

氏名（本籍） 木 股 祥 子（愛知県）  
学位の種類 博士（薬科学）  
学位記番号 甲第15号  
学位授与の日付 2018年3月19日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
学位論文題目 **Roseophilin の生合成に関する研究**

論文審査委員 （主査）教授 早川 洋一  
教授 青木 伸 教授 内海 文彰  
教授 羽田 紀康 嘱託教授 望月 正隆

## 論文内容の要旨

Prodigiosin (PG) 類は、3分子のピロールが結合した骨格を有する微生物代謝産物であり、抗菌活性、抗腫瘍活性、免疫抑制活性など様々な生物活性が報告されている。放線菌 *Streptomyces griseoviridis* 2464-S5 が生産する roseophilin (RP) は、PG の中央のピロール環がフラン環に置き換わるとともに、クロル化されたピロール環や2箇所で架橋した環化アルキル側鎖を有するユニークな PG 関連化合物である。また、本菌は単純な環化アルキル側鎖を有する prodigiosin R1 (PGR1) も生産する。一方、本菌において RP と PGR1 の生合成に関与すると考えられる *rph* 遺伝子クラスターが明らかになっているが、クラスター中には4つの環化遺伝子候補が見いだされている。また、RP の特徴であるフラン環形成およびクロル化に関わる遺伝子は現在までのところ発見されていない。そこで、本研究ではこれらの遺伝子の同定をめざした。

第1章では、典型的な PG である undecylprodiginine (UP) 生産菌 *Streptomyces coelicolor* を用いた異種生産により、環化遺伝子 *redG* と相同性を示す *rphG* の機能を解析した。第2章では、RP 生産菌の培養抽出物中から RP 生合成中間体の探索を行い、2つの新たな架橋型 PG を見いだした。第3章では、RP と PGR1 共通の生合成前駆体を生産する *S. coelicolor redP* 破壊株を用いて、4つの環化遺伝子候補の機能を解析した。第4章では、RP 生産菌のゲノム DNA を用いたドラフトゲノム解析により、*rph* クラスター外のクロル化遺伝子を探索した。

## 第1章 Prodigiosin 環化遺伝子 *rphG* の同定

UP およびその環化体である butyl-*meta*-cycloheptylprodiginine (CP) を生産する *S. coelicolor* において、PG 生合成に関わる *red* 遺伝子クラスターとその機能が同定されている。*rph* クラスター中の 25 遺伝子のうち 21 個が *red* 遺伝子と相同性を示しており、このうち *rphG*、*rphG2*、*rphG3*、*rphG4* に UP 環化遺伝子 *redG* との相同性が認められた。そこで、*S. coelicolor* における二次代謝遺伝子発現系を構築し、*rphG*、*rphG2*、*rphG3*、*rphG4* を *S. coelicolor* 中で発現させることにより、これらの生合成遺伝子の機能を解析した。

*S. coelicolor*  $\Delta redG$  株は CP 非生産となるが、この  $\Delta redG$  株に再び *redG* を導入すると、CP の生産が回復した。次に、*S. coelicolor*  $\Delta redG$  株に *rphG2*、*rphG3*、*rphG4* の 3 遺伝子を導入したところ、UP 以外の代謝産物は検出されなかった。一方、*rphG* を導入した  $\Delta redG$  株は、CP と異なる 2 つの環化 PG を生産した。NMR 解析により、その主成分を UP 環化体 metacycloprodiginosin (MCP) と同定した。また、副成分を新規 UP 環化体である propyl-*meta*-cyclooctylprodiginine (PCP) と決定した。MCP はアルキル側鎖が PGR1 と同じ 12 員環構造をとっており、ピロール環上の結合位置も同じであることから、*rphG* は 11-methyldodecylprodiginine (MDP) を環化して PGR1 を生成する遺伝子であると考えられる。

## 第2章 Roseophilin 生合成中間体の探索

RP 生産菌から、RP と PGR1 以外に dechlororoseophilin (DRP) が単離されているが、他の PG 関連化合物は見いだされていない。そこで、RP の生合成に関してさらなる知見を加えることを目的として、RP 生産菌培養物から RP 生合成中間体を探索した。*S. griseoviridis* 2464-S5 の培養抽出物を HPLC 分析したところ、RP、PGR1、DRP のピークに加えて、MDP のピークが検出された。しかし、培養条件を変化させても、これら以外のピークはほとんど見いだされなかった。一方、DRP に由来すると考えられるピークは、単離された DRP から予測されるピーク面積よりはるかに大きく、このフラクションに未知の PG 類が含まれている可能性が示唆された。そこで、RP 生産菌の培養菌体から得られた酢酸エチル抽出物をシリカゲルカラムで分画し、各分画を HPLC と TLC で分析したところ、HPLC において DRP と同じ保持時間を示す 2 つの未知 PG 類の存在が明らかになり、prodigiosin R2 (PGR2) および prodigiosin R3 (PGR3) と命名した。PGR2 および PGR3 の分子式は、高分解能 FAB-MS により、それぞれ  $C_{27}H_{35}N_3O$  および  $C_{27}H_{33}N_3O$  と決定した。また、2 次元 NMR を含む種々の NMR スペクトル解析により、PGR2 は 2 箇所、PGR3 は 3 箇所架橋した環化アルキル側鎖を有する PG であることが明らかになった。

PGR2 は RP と側鎖の架橋位置が同じであることから、RP の生合成中間体である可能性が示唆された。

### 第3章 Prodigiosin のアルキル側鎖架橋に関わる遺伝子の同定

UP 生産菌である *S. coelicolor*  $\Delta redG$  株を用いた研究では、PG 環化遺伝子と相同性を有する *rphG2*、*rphG3*、*rphG4* の機能解明には至らなかった。これは、*S. griseoviridis* が生産する PG 類共通の生合成前駆体は MDP であり、UP ではないことが原因と考えられる。一方、*S. coelicolor* の *redP* 破壊株は UP に加えて MDP を生産することが報告されている。そこで、RP 生産菌の PG 環化遺伝子候補の機能を解析するために、*S. coelicolor*  $\Delta redG \Delta redP$  株を作製した。MDP の生産が確認された  $\Delta redG \Delta redP$  株に *rphG2*、*rphG3*、*rphG4* の 3 遺伝子を導入したところ、新たな代謝産物は検出されなかったが、*rphG*、*rphG2*、*rphG3*、*rphG4* の 4 遺伝子を導入した  $\Delta redG \Delta redP$  株の培養抽出物を HPLC 分析したところ、DRP、PGR2、PGR3 と同じ保持時間を示すピークが検出された。この化合物は TLC 分析および高分解能 ESI-MS による解析の結果から、PGR2 および PGR3 であることが明らかになった。このことから、RP 生産菌において、*rphG*、*rphG2*、*rphG3*、*rphG4* が協調し、アルキル鎖の多重架橋を形成することが示唆された。

### 第4章 Roseophilin 生合成におけるクロル化遺伝子の探索

RP 生合成に関与する *rph* 遺伝子クラスター中には、RP の特徴であるクロル化に関わる遺伝子は見いだされていない。そこで、クロル化遺伝子が *rph* 遺伝子クラスター外にある可能性を考え、RP 生産菌のゲノム DNA を用いたドラフトゲノム解析によりクロル化遺伝子を探索した。その結果、クロル化遺伝子の候補として、*formaomycin* 生合成に関わる  $FADH_2$  依存性ハログナーゼ遺伝子 *hrmQ* と相同性を有する *orf16-3* が *rph* クラスター外に見いだされた。次に、大腸菌に生産させた ORF16-3 および大腸菌フラビンレダクターゼ Fre を用いて DRP のクロル化を試みたが、新たな反応生成物は認められなかった。続いて、*S. coelicolor* に *orf16-3* 遺伝子を含む領域を導入し、培養抽出物を分析したが、新たな代謝産物は検出されなかった。また、*orf16-3* 遺伝子を導入した *S. coelicolor* に DRP を供給しても、代謝産物に変化は認められなかった。

### 総括

第 1 章では、*rphG* を導入した *S. coelicolor* の培養物中から 2 つの PG 環化体を単離した。このうち、主成分を UP 環化体 MCP、副成分を UP 環化体である新規化合物 PCP と決定し、*rphG* を PG のアルキル鎖環化遺伝子と同定した。第 2 章では、RP 生産菌の培養

抽出物中から、RPと同様に2箇所であ橋した環化アルキル側鎖を有するPGR2、および3箇所であ橋した環化アルキル側鎖を持つPGR3を単離し、構造決定した。第3章では、RP生合成前駆体MDPを生産する*S. coelicolor*  $\Delta redG \Delta redP$ 株に *rphG*, *rphG2*, *rphG3*, *rphG4*の4遺伝子を導入し、新たに生産されたPGをPGR2およびPGR3と同定した。この結果から、*rphG*, *rphG2*, *rphG3*, *rphG4*がPGアルキル側鎖の多重架橋形成に関わる遺伝子であることが示された。第4章では、RP生産菌のゲノムDNAを用いたドラフトゲノム解析により、RP生合成におけるクロル化遺伝子候補 *orf16-3*を見いだした。

本研究では、興味深い構造と活性を有するRPの生合成において、特にアルキル鎖のユニークな環化パターンに着目し、環化遺伝子を同定するとともに、異種発現や生合成中間体探索の過程で、3つの新規PG類を見いだしている。本研究で達成された生合成に関する新たな知見とPG類の化合物多様性拡大は、今後のPG類生合成ひいては微生物二次代謝の研究に大きく貢献することが期待される。

## 論文審査の結果の要旨

Prodigiosin (PG) 類は、3分子のピロールが結合した骨格を有する微生物代謝産物であり、抗腫瘍活性をはじめとする様々な生物活性が報告されている。放線菌 *Streptomyces griseoviridis* 2464-S5が生産するroseophilin (RP)は、PGの中央のピロール環がフラン環に置き換わるとともに、クロル化されたピロール環や2箇所であ橋した環化アルキル側鎖を有するユニークなPG関連化合物である。また、本菌は単純な環化アルキル側鎖を有するprodigiosin R1 (PGR1)も生産する。一方、本菌においてRPとPGR1の生合成に関与すると考えられる*rph*遺伝子クラスターが明らかになっており、クラスター中には4つの環化遺伝子候補が見いだされている。また、RPの特徴であるフラン環形成およびクロル化に関わる遺伝子は現在までのところ発見されていない。そこで、本研究ではこれらの遺伝子の同定をめざした。

まず第1章では、PG生産菌 *Streptomyces coelicolor*を用いた異種生産により、RP環化遺伝子候補の機能を解析した。Undecylprodiginine (UP)およびその環化体であるbutyl-*meta*-cycloheptylprodiginine (CP)を生産する*S. coelicolor*において、PG生合成に関わる*red*遺伝子クラスターが同定されているが、*rphG*, *rphG2*, *rphG3*, *rphG4*がUP環化遺伝子*redG*と相同性を示した。*S. coelicolor*  $\Delta redG$ 株に*rphG2*, *rphG3*, *rphG4*の3遺伝子を導入したところ、UP以外の代謝産物は検出されなかったが、*rphG*を導入すると、CPと異なる2つの環化PGを生産した。NMR解析により、その主成分をUP環化体metacycloprodigiosin (MCP)、副成分を新規UP環化体propyl-*meta*-cyclooctylprodiginine (PCP)と決定した。MCPはアルキル側鎖がPGR1

と同じ 12 員環構造をとっており、ピロール環上の結合位置も同じであることから、*rphG* は 11-methyldodecylprodiginine (MDP) を環化して PGR1 を生成する遺伝子であると考えられる。

続いて第 2 章では、新たな RP 生合成中間体の探索を行った。*S. griseoviridis* 2464-S5 の培養抽出物を HPLC 分析したところ、RP、PGR1、MDP、dechlororoseophilin (DRP) のピークが検出されたが、ピーク面積から、DRP 由来ピークに未知の PG 類が含まれている可能性が示唆された。そこで、RP 生産菌の培養菌体抽出物をシリカゲルカラムで分画し、HPLC と TLC で分析したところ、2 つの未知 PG 類の存在が明らかになり、prodigiosin R2 (PGR2) および prodigiosin R3 (PGR3) と命名した。PGR2 および PGR3 は、高分解能 FAB-MS および 2 次元 NMR スペクトル解析により、PGR2 は 2 箇所、PGR3 は 3 箇所、架橋した環化アルキル側鎖を有する新規 PG であることが明らかになった。PGR2 は RP と側鎖の架橋位置が同じであることから、RP の生合成中間体である可能性が示唆された。

さらに第 3 章では、*S. coelicolor redP* 破壊株を用いて 4 つの環化遺伝子候補の機能を解析した。*S. griseoviridis* が生産する PG 類共通の生合成前駆体は MDP であると推定されるが、*S. coelicolor* の *redP* 破壊株は MDP を生産することが報告されている。そこで、*S. coelicolor ΔredG ΔredP* 株を作製し、MDP の生産を確認した。この *ΔredG ΔredP* 株に *rphG2*、*rphG3*、*rphG4* の 3 遺伝子を導入したところ、新たな代謝産物は検出されなかったが、*rphG*、*rphG2*、*rphG3*、*rphG4* の 4 遺伝子を導入した *ΔredG ΔredP* 株の培養抽出物を HPLC 分析したところ、DRP と同じ保持時間を示すピークが検出された。この化合物は TLC 分析および高分解能 ESI-MS による解析の結果から、PGR3 であることが明らかになった。このことから、RP 生産菌において、*rphG*、*rphG2*、*rphG3*、*rphG4* が協調して PG アルキル側鎖の架橋形成を担うことが示唆された。

最後に第 4 章では、RP 生産菌のゲノム DNA を用いたドラフトゲノム解析により、*rph* クラスター外のクロル化遺伝子を探索した。その結果、クロル化遺伝子の候補として、hormamycin 生合成に関わる FADH<sub>2</sub> 依存性ハログネナーゼ遺伝子 *hrmQ* と相同性を有する *orf16-3* を *rph* クラスター外に見いだした。

本研究では、興味深い構造と活性を有する RP の生合成において、特にアルキル鎖のユニークな環化パターンに着目し、環化遺伝子を同定するとともに、異種発現や生合成中間体探索の過程で、3 つの新規 PG 類を見いだしている。本研究で達成された生合成に関する新たな知見と PG 類の化合物多様性拡大は、今後の PG 類生合成ひいては微生物二次代謝の研究に大きく貢献することが期待される。よって本論文は、博士（薬科学）の学位論文として十分に価値あるものと認められる。