

ヒタチマイシン生合成におけるポスト PKS 反応の解析

宮永 顕正
東京工業大学 理学院

研究の目的

ヒタチマイシンは、放線菌 *Streptomyces scabrissporus* JCM11712 が生産するβ-アミノ酸含有型マクロラクタム化合物であり、抗腫瘍活性や抗真菌活性を示す¹⁾。その構造上の特徴として、炭素五員環構造をマクロラクタム骨格内に含む特徴的な二環式構造を有する点が挙げられる (図 1)。この二環式構造は、ポリケタイド合成酵素 (PKS) によるマクロラクタム基本骨格の構築後に、ポスト PKS 修飾反応により生じると考えられ、ポリケタイド構造の骨格変換反応の一つとして興味深い。そこで、本研究では、ヒタチマイシン生合成においてポスト PKS 修飾反応を行うと考えられた 6 つの酵素の遺伝子破壊株を作製し、蓄積されると期待される生合成中間体の構造から、二環式構造の形成機構の解明を目指した。

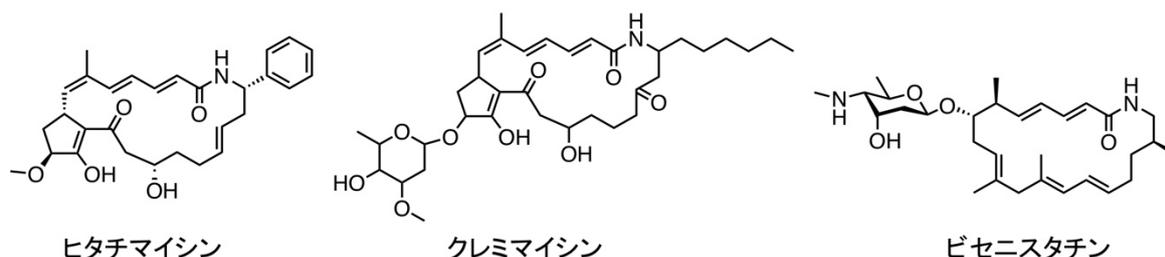


図 1 β-アミノ酸含有型マクロラクタム化合物

方法

我々はこれまでにヒタチマイシン生合成遺伝子クラスターを同定している²⁾。同様の二環式構造を有するマクロラクタム化合物であるクレミマイシンの生合成遺伝子クラスター³⁾との比較から、共通して存在する 5 つの酵素遺伝子、すなわち 2 つの酸化還元酵素 (*hitM1* と *hitM4*) 遺伝子と 2 つの異性化酵素 (*hitM2* と *hitM5*) 遺伝子と 1 つのシトクロム P450 酸化酵素 (*hitM3*) 遺伝子がヒタチマイシンのポスト PKS 修飾反応に関わると考えられた。また、ヒタチマイシンは、10 位水酸基がメチル化されていることから、メチル基転移酵素 (*hitM6*) 遺伝子もポスト PKS 修飾反応に関わっていると予想した。そこで、これら 6 つの酵素遺伝子 (*hitM1*~*hitM6*) の破壊株をそれぞれ作製し、培養抽出物を解析した。また、HitM4 の組換えタンパク質を調製し、その酵素反応を検討した。

結果

1. 遺伝子破壊株 $\Delta hitM1 \sim \Delta hitM6$ の解析

作製した遺伝子破壊株 $\Delta hitM1 \sim \Delta hitM6$ は全てヒタチマイシン生産能を失っていた。このことから、HitM1~HitM6の6つの酵素はヒタチマイシンの生合成に関わっていると考えられた。これらの遺伝子破壊株が蓄積する化合物を調べたところ、酸化還元酵素遺伝子 *hitM1* の破壊株やメチル基転移酵素遺伝子 *hitM6* の破壊株は二環式構造を含む類縁化合物を生産することがわかった。このことから、HitM1 と HitM6 は二環式構造が構築された後に作用する酵素であると考えられた (図 2)。また、酸化還元酵素遺伝子 *hitM4* の破壊株は PKS によるマクロラクタム基本骨格構築直後の化合物 (化合物 1) を蓄積したことから、HitM4 がポスト PKS 修飾反応の最初の反応を担当と考えられた。一方で、異性化酵素遺伝子 *hitM2* や *hitM5* の破壊株やシトクロム P450 酸化酵素遺伝子 *hitM3* の破壊株については、ヒタチマイシン類縁体と考えられる化合物の生成を確認することはできなかった。

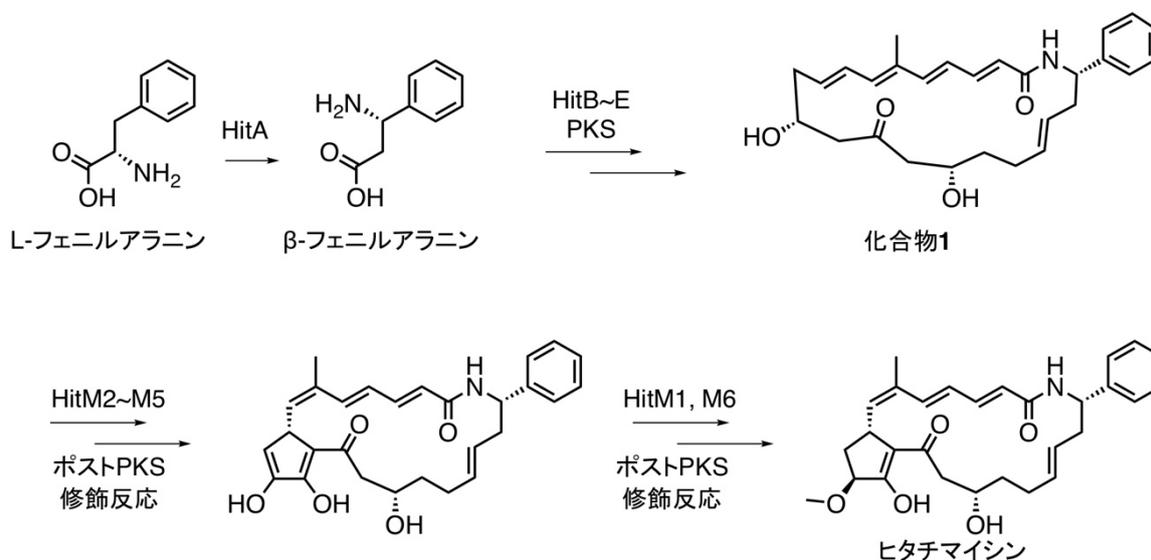


図 2 ヒタチマイシンの推定生合成経路

2. HitM4 の反応解析

酸化還元酵素 HitM4 が触媒する反応を明らかにするため、HitM4 の組換えタンパク質を大腸菌にて発現させ、精製した。精製した HitM4 酵素を用いて化合物 1 との反応を種々検討したところ、化合物 1 が何らかの化合物へと変換される条件を見出した。現在は、この反応生成物の単離と構造決定を検討している。

結論

ヒタチマイシン生合成において、ポスト PKS 修飾反応に関わると考えられた 6 つの酵素の遺伝子破壊株を作製し、生成した生合成中間体関連化合物の構造から、ヒ

タチマイシンの二環式構造の構築機構に関する知見を得た。また、ポスト **PKS** 修飾の最初の反応を担う酸化還元酵素 **HitM4** の反応解析を行い、反応の進行を検出した。今後は、**HitM4** の生成物の構造決定を行った後に、**HitM4** の生成物を用いて他のポスト **PKS** 修飾酵素との反応を検討し、より詳細に生合成経路を解析していく予定である。

文献

- 1) Ōmura, S., Nakagawa, A., Shibata, K., and Sano, H. (1982) The structure of hitachimycin, a novel macrocyclic lactam involving β -phenylalanine. *Tetrahedron Lett.* **23**: 4713-4716.
- 2) Kudo, F. *et al.* (2015) Genome mining of the hitachimycin biosynthetic gene cluster: involvement of a phenylalanine-2,3-aminomutase in biosynthesis. *Chembiochem* **16**: 909-914.
- 3) Amagai, K., Takaku, R., Kudo, F., and Eguchi, T. (2013) A unique amino transfer mechanism for constructing the β -amino fatty acid starter unit in the biosynthesis of the macrolactam antibiotic cremimycin. *Chembiochem* **14**: 1998-2006.