, 79104 Freiburg, Germany
研究指導者 Prof. Dr. Andreas Bechthold

主題 I 「アヴィラマイシン A の生合成研究－C-C 結合による側鎖アセチル基の生成機構の解明」

Streptomyces viridochromogenes Tü57 の生産する avilamycin A (Fig. 1) は orthosomycin 類抗生物質に属し、dichloroisoevernic acid に 7 糖からなる糖鎖 (heptasaccharide) が結合している。この化合物は特にグラム陽性菌に対して強力な抗菌活性を示すがバイオアベイラビリティ等の点から医薬品としての開発は遅れている。生合成遺伝子改変による新規 avilamycin 誘導体を生産できれば、それを医薬品として開発できると期待し Bechthold 研究室では研究を進めている。

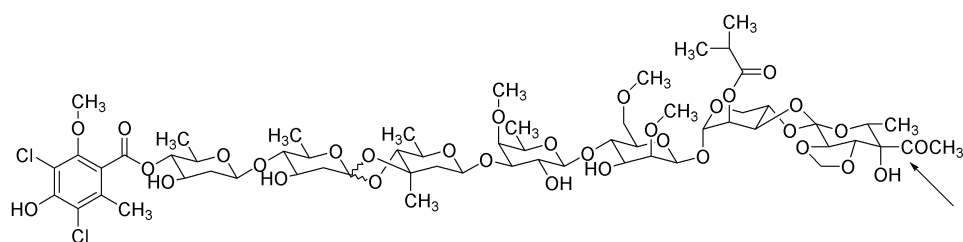


Fig. 1 The structure of avilamycin A. Acetyl moiety of eurekanate is marked by the arrow.

Avilamycin A の生合成遺伝子クラスターはゲノム上約 56 kb にわたり、54 個の遺伝子から構成される。しかし相同性検索からだけでは全遺伝子の機能を推定または特定することは困難であり、機能未知遺伝子も多数残されている。これら遺伝子の中で *aviB1*、*aviO2* をそれぞれ不活性化した菌体は、糖鎖末端に存在する eurekanate のアセチル基 (Fig. 1 矢印) を失った化合物、desacetyl-avilamycin A を生産することが前任者によって明らかにされていた [1]。生合成遺伝子クラスター中連続して位置する *aviB1*、*aviB2* のコードするタンパク (以下 AviB1、AviB2) は相同性検索の結果から複合体を構成しアセチル基の付加を触媒すると予想されるが、上記実験結果は更に、*aviO2* のコードする酸化酵素と推定されるタンパク AviO2 も、AviB1・AviB2 とともに複合体を構成しアセチル基付加に関与する可能性を示唆している。そこで私は、このアセチル基付加の反応機構を解明するため、AviB1・AviB2・AviO2 それぞれの精製と *in vitro* assay 系の構築、及び生化学的解析を計画した。

in vitro assay 系を構築するにあたり反応基質が必要であり、つまりは多量の desacetyl-avilamycin A が必要となることから、*aviB1* ミュータント、*aviO2* ミュータントのどちらかが desacetyl-avilamycin A をより効率よく生産するのか知る必要があった。また両ミュータントの代謝産物プロファイルのわずかな差異が両酵素の機能解明に役立つ可能性を考慮し、*aviB1*、*aviO2* ミュータントそれぞれを同条件で液体培養し、その代謝産物を HPLC により改めて精査し

た。結果、両ミュータントとも同程度の desacetyl-avilamycin A をメインプロダクトとして与えることが判った。加えて、マイナープロダクトのプロファイルに差異が認められた。

今後は、これらマイナーピークとして見られる化合物の単離・構造決定、大量の desacetyl-avilamycin A の単離、AviB1・AviB2・AviO2 の精製と生化学的解析が進展し、アセチル基付加の反応機構が解明されると期待される。

主題 I I 「ランドマイシン A の生合成研究－糖転移酵素を利用した新規誘導体の創製」

Streptomyces cyanogenus S136 の生産する landomycin A (Fig. 2) は angucycline 系抗生物質に属し、ポリケチド由来のアグリコン、landomycinone 8 位の水酸基に 2 種のデオキシ糖 (D-olivose, L-rhodinose) 計 6 個からなる糖鎖 (hexasaccharide) が結合している。この化合物は抗腫瘍活性を示すことが確認されておりその作用機序の解明が精力的に進められているが、医薬品としての使用には至っていない。*S. cyanogenus* C136 は landomycin A の他に糖鎖が 5 糖のものと 2 糖のものも一定の比率で生産する。これらはともに landomycin A の生合成中間体と考えられ、また landomycin A 同様抗腫瘍活性を示すもののその活性は landomycin A より弱い。このことから、6 糖以上の糖鎖をもつ landomycin 類や、あるいは 6 糖でも構成糖の組成・順序が違う糖鎖をもつ landomycin 誘導体を生産できれば、活性がより強い化合物を獲得できる可能性があると考えられた。また糖類の有機化学合成は現在でも依然として困難であるが、微生物の生合成経路を利用すれば比較的容易に化合物を獲得できると期待できる。よってこの化合物についても遺伝子改変による構造変換と生理活性の上昇、医薬品への適用を目指し研究が進められている。

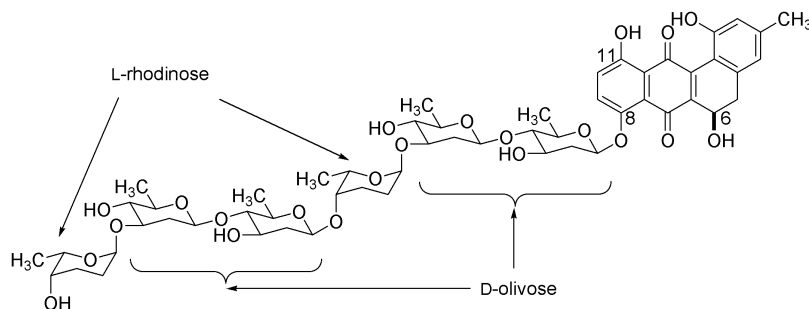


Fig. 2 Landomycin A

Landomycin A の生合成遺伝子クラスターはゲノム上 36 kb にわたり、32 個の遺伝子から構成される。このうち配列情報から糖転移酵素をコードすると推定された遺伝子は *lanGT1*, *lanGT2*, *lanGT3*, *lanGT4* の 4 種のみである。他の化合物に関しては通常、結合している糖の個数と同じ個数の糖転移酵素が必要とされるのに対し landomycin A 生合成には 4 種の糖転移酵素で十分というのは、生合成の観点から非常に興味深い。相同性検索の結果から *lanGT1*, *lanGT2*, *lanGT3* のコードする糖転移酵素 (以下 LanGT1, LanGT2, LanGT3 と表記) は olivose 転移酵素、残る LanGT4 は rhodinose 転移酵素と考えられた。

アミノ酸の一次配列情報から得られた各糖転移酵素の機能は、遺伝子破壊実験と遺伝子破壊体を用いた biotransformation 実験によって検討された。その結果 LanGT1 は 2 番目と 5 番目の D-olivose 結合を触媒し、LanGT3 は 4 番目の D-olivose 結合を触媒し、LanGT4 は 3 番目と 6 番目の L-rhodinose 結合を触媒することが明らかにされた [2]。残る LanGT2 は 1 番目の D-olivose をアグリコンへ結合すると思われたので、このことについて私は実験的に検討した。

S. cyanogenus C136 の野生株と *lanGT2*破壊体 (以下 Δ *lanGT2*と表記) を同条件で液体培養し、酢酸エチルで抽出した後その抽出液を HPLC により分析し比較した。結果、 Δ *lanGT2* の抽出液には landomycin A を全く含まれず、代わりにほぼ単一の化合物が検出された。この化合物を単離し、高分解能 MS、NMR、X 線結晶構造解析から tetrangulol (Fig. 3) であることを明らかにした。Tetrangulol は糖鎖だけでなく 6 位と 11 位の水酸基も失っている。つまりこの構造は、LanGT2 が推察通り D-olivose の 8 位水酸基への転移を触媒することを示唆するのみならず、6 位と 11 位の水酸基は D-olivose が結合した後に導入されることを示唆している。

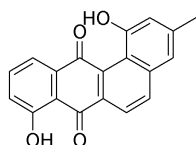


Fig. 3 Tetrangulol

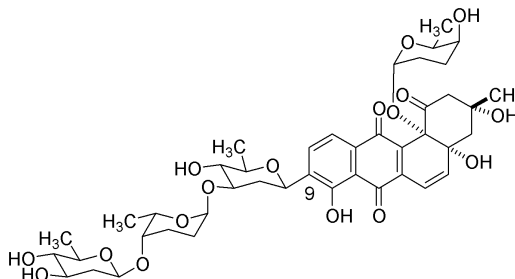


Fig. 4 Urdamycin A

続いて landomycin A 同様 angucycline 系抗生物質に分類される化合物 urdamycin A (Fig. 4) に着目した。この化合物は *Streptomyces fradiae* Tü2717 によって生産され landomycin A と類似のアグリコンを有するが、デオキシ糖の結合様式は大きく異なる。特に landomycin A の糖鎖が 8 位の水酸基に結合しているのに対し、urdamycin A の糖鎖は 9 位への C配糖化によって結合している。Urdamycin A 生合成においてアグリコン 9 位への配糖化は UrdGT2 が触媒するが、この糖転移酵素は LanGT2 に対してアミノ酸一次配列上 60%と比較的高い相同性を示す。よって、*lanGT2* 破壊体に *urdGT2* 遺伝子を導入すれば、糖鎖が C配糖化によって結合している新規 landomycin 誘導体を生産できると考え相補実験を行った。

相補株 Δ *lanGT2*+*urdGT2*を作成し液体培養した後、酢酸エチル抽出液を HPLC で分析したところ、tetrangulol の他に tetrangulol と同様の UV スペクトルを示す化合物 2 種が新たに検出された。また landomycin A と同様の UV スペクトルを示す化合物は全く生産されなかった。新たに検出された化合物をそれぞれ単離し、LC-MS、NMR による分析結果からそれぞれ 9-C-D-olivosyl tetrangulol (Fig. 5 以下 oli-tet と表記) と 9-C-L-rhodinosyl-D-olivosyl tetrangulol (Fig. 6 以下 rhodi-oli-tet と表記) であることを明らかにした [3]。Tetrangulol、oli-tet、rhodi-oli-tet はおよそ 6 : 3 : 1 の比率で生産されることから、UrdGT2 は tetrangulol を基質として認識するものの変換効率はそれほど高くはないこと、またアグリコン 6 位・11 位の水酸化は D-olivose が 8 位に O配糖化したときにのみ起こることが考えられた。また rhodi-oli-tet は、LanGT4 が oli-tet を基質として認識し L-rhodinose を結合することによって生合成されと考えられる。LanGT4 は本来 3 番目の L-rhodinose 結合を触媒するものであるから、反応効率は低いながらも LanGT4 の基質特異性

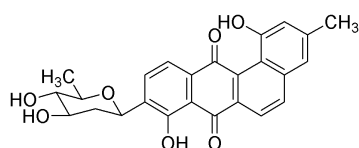


Fig. 5 9-C-olivosyl tetrangulol

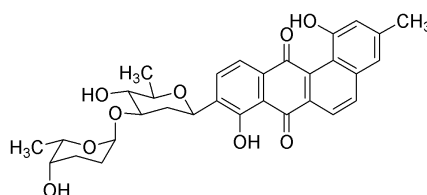


Fig. 6 9-C-rhodinosylolivosyl tetrangulol

は緩いことが示唆された。

ところで、*lanGT2*を破壊した際、極性効果によってクラスター中 *lanGT2*の下流に存在する *lanGT1*も不活化されてしまっている。そこで相補株 Δ *lanGT2+urdGT2*にさらに *lanGT1*を導入し、 Δ *lanGT2+urdGT2+lanGT1*という株を作成すれば、landomycin Aと同様の6糖の糖鎖が tetrangulol に *C*配糖化した化合物を獲得できると期待した。 Δ *lanGT2+urdGT2+lanGT1*を液体培養し酢酸エチル抽出液を LC-MS で分析したところ、tetrangulol、oli-tet、rhodi-oli-tetのほか、tetrangulol をアグリコンとし3個以上の糖が結合していると思われる数種の tetrangulol 誘導体の生産が認められた。また、主成分は tetrangulol、oli-tet、rhodi-oli-tet の3種であり、他の誘導体はマイナープロダクトとして少量しか生産されなかった。マイナープロダクトのうちの一つを単離し、LC-MS、NMR の分析結果から 9-*C*diolivosyl tetrangulol (Fig. 7)であることを明らかにした。これは、LanGT1 が oli-tet を基質として認識し D-olivose を結合したことを示しており、LanGT1 が2番目の糖の結合を触媒する新たな証拠とも言える。また単離は未だ終わっていないが、3糖、4糖の糖鎖が結合していると思われる tetrangulol 誘導体は、landomycin A の糖鎖と同じパターンの糖鎖を有すると期待される。

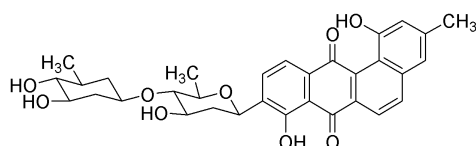


Fig. 7 9-*C*diolivosyl-tetrangulol

尚、tetrangulol、oli-tet、rhodi-oli-tet はおよそ 3 : 2 : 2 程度の比率で生産されており、LanGT1 の発現によって rhodi-oli-tet の生産量が上昇したのは非常に興味深い。LanGT1 と LanGT4 が複合体を形成し配糖化反応の効率が高まったという可能性が考えられるが、その詳細については更なる研究が必要である。また残念なことに、hexasaccharide が *C*配糖化によって結合している landomycin 誘導体を創造することは不可能だと思われる。しかしながら、landomycin A と同様の hexasaccharide を有する tetrangulol 誘導体の創造は可能だと思われ、今後、tetrangulol 誘導体の生理活性を検討し、landomycin A の生理活性と比較することで、抗腫瘍活性を示すための作用機序や、より合理的なドラッグデザインが可能になると期待される。

[1] Treede, I. *et. al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 400-6 (2005).

[2] Luzhetskyy, A. *et. al.*, *ChemBioChem*, **5**, 1567-70 (2004).

[3] Luzhetskyy, A., Taguchi, T., Fedoryshyn, M., Duerr, C., Novikov, V., and Bechthold, A. *ChemBioChem*, in press.