

## チオアセタール形成酵素—折りたたまれたエキノマイシン—

佐藤 道大, 渡辺 賢二

### 1. はじめに

キノマイシン系抗生物質エキノマイシン (図 1A の化合物 1) は, 放線菌 *Streptomyces lasaliensis* から単離された  $C_2$  対称<sup>\*1</sup> のデプシペプチド化合物<sup>\*2</sup> である. エキノマイシンの骨格には 2 分子のキノキサリン<sup>\*3</sup> が含まれており, このキノキサリン分子が DNA の二本鎖にインターカレートすることで抗腫瘍活性などの生物活性を示す. この化合物の特徴は, 数多くの天然物において類をみないチオアセタール構造<sup>\*4</sup> を有することである. これまでの研究により, *ecm1*~*ecm18* (echinomycin biosynthetic genes: *ecm*, エキノマイシン生合成遺伝子) を含む全長 46 kbp からなる生合成遺伝子クラスターが, エキノマイシン生合成を担うことが報告されている. チオアセタール構造の形成は, その中の二つの酵素, *Ecm17* および *Ecm18* により触媒される. まず FAD 依存的酸化酵素 *Ecm17* によって, 二つのシステイン残基がジスルフィド結合を形成しトリオスチン A (図 1A の化合物 2) が生成する. 次いで, メチル基転移酵素 *Ecm18* により, メチル基導入と同時にチオアセタール構造が形成される. 今回我々は, これら二つの酵素の機能解析を行ったので報告する.

### 2. キノマイシン系抗生物質

放線菌が生産する, キノキサリンやキノリン類をクロモフォア<sup>\*5</sup> として有し, 非リボソーム依存性ペプチド合成酵素 (non-ribosomal peptide synthetase: NRPS) によって生合成される  $C_2$  対称の環状デプシペプチド化合物をキノマイシン系化合物と総称する<sup>1)</sup>. エキノマイシン (1), トリオスチン A (2), チオコラリンやサンドラマイシンなどといった数多くの類縁体がこれまでに報告されている (図 1

A). キノマイシン系化合物は, グラム陽性菌に対する抗菌活性, および強い抗腫瘍活性を有する. このような活性は, 二つのクロモフォアが二本鎖 DNA ヘインターカレートし, DNA の転写 (DNA 依存的 RNA ポリメラーゼ) が抑制されることで生じると考えられている. このクロモフォアおよびアミノ酸の種類によりインターカレートする DNA の配向性が変化し, その生物活性が多様化する. たとえば, チオコラリンなどは DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  の阻害活性を有し, またサンドラマイシンは HIV-1 逆転写酵素の阻害活性を有することが知られている<sup>2,3)</sup>.

### 3. エキノマイシンの生合成

1957 年に *Streptomyces echinatus* から単離された初めてのキノマイシン系化合物がエキノマイシンである<sup>4)</sup>. 同一放線菌からこれまでにキノマイシン B および C も単離されている (図 1A). エキノマイシンはキノキサリン, L-アラニン, L-システイン, D-セリンおよび L-バリンから構成されており, その二つのシステイン残基由来のチオアセタール構造が最大の特徴である. エキノマイシンの生合成に関しては, 標識アミノ酸の取り込み実験から, L-トリプトファンからキノキサリン骨格が形成され, D-セリンは L-セリンがエピマー化し導入されていることが明らかにされていた<sup>5)</sup>. またチオアセタール結合の構築に関しては, [<sup>35</sup>S] 標識トリオスチン A の取り込み実験により, [<sup>35</sup>S] 標識エキノマイシンの生成が確認されたことから, エキノマイシンはジスルフィド体であるトリオスチン A から形成されることが示唆されていた<sup>6)</sup>. 2006 年筆者らは, エキノマイシンおよびトリオスチン A の生産菌である *Streptomyces lasaliensis* よりその生合成遺伝子クラスターを単離した. 18 個の ORF (open reading frame) から構成される

静岡県立大学薬学部生薬・天然物化学分野 (〒444-8526 静岡県静岡市駿河区谷田 52-1)

Detailed reaction mechanism of thioacetal forming enzyme, *Ecm18*

Michio Sato and Kenji Watanabe (School Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1, Yada, Suruga-ku, Shizuoka city, Shizuoka 444-8526, Japan)

\*1 任意の軸に対して分子を回転させたとき 180° で元の構造と一致する対称性のこと.

\*2 ペプチド系化合物においてペプチド結合のほかエステル結合を含むペプチド系化合物.

\*3 ベンゼンとピラジンの結合した化合物.

\*4 硫黄原子のアセタール結合 (-S-C-S- の構造を有する).

\*5 紫外線を吸収する原子群. 発色団.

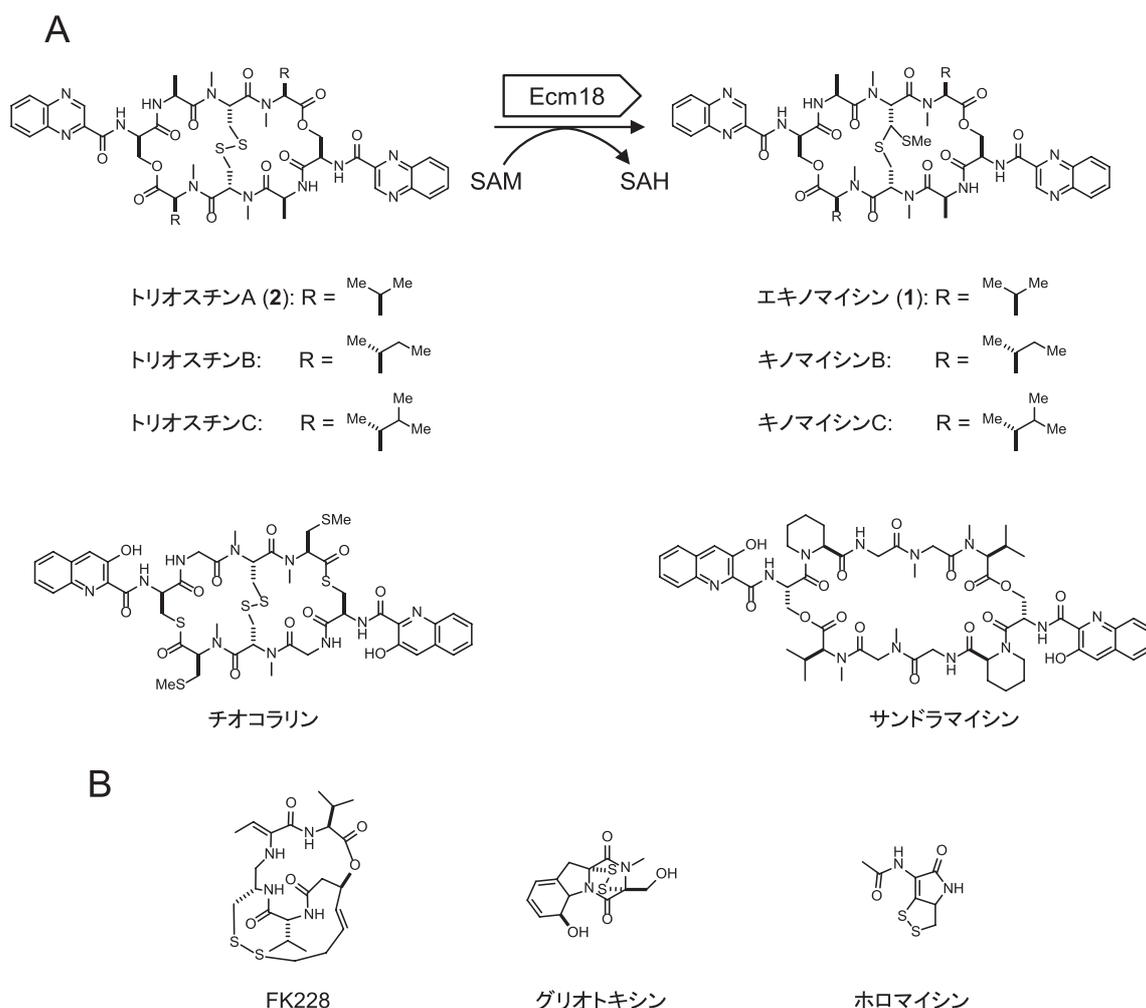


図1 キノマイシン類およびジスルフィド結合を有する化合物の構造

(A) Ecm18によるトリオスチンA(2)からエキノマイシン(1)への変換。化合物1, 2およびその類縁体の構造。(B) ジスルフィド結合を有する天然有機化合物の構造。

全長 46 kbp の遺伝子クラスターであり (図 2A), 酵素の予想機能からエキノマイシン類の生合成経路を図のように予想した (図 2B)<sup>7)</sup>。まずクロモフォアのキノキサリン-2-カルボン酸は Ecm2, 3, 4, 8, 11, 12, 13 および 14 により生合成され, Ecm1 でアデニル化される。アデニル化された後, 脂肪酸生合成に関わるタンパク質 FabC とチオエステル交換により結合する。このキノキサリンを開始基質として NRPS である Ecm6 および 7 により順次ペプチド鎖が伸長する。キノキサリンおよび四つのアミノ酸から伸長したペプチド鎖が二量化し, Ecm7 のチオエステラーゼドメインによる切離しとラクトン環の形成が一挙に進行し, 環状デプシペプチドが生成する<sup>8)</sup>。筆者らは, それら全生合成遺伝子を大腸菌に異種発現することによりエキノマイシンの生物全合成を達成し, 本遺伝子クラスターがエキノマイシン生合成遺伝子クラスターであることを証明した<sup>7)</sup>。しかしながら, トリオスチン A のジスルフィド結合形成

およびエキノマイシンのチオアセタール形成における詳細なメカニズムは明らかにされておらず, 今回それら酵素の機能解析を行うこととした。

#### 4. ジスルフィド結合形成酵素 Ecm17

天然には, FK228 やグリオトキシシン, ホロマイシン (図 1B) など, ジスルフィド結合を有する低分子化合物が存在している。最近, これら化合物のジスルフィド結合を触媒する酵素の機能が報告された<sup>9-11)</sup>。FK228, グリオトキシシンおよびホロマイシンのジスルフィド結合生成酵素はそれぞれ FAD 依存的酸化酵素と同性を有する DepH, GlIT および HImI と推定されていた。その機能は *in vitro* 反応によって確かめられ, それぞれの化合物の二つのチオール基を酸化し, ジスルフィド結合を形成することが明らかとなった。エキノマイシン生合成クラスターには, これら

DepH, GliT および HlmI と高い相同性を有する酵素 Ecm17 が存在する。このことから本酵素が、システイン残基由来のチオール基のジスルフィド結合を触媒していることが推定された。そこで、Ecm17 の大腸菌由来組換えタンパク質を調製し、還元したトリオスチン A を用いて *in vitro* 反応を試みた。その結果、Ecm17 は速やかにトリオスチン A を生成することが明らかとなり、DepH などの酸化酵素と同様の活性を有することがわかった。また、これらジスルフィド結合を触媒する酵素がどの程度基質を許容するか調べるために、GliT の組換えタンパク質を調製し、Ecm17 と同様にトリオスチン A の還元体を基質として *in vitro* 反応に供した。その結果、GliT は Ecm17 とほぼ同程度の酸化活性を示した。これまでの報告によると、グリオトキシシン生成酵素 GliT は、活性は落ちるもののホロマイシン前駆体のホロマイシン還元体を酸化することも示されている<sup>11)</sup>。分子量が 200 程度のホロマイシンおよび 1000 以上のトリオスチン A という構造や大きさが極端に異なる分子にも関わらず、これらの酵素は同様の活性を示すことから、Ecm17 を含むチオール基酸化酵素の基質特異性は非常に低いことが明らかとなった。このことから、その活性中心（二つのシステイン残基）は酵素の内側に存在しているのではなく、外側に配位していることが示唆された<sup>12)</sup>。

## 5. チオアセタール形成酵素 Ecm18

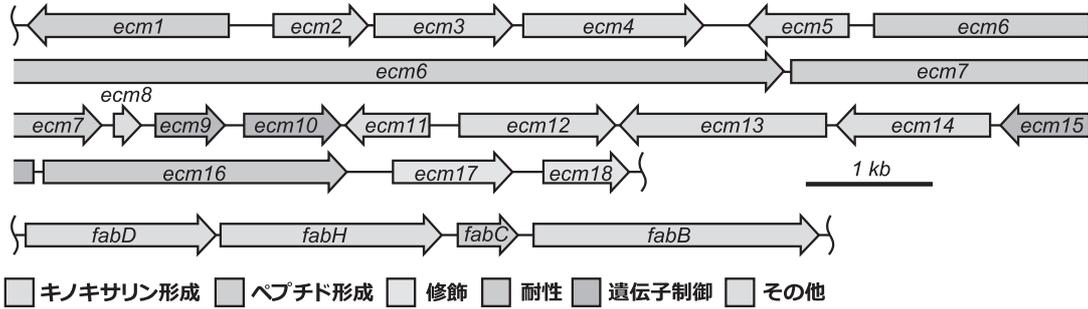
エキノマイシンの生合成遺伝子クラスターにおいて、チオアセタール結合を触媒する酵素を探索した結果、*S*-アデノシルメチオニン依存性メチル基転移酵素 (*S*-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase : SAM-MTase), Ecm18 が推定された。先述したように、エキノマイシンの前駆体はトリオスチン A であると考えられたため、組換えタンパク質 Ecm18 およびトリオスチン A を *in vitro* 反応に供したところ、エキノマイシンの生成を確認した<sup>7)</sup>。このチオアセタールの形成メカニズムを、次のように推測した (図 2C)。チオアセタール形成反応には、二つのステップがあると考えられる。第 1 ステップでは、ジスルフィド結合を形成している硫黄原子からの SAM のメチル基への求核攻撃により、メチルスルホニウムカチオンが生成する。第 2 ステップでは、このスルホニウムカチオンに結合するメチレンのプロトンが引き抜かれることにより、スルホニウムイリドが形成される。続いてこのスルホニウムイリドのカルボアニオンがもう一つの硫黄原子へ求核攻撃し、三員環の遷移状態を経てチオアセタール結合が形成される。我々は、メチル基転移酵素がチオアセタール結合の形成という特異な反応を触媒することに興味を持ち、そのメカニズム解明を目指した。まず、タンパク質 Ecm18 の結晶化

を試みたが、基質であるトリオスチン A との共結晶はもちろん酵素単独での結晶も得られなかった。しかし幸運にも酵素の反応後産物であるエキノマイシンおよび *S*-アデノシル-L-ホモシステイン (*S*-adenosyl-L-homocystein : SAH) をリガンドとして加えた場合にのみタンパク質の結晶を得ることができた。得られた結晶を X 線結晶構造解析に供したところ、1.5 Å の高分解能で回折像を得ることに成功した。

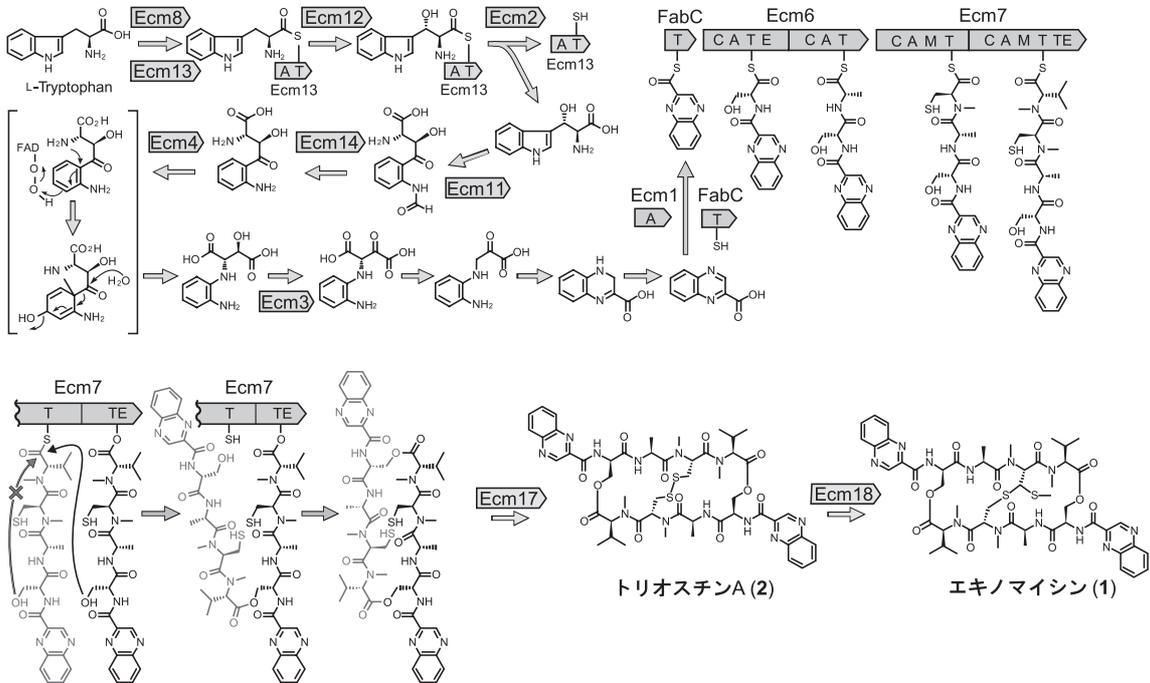
SAM 結合ドメインと基質結合ドメインがはっきりと区分されている SAM-MTase は Class I に分類される。Ecm18 は Class I の SAM-MTase であり、Class I の SAM-MTase の一つ、ラット由来カテコールメチル基転移酵素 (catechol *O*-MTase : COMT) と比較すると、タンパク質の構造、SAM およびリガンド結合部位に対して非常に高い相同性を持つことが明らかとなった (図 3A-a)。N 末端側に SAM 結合ドメインが、C 末端側に基質結合ドメインが構成されており、この構成がさまざまな基質を許容するためのループ構造を形成している。

Ecm18 において、SAH は SAM 結合ドメインに結合しており、そのリボース残基は  $\beta 1$  鎖と  $\alpha A$  ヘリックスを連結するループ (GxGxG, スクレオチド結合モチーフ) に固定されている (図 3A-b)。また  $\beta 2$  鎖の C 末端側のアスパラギン酸 (D68) は、リボースのヒドロキシ基と水素結合を生じている。多くのメチル基転移酵素では、SAM の側鎖カルボン酸は結合ポケットにおけるアミノ酸側鎖 (アルギニン側鎖など) と結合しているが、Ecm18 における SAH のカルボン酸はどのアミノ酸とも結合せず、タンパク質に内在する水分子と強固に水素結合を形成していることが明らかとなった (図 3A-b)。また Ecm18 のエキノマイシン結合ドメインは、N 末端側の  $\alpha Y$  ヘリックス、 $\beta 4$  および  $\alpha D$  にはさまれた  $3_{10}$  ヘリックスの  $\eta 1$ 、 $\alpha 2$  ヘリックス、 $\alpha 2$  および  $\alpha E$  ヘリックスのループ部分、 $\beta 6$  および  $\beta 7$  鎖により構成されていた (図 3A-a)。SAH は Ecm18 といくつもの強固な水素結合により、安定的に保持されている。一方、エキノマイシンと Ecm18 の間には、二つの水素結合しか観測されない (Q153 側鎖のアミノ基とキノキサリンのカルボニル酸素、および Q153 側鎖のカルボニル酸素とエキノマイシンのアラニン残基のカルボニル酸素の水分子を介した水素結合、図 3A-c)。このことから Ecm18 の基質結合特異性は、水素結合による安定化というより、酵素の基質結合ポケットにエキノマイシンの構造が“密に収まる”ことで生じていることが示唆された (図 3A-d)。またエキノマイシン類のバリン残基部分は、これまで発見されているキノマイシン系化合物において最も構造が多様化している部分である。N-メチル-L-アロイソロイシンや N,  $\gamma$ -ジメチル-L-アロイソロイシンなどに置き換わった化合物が報告されている (図 1A)。興味深いことに、このバリン

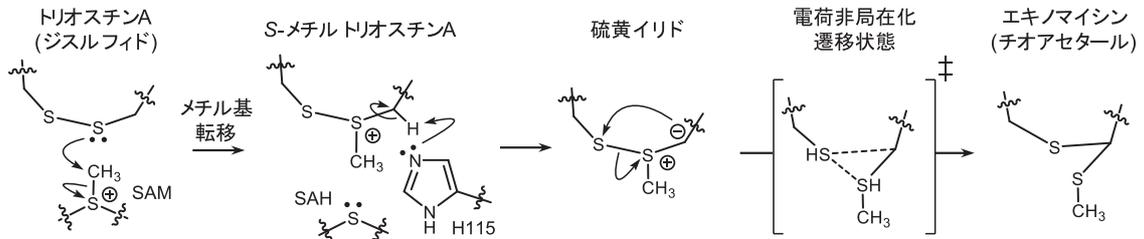
A



B



C



**図2** エキノマイシン生成経路の概略。(A) 化合物1の生成経路の遺伝子クラスターの模式図。(B) 化合物1の生成経路の概略。(C) チオアセタール結合形成の推定メカニズム。

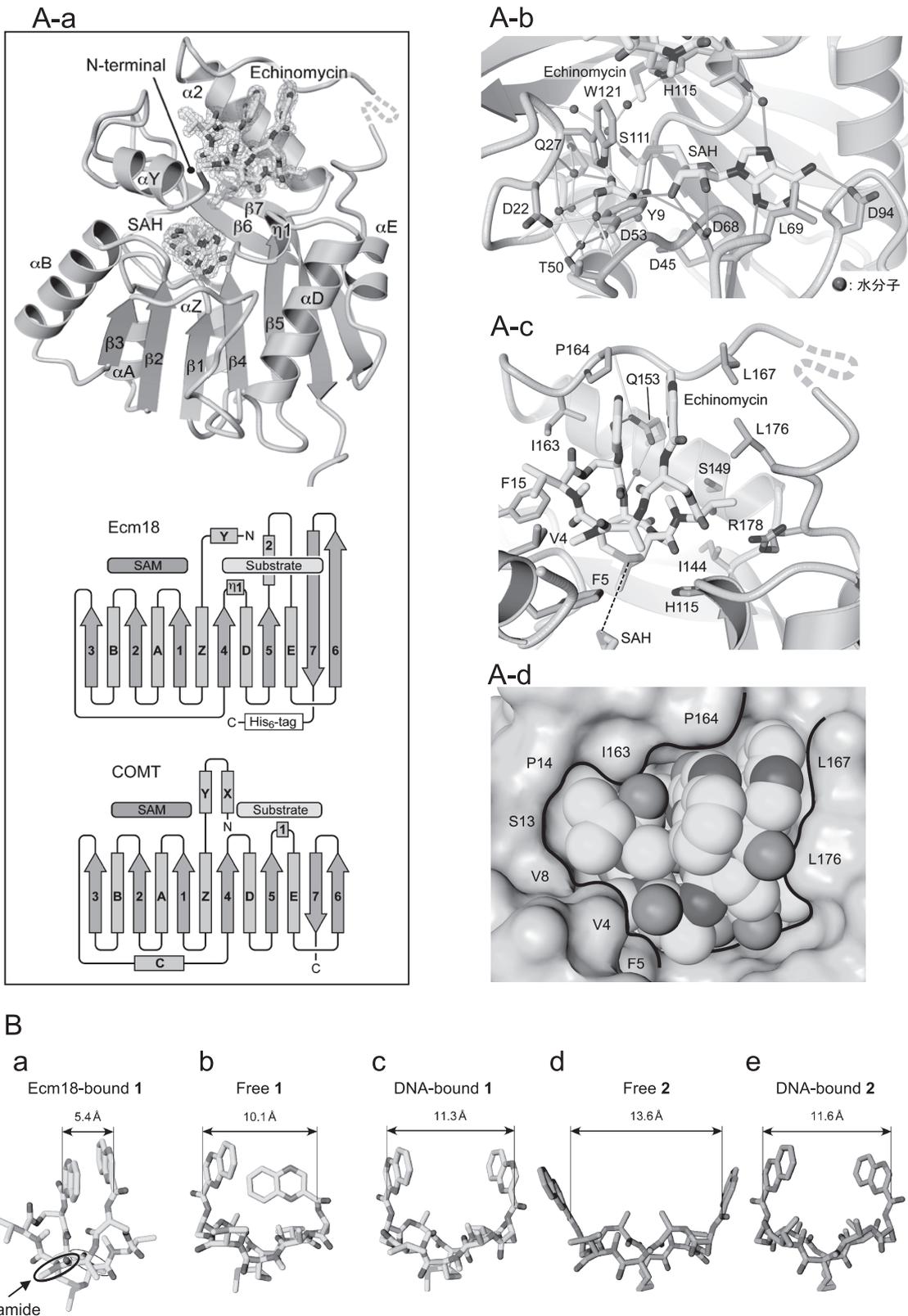


図3 Ecm18 およびエキノマイシンの X 線結晶構造解析

(A-a) Ecm18-エキノマイシン-SAH 複合体の X 線結晶構造全体図。(A-b) Ecm18-エキノマイシン-SAH 結合部位拡大図。(A-c) Ecm18-エキノマイシン結合部位拡大図。(A-d) Ecm18-エキノマイシン結合部位の空間充填モデル図。(B-a) エキノマイシン (化合物 1) の Ecm18 結合型, (B-b) 非結合型, (B-c) DNA 結合型, (B-d) トリオスチン A (化合物 2) の非結合型, (B-e) および DNA 結合型の X 線結晶構造解析図。(B-a) の○印は *cis* 型のアミド結合を示す。

残基周辺の結合ポケットは、トリオスチンCやキノマイシンCの有するかさ高いN,γ-ジメチル-L-アロイソロイシンをも受け入れられるように形成されており、Ecml8は広い基質特異性を有していることが示唆される。これがEcml8によりすべてのトリオスチン類が対応するエキノマイシン類へ変換される要因であると考えられる。

また驚くべきことは、共結晶中のエキノマイシンの構造であり、Ecml8の活性部位に非常に小さく折りたたまれて存在していることが明らかとなった(図3B-a)。これまで、エキノマイシンやトリオスチンAは単独結晶およびDNAとの共結晶が得られており、その構造が明らかにされている(図3B)。二つのクロモフォアの距離は、そのすべての構造において10 Å以上離れたコンホメーションをとる。一方、Ecml8の活性部位においては、その距離が5.4 Åと極端に狭いコンホメーションをとることが今回明らかとなった。このコンホメーションをとることができる要因は、活性部位の空間構造とキノキサリクロモフォアのπ-π相互作用による安定化のためと考えられる。

通常メチル基を転移するには、求核剤となる炭素や窒素、および酸素原子を脱プロトン化し活性化する必要がある。しかし、ジスルフィド結合の場合、荷電子数の多い硫黄原子においてはそのような活性化は必要がなく、第1ステップのメチル基転移反応はSAMと基質が近接していれば進行していくものと考えられる。実際、SAHとエキノマイシンは非常に近い距離に位置している(図3A-c点線)。またチオアセタール形成の第2ステップにおける、メチレンプロトンの引き抜きには、115番目のヒスチジン残基が関与すると考えられる(図3A-c)。

エキノマイシンおよびトリオスチンAのX線結晶構造から、エキノマイシンよりも開いた構造をとるトリオスチンAの方がより自由度が大きく(図3B-bとd)、エネルギーが高い。そのため、Ecml8の活性部位にトリオスチンAを固定するにはエキノマイシンよりも高いエネルギーが必要であると考えられる。また、ジスルフィド構造よりもチオアセタール構造の方が“固い”結合であり、結合の距離も短いため安定な構造である。このエネルギー差が、第2ステップのプロトンの引き抜きからイリド形成およびチオアセタール結合形成への駆動力となり、反応を終結させている<sup>13)</sup>。

## 6. おわりに

チオアセタール構造を有する天然物は、キノマイシン系

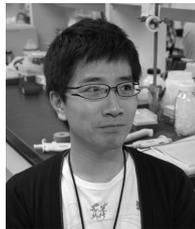
化合物以外にはほとんど報告例がない。先行研究によりエキノマイシンはトリオスチンAよりも強い生物活性を有することが明らかとなっている。またエキノマイシンの類縁体であるSW-163類において、チオアセタール結合を有するSW-163Eの抗腫瘍活性はジスルフィド結合を有するSW-163Cと比較して、100倍以上強いことも示されている<sup>14)</sup>。このことからチオアセタール構造は生物活性に重要であり、この活性の差を生み出す要因は、チオアセタール構造によるコンホメーションの安定化にあると考えられている。今回、我々はジスルフィドおよびチオアセタール結合の構築について研究を行い、その詳細なメカニズムの解明に成功した。これら酵素を利用することで、新たなキノマイシン系化合物の創製につながることを期待される。

- 1) Dawson, S., Malkinson, J.P., Paumier, D., & Searcey, M. (2007) *Nat. Prod. Rep.*, 24, 109-126.
- 2) Erba, E., Bergamaschi, D., Ronzoni, S., Faretta, M., Taverna, S., Bonfanti, M., Catapano, C.V., Faircloth, G., Jimeno, J., & D'Incalci, M. (1999) *Br. J. Cancer*, 80, 971-980.
- 3) Boger, D.L., Chen, J.-H., Saionz, K.W., & Jin, Q. (1998) *Bioorg. Med. Chem.*, 6, 85-102.
- 4) Corbaz, R., Ettliger, L., Gaumann, E., Keller-Schierlein, W., Kradolfer, F., Neipp, L., Prelog, V., Reusser, P., & Zahner, H. (1957) *Helv. Chim. Acta*, 40, 199-204.
- 5) Yoshida, T. & Katagiri, K. (1969) *Biochemistry*, 8, 2645-2651.
- 6) Cornish, A., Waring, M.J., & Nolan, R.D. (1983) *J. Antibiol.*, 36, 1664-1670.
- 7) Watanabe, K., Hotta, K., Praseuth, A.P., Koketsu, K., Migita, A., Boddy, C.N., Wang, C.C., Oguri, H., & Oikawa, H. (2006) *Nat. Chem. Biol.*, 8, 423-428.
- 8) Koketsu, K., Oguri, H., Watanabe, K., & Oikawa, H. (2008) *Chem. Biol.*, 15, 818-828.
- 9) Wang, C., Wesener, S.R., Zhang, H., & Cheng, Y.Q. (2009) *Chem. Biol.*, 16, 585-593.
- 10) Scharf, D.H., Remme, N., Heinekamp, T., Hortschansky, P., Brakhage, A.A., & Hertweck, C. (2010) *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 10136-10141.
- 11) Li, B. & Walsh, C.T. (2011) *Biochemistry*, 16, 585-593.
- 12) Sato, M., Nakazawa, T., Tsunematsu, Y., Hotta, K., & Watanabe, K. (2013) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 17, 537-545.
- 13) Hotta, K., Keegan, R.M., Ranganathan, S., Fang, M., Bibby, J., Winn, M.D., Sato, M., Lian, M., Watanabe, K., Rigden, D.J., & Kim, C.Y. (2013) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, in press. (DOI: 10.1002/anie.201307404)
- 14) Kurosawa, K., Takahashi, K., & Tsuda, E. (2001) *J. Antibiol.*, 54, 615-621.

---

 著者寸描

## ●佐藤道大 (さとう みちお)



静岡県立大学薬学部特任助教。博士（農学）。

■略歴 1983年沖縄県に生る。2006年北海道大学農学部卒業。10年日本学術振興会特別研究員（DC2）。11年北海道大学大学院博士課程修了。同年静岡県立大学薬学部客員共同研究員。12年より現職。

■研究テーマ 放線菌や糸状菌の二次代謝産物の生合成研究。

■趣味 魚を見ること、釣ること、食べること。

## ●渡辺賢二 (わたなべ けんじ)



静岡県立大学薬学部准教授。博士（農学）。

■略歴 1969年北海道稚内市に生る。96年北海道大学農学部卒業。98年同大学院農学研究科博士前期課程修了。同年日本学術振興会特別研究員（DC1）（北海道大学）。2000年同大学院農学研究科博士後期課程修了。農学博士（北海道大学）。同年米国ウイスコンシン大学マディソン校薬学部博士研究員。日本学術振興会特別研究員（PD）（ウイスコンシン大学）。01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。03年北海道大学大学院農学研究科応用生命科学専攻助手。04年米国南カリフォルニア大学薬学部 Senior Research Associate。06年米国南カリフォルニア大学薬学部 Research Assistant Professor。08年北海道大学大学院理学研究院化学専攻特任助教。同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。09年～静岡県立大学薬学部准教授。

■研究テーマと抱負 生物のゲノム情報を活用した有用天然物生合成機構の解明および生物合成。新しい天然物を上手に見つける方法を考案したい。

■ホームページ <http://www015.upp.so-net.ne.jp/kenji55-lab/>

■趣味 実験室の掃除、特に不要なモノを捨てること。