

# 新規 P-450 のアリールカップリング能を利用した有用ポリケタイドの生産

鮒 信学

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

## 研究の目的

高齢化や食の国際化に伴う疾病構造の転換、多剤耐性菌の出現などにより新疾病治療及び予防薬、新規作用機構を持つ抗生物質の開発が急務である。しかしながら天然から見出される新規化合物は年々減少しており、従来の探索的手法に変わる新規物質生産系の構築が望まれている。我々は以前、放線菌 *Streptomyces griseus* から 1,4,6,7,9,12-hexahydroxyperylene-3,10-quinone (HPQ)メラニンの合成に必須な遺伝子として P-450mel 遺伝子を同定していた。P-450mel 遺伝子破壊株は HPQ を生産せず、1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene (THN)から生じた flaviolin を蓄積した。このことから P-450mel は、THN のアリールカップリングにより HPQ を生成する酵素であると予想されている。本研究課題では、P-450mel のアリールカップリングを *in vitro* で行うことを第一の目標としている。また、P-450 によるアリールカップリングの報告例は少ないことから、独自の発見に基づく微生物新規生体触媒としての確立、新規物質生産系の構築を目的としている。

## 方法

**組換え P-450mel の調製** *S. griseus* のクロモソームを鋳型とし、PCR により P-450mel 遺伝子を増幅し、これを大腸菌における発現用ベクター pET26b にクローニングし、pET26b-P-450mel を構築した。pET26b-P-450mel を大腸菌 BL21 (DE3)に形質転換し、発現の誘導を行った。菌破砕液の可溶性画分から組換え P-450mel を Ni-NTA カラムにより精製し、酵素標品を得た。

**酵素活性の検討** 100 mM sodium phosphate (pH 7.3)、1 mM dithiothreitol、1 mM EDTA、10% glycerol、1 mM NADPH、0.5 U of spinach ferredoxin:NADP<sup>+</sup> reductase、40 μg spinach ferredoxin、23.4 μg of P-450mel、400 μM of THNを含む 500 μlの反応液を 30°Cにおいて 30 分間インキュベートした。50 μl の 6 M HClにより反応を終了し、200 μlの酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル相を濃縮、20 μlのメタノールに溶解し、HPLCで分析した。

## 結果

**P-450melの酵素活性の検討** P-450 は、電子伝達系として ferredoxin と ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductaseを必要とするが、P-450melの放線菌における電子伝達系蛋白は明らかとなっていない。そこで我々は、ほうれん草由来の電子伝達系を用い反応を行った。THNを基質としたところ、2種の生成物がHPLCで確認できた (Fig. 1A)。標品とのco-migrationが確認されたため (Fig. 1B)、9分のピークはHPQであることが判明した。6.2分のピークは、LC-MSによる解析の結果、pseudoHPQ (Fig. 2) であることが確認された。これらのピークは不活性化したP-450mel (Fig. 1C) および電子伝達系を除いたコントロール (Fig. 1D) においてもわずかに見られることから、極微量ながら非酵素的にも進行することが判明した。また、不活性化したP-450melを用いた反応 (Fig. 1F) と比較することで、P-450melはpseudoHPQと反応しHPQを与えることが

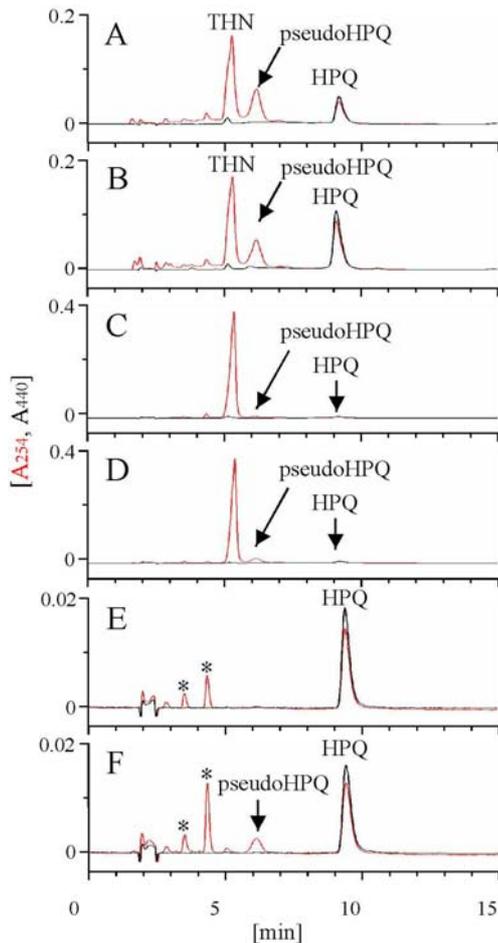


Fig. 1. HPLC analysis of *in vitro* products. *A*, The products from THN by the reconstituted P-450mel system were analyzed by simultaneously measuring the absorbances at 254 nm (in red) and 440 nm (in black). *B*, Authentic HPQ was co-injected with the products from the P-450 reaction on THN. *C*, As a negative control, P-450mel was boiled before use for the reaction of P-450mel on THN. *D*, As a negative control, ferredoxin and ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase were removed from the reaction. *E*, The products from pseudoHPQ by the P-450mel reaction were analyzed. The peaks indicated with asterisks, derived spontaneously from pseudoHPQ were not identified. *F*, As a negative control, P-450mel was boiled before use for the reaction on pseudoHPQ.

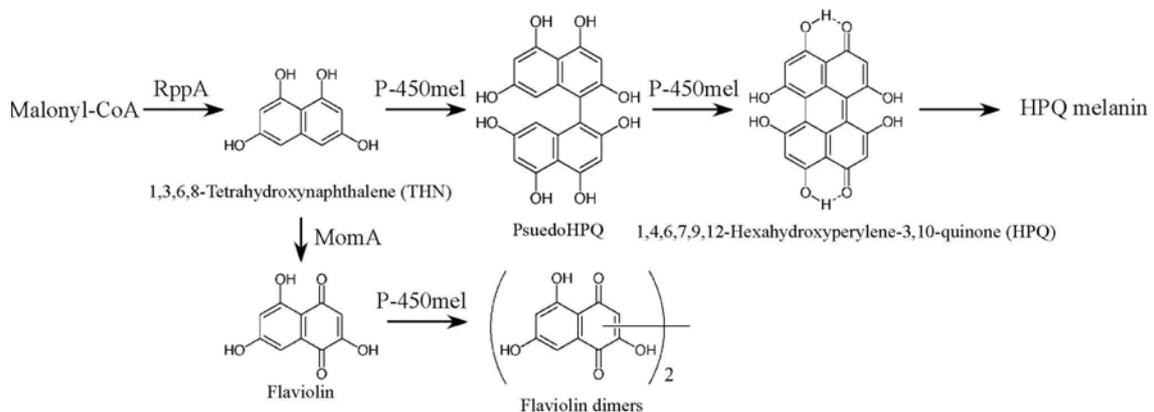


Fig. 2. Proposed HPQ melanin biosynthetic pathway in *S. griseus*.

分かった (Fig. 1E)。以上より、P-450mel は 2 分子の THN をアリアルカップリングし pseudoHPQ を与え、続いて pseudoHPQ の分子内のアリアルカップリングにより HPQ を生成することが明らかとなった。

**P-450mel の基質特異性の検討** 一般的に P-450 は基質特異性が寛容であり、幅広い基質と反応することが知られている。そのため、酵素または微生物触媒として種々の化合物の工業生産に用いられている。我々は P-450mel のアリアルカップリング試薬としての応用を期待し、まず、種々の芳香族化合物について酵素活性を検討した。その結果 P-450mel は、1-naphthol、2-naphthol、1,3-dihydroxynaphthalene (1,3-DHN)、1,4-DHN、1,5-DHN、1,6-DHN、1,7-DHN、2,3-DHN、

2,6-DHN、2,7-DHN、emodin、emodin anthone を基質としないことが判明した。これに対し、P-450mel は flaviolin と速やかに反応し、生成物として flaviolin のダイマーを与えた。なお、flaviolin は、酸化酵素 MomA による THN の酸化により生じるポリケタイドである。一部の放線菌において MomA、P-450mel と THN を生成する RppA の 3 酵素はオペロンを形成していることから、flaviolin は P-450mel の生理基質の一つであると考えられる。以上から本酵素は、THN と flaviolin という生理基質とは反応するが、それ以外の芳香族化合物とは反応しないことが判明した。

## 結論

本研究課題により、放線菌 *S. griseus* の P-450mel は、2 分子の THN を分子間でアリールカップリングすることで pseudoHPQ を生成し、続いて pseudoHPQ の分子内アリールカップリングにより HPQ を生成する新規酵素であることが判明した (Fig. 2)。

## 文献

1. Funa, N., Ohnishi, Y., Fujii, I., Shibuya, M., Ebizuka, Y., and Horinouchi, S. (1999) *Nature* 400, 897-899
2. Omura, T. and Sato, R. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 2370-2385
3. Ichinose, K., Ebizuka, Y., and Sankawa, U. (2001) *Chem. Pharm. Bull.* 49, 192-196
4. Trower, M. K., Sariaslani, S. F., and O'Keefe, D. P. (1989) *J. Bacteriol.* 171, 1781-1787
5. Funa, N., Funabashi, M., Yoshimura, E., and Horinouchi, S. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 14514-14523
6. Funa, N., Funabashi, M., Ohnishi, Y., and Horinouchi, S. (2005) *J. Bacteriol.* 187, 8149-8155