

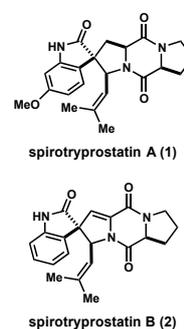
シトクロム P450 の多様な触媒機能の解明と応用研究 静岡県立大学薬学部 渡辺 賢二

【略歴】

- 2000年 北海道大学 大学院農学研究科博士後期課程修了
- 2000年 博士 (農学) 北海道大学
- 2000年 米国 ウィスコンシン大学マディソン校薬学部 博士研究員
- 2000年 日本学術振興会特別研究員 (PD) (ウィスコンシン大学)
- 2001年 米国 スタンフォード大学 化学および化学工学部 博士研究員
- 2003年 北海道大学 大学院農学研究科 応用生命科学専攻 助手
- 2004年 米国 南カリフォルニア大学 薬学部 Senior Research Associate
- 2006年 米国 南カリフォルニア大学 薬学部 Research Assistant Professor
- 2008年 北海道大学 大学院理学研究院 化学専攻 特任助教
- 2008年 岡山大学 異分野融合先端研究コア テニユアトラック助教
- 2009年～ 静岡県立大学 薬学部 准教授

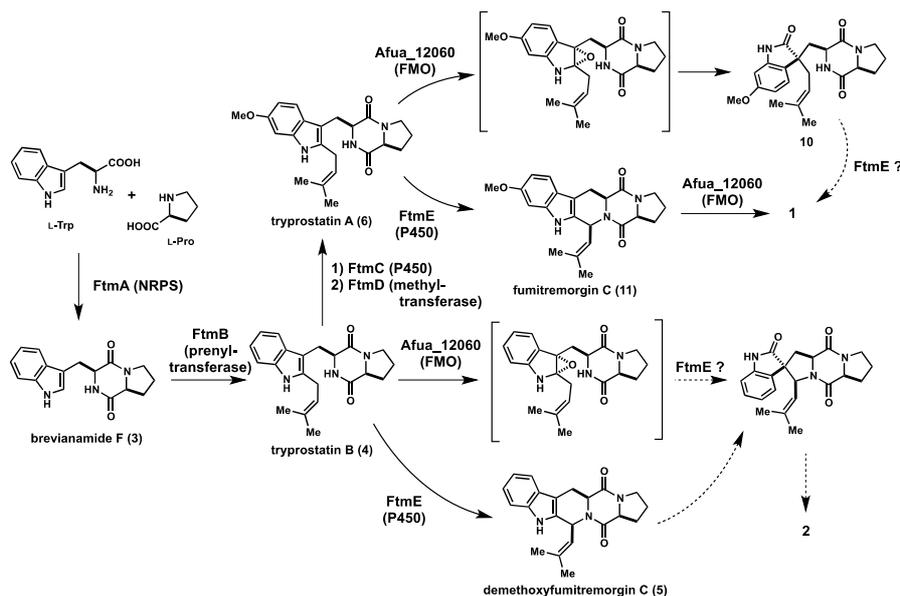
抗腫瘍性生物活性物質 spirotryprostatin 類

Spirotryprostatins A (1) および 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。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。



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。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*

由来ホスホパ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 (Fig. 2)。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。

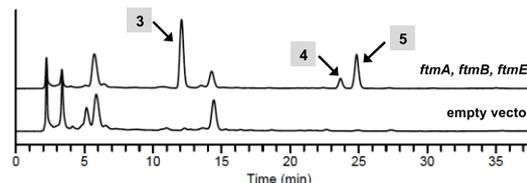


Fig. 2 糸状菌由来遺伝子の出芽酵母による発現と天然物生産

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。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。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 (Fig. 3)。我々は、これらの情報をもとにスピロ炭素の生合成に関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。

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。

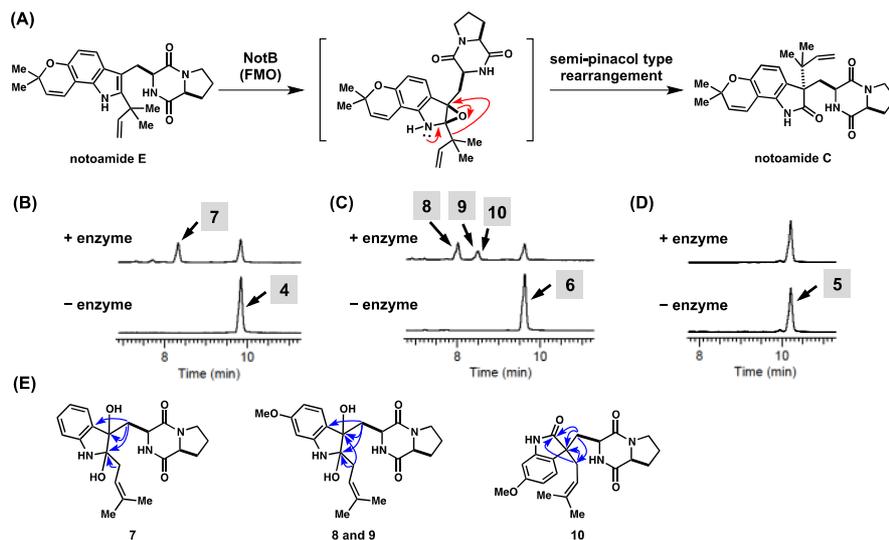


Fig. 3 Spirotryprostatin類のスピロ環構築形成機構の解明 (A) フラビン依存性酸化酵素NotBによるNotoamide Cの生成機構、(B-D) Afua_12060精製酵素の各基質における試験管内反応、(E) 酵素反応生成物の化学構造とHMBC相関図