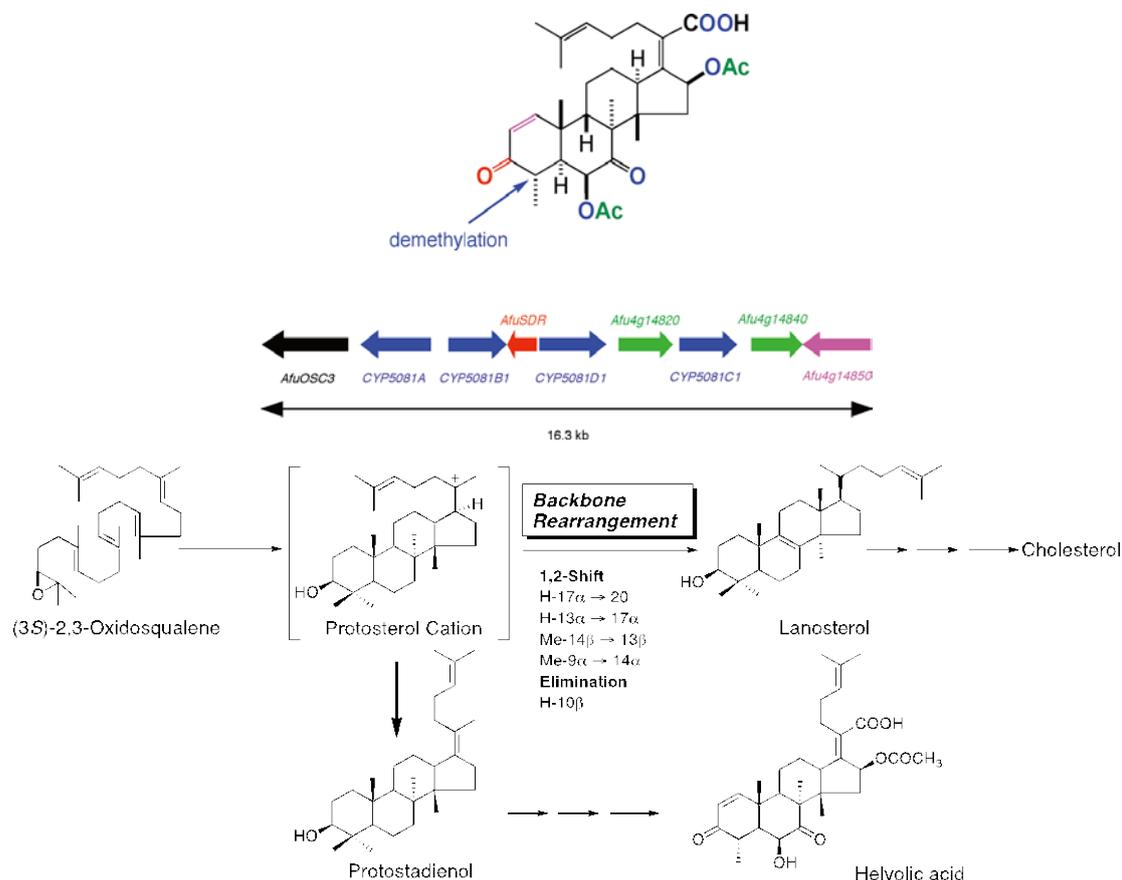


ステロイド系抗生物質ヘルボール酸の生合成遺伝子クラスターの合理的機能改変により非天然型新規抗生物質の創出をめざす

東京大学大学院 薬学系研究科 天然物化学教室
阿部 郁朗

1. はじめに

ヘルボール酸は、タンパク質合成系の延長因子と結合することによりタンパク質合成阻害作用を示すステロイド系抗生物質である。ごく最近、糸状菌 *Aspergillus fumigatus* 由来ヘルボール酸生合成酵素遺伝子クラスターの同定が、東京大学・海老塚豊教授のグループにより報告された (*JACS* 131, 6402, 2009) (下図)。



本研究では、9段階からなる生合成経路のうち、ヘルボール酸の基本骨格を構築するオキシドスクアレン閉環酵素 (OSC) (上図) を中心にとりあげた。OSCは、ステロール及びトリテルペンの生合成において、その多様な基本構造を決定する鍵酵素であり、酵素活性中心構造の微妙な変化により閉環反応の様式が大きく変化することが知られている。オキシドスクアレンをプロトスタジエノールに閉環するOSCの合理的な酵素機能の改変により、非天然型新規ステロイド骨格を構築することができれば、これまでに例のない新規抗生物質の創出も可能になる。それにはまず

本酵素の精密機能解析が必須となる。コレステロール生合成の中間体となるラノステロール合成酵素など、他のOSC酵素との性状の違いを明らかにすることにより、オキシドスクアレン閉環反応とそれに引き続いておこる転位反応の化学を支配する因子の解明をめざした。

2. 方法

天然物の基本骨格を構築する二次代謝酵素の中には、活性部位や基質の微妙な構造の違いで反応様式が劇的に変化するものがあり、これが天然物の分子多様性を生み出す大きな要因になっている。コレステロール生合成の鍵酵素であるラノステロール合成酵素が触媒するオキシドスクアレン閉環反応機構については、これまでによく研究がなされており、X線結晶構造解析により酵素活性中心構造が明らかにされている。しかし、いったんプロトステロールカチオンへ環化した後におこる一連の転位反応のを支配する因子や酵素の構造機能相関などについては、未解決で今後の研究が待たれている。本研究でとりあげる糸状菌のプロトスタジエノール合成酵素が触媒する反応は、ラノステロール合成酵素のそれとは異なり、プロトステロールカチオンへ閉環した後、17位の水素が引き抜かれてシス配置の二重結合を形成して終了する（添付図2）。こうした反応生成物の作り分けは、酵素活性中心の構造のわずかな変化によりもたらされるものと考えられており、従って、ラノステロールとプロトスタジエノール合成酵素の性状の比較を行い、違いを明らかにすることは、一連の閉環・転位反応の化学を支配する因子の解明と、酵素の構造機能相関を考える上で必要不可欠である。

本研究では、まず（1）アミノ酸配列の比較により、本酵素において特徴的な置換がみられる二つの領域¹⁰⁵NDDGPLFVTS¹¹⁴、⁷⁰²APPGGMR⁷⁰⁸に着目し、これをヒト・ラノステロール合成酵素の配列EYGGPLFLLP、NKSCAISにそれぞれ置換した変異酵素を作成して、酵母GIL77株にて異種発現し、酵素活性を詳細に検討した。次に、（2）両酵素のアミノ酸配列の比較およびホモロジーモデリングにより明らかになった、糸状菌由来プロトスタジエノール合成酵素に特徴的な10種の活性中心アミノ酸残基について、それぞれ部位特異的変異酵素を作成した。酵母に異種発現し、生成した組み換え酵素を用いて、その酵素活性や反応生成物を検討することにより、オキシドスクアレン閉環酵素の構造機能相関を明らかにする。

3. 結果

（1）上述した、後者の領域のみを置換した場合、プロトステロール合成能が完全に消失し、代わりにラノステロールを生成物として与えることを確認した。このC末端の領域は、プロトステロールC-20カチオン中心の安定化に寄与するPhe701残基の背後に位置することが予想され、このカチオンの安定化が転位反応の化学を支配する大きな要因となるものと推察された。

（2）糸状菌由来プロトスタジエノール合成酵素に特徴的な10種の活性中心アミノ酸残基に関する部位特異的変異酵素については、現在酵素活性を詳細に検討中である。

今後、アミノ酸の置換により顕著な酵素活性の変化がみられた変異酵素については、その遺伝子をヘルボール酸生合成遺伝子クラスターに組み込み、どのような最終生成物が得られるか検討の予定である。また、酵素立体構造を明らかにするため、ラノステロール合成酵素の結晶化条件を参考に、酵素の結晶化にも着手する。

4. 考察 まとめ

プロトスタジエノールを経て生合成されるヘルボール酸は、タンパク質合成系の延長因子と結合することによりタンパク質合成阻害作用を示す抗生物質である。本研究は医薬品として重要なフシジン酸の生産性の向上や生合成の改変などをはじめとして、酵素の改変による今までにない新しい骨格、生理活性を有するトリテルペンの創製など、医薬品・農薬・食品添加物などに幅広い応用が考えられる。本研究により得られる新規骨格を有する非天然型化合物が、従来の天然物にない優れた活性を示す可能性が大いに期待される。

5. 発表論文

M. Kimura, T. Kushiro, M. Shibuya, Y. Ebizuka, I. Abe*

Protostadienol Synthase from *Aspergillus fumigatus*: Functional Conversion into Lanosterol Synthase

Biochem. Biophys. Res. Commun. **391**, 899-902 (2010)