

# Pentayne 構造を持つ史上最長細菌ポリイン類の創製と探索研究

甲斐 建次

大阪公立大学大学院 農学研究科

## 研究の目的

末端から連続した炭素-炭素三重結合 ( $C\equiv C$ ) を有する「細菌ポリイン類」は、抗真菌・抗卵菌・殺線虫活性などの強い生物活性を有する天然物である。ポリイン構造を持つ天然物の中には、実際に医薬・伝統薬・健康増進栄養剤として使用されているものもある。つまり、細菌ポリイン類は、化学・生物学といった学術だけでなく産業上も、魅力のある化合物群である。しかし、これまでに細菌ポリイン類は 5 クラスしか見つかっておらず、tetrayne 構造を持つ protegenin 類と caryoynencin 類が最長ポリイン ( $C\equiv C$  の繰り返し数が 4) となっている<sup>1,2)</sup>。我々が中心となり、新規細菌ポリイン類の発見と生合成研究が進み、遺伝子工学的に改変した細菌ポリイン類が創製できる基盤が整ってきた。そこで本研究では、protegenin 生合成遺伝子クラスター中に存在する酵素 (fatty acyl-ACP ligase と acetylenase) を人為的に改変し、pentayne 構造あるいはさらに長いポリイン構造を構築できるかどうかを検証する。

## 方法と結果

### 1. Protegenin 類における tetrayne 構造の生合成機構の解明

Protegenin 類は、*Pseudomonas protegens* Cab57 株によって生合成される細菌ポリインである<sup>2)</sup>。我々は、*pro* 遺伝子クラスターにより protegenin 類が生合成されることを見出していた。しかし、各遺伝子の機能については分かっていない点が多い。そこで、各遺伝子の欠損株作製を進めた。Ligase である *proA*、desaturase である *proB*、ACP である *proD* を欠損させると、protegenin A の産生能は消失した。中間体の蓄積もなかった。*proH* の欠損は、protegenin A の生成をやや減少させた。Rubredoxin をコードする *proF* を欠損させると、protegenin A の生産量は大きく減少した。

続いて、*pro* 遺伝子クラスターを大腸菌で発現し、これらがコードする酵素・タンパク質が大腸菌内でも機能し得るのかどうかを検証した。クラスター全体を PCR でクローニングし、pET-21a(+)ベクターを介して *E. coli* BL21(DE3)で発現すると、protegenin A の生産能を獲得したため、クラスター内の酵素は *E. coli* 内で機能させることが可能であることを確認した。実際の polyne 形成がどのようなになっているのかを詳細に検討するため、*proD* 単体で発現誘導の最適化後、*proD* と *proA* を共発現して、ACP である ProD のアシル化の進行を SDS-PAGE、ウェスタンブロットティング、LCMS で調べた。ProD の発現とアシル化は確認することができた。現在、残りの修飾酵素も発現し、ProD 上に結合した脂肪酸上で不飽和化がどのような順序で進むのかを調べている。

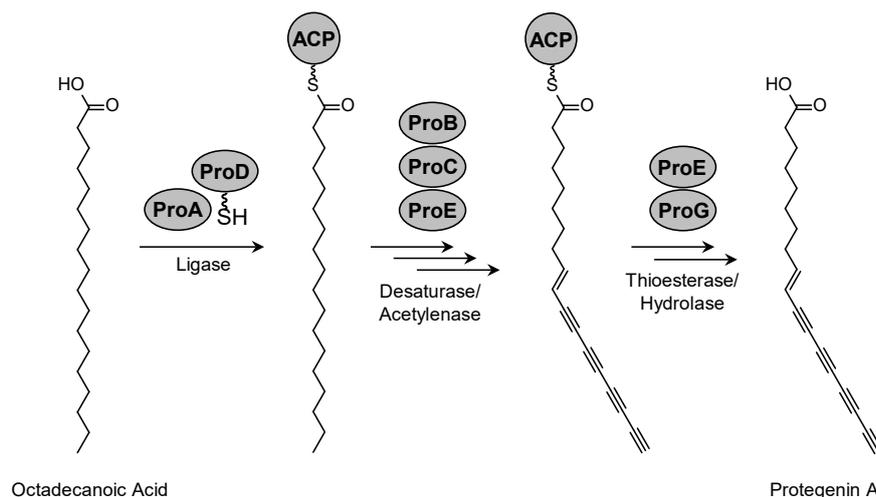


図1. Protegenin Aの推定生合成経路

## 2. C20 脂肪酸を基質とする fatty acyl-ACP ligase の導入

これまでの研究から、C16 脂肪酸からは triyne 構造、C18 脂肪酸からは tetrayne 構造を持つ細菌ポリイン類が生合成されることが分かっている。したがって、生合成遺伝子クラスター中にある fatty acyl-ACP ligase (fatty acyl-AMP ligase と呼ばれる) の基質特異性を C18 から C20 へと変化させることができれば、pentayne 構造を持つ細菌ポリインを創製できる可能性がある。

細菌における二次代謝で C20 の脂肪酸を基質とする反応はいくつか知られていたが、グラム陰性細菌のある種の fatty acyl AMP ligase に着目して、Cab57 株での発現を検討した。しかし、期待するような変換は認められず、さらに多くの酵素の検討が必要であることが分かった。

## 3. 誘導ラマン分析による細菌ポリイン検出の検討

ポリイン化合物は独特な構造であるためラマン分光法において、他の生体成分とは異なる位置にラマン吸収を与える。これを利用することで、細胞内に存在する細菌ポリイン類を選択的・高感度で検出できるのではないかと予想した。

それを検証するために、共同研究先で誘導ラマン顕微鏡解析を進めた。*P. protegens* Cab57 株は、protegenin A を比較的多く生産することを見出している。この細胞をモデル系にして、実験系の構築を行った。その結果、期待したほどの感度を到達することができず、積算回数と画像処理を組み合わせようやく検出することが出来る程度であった。その理由として、protegenin A の生産量は他の細菌ポリイン類に比べると多いものの、誘導ラマン顕微鏡で検出するには量が足りないことが判明した。

## 結論

Protegenin A の生合成経路に関する知見は進展したが、ポリイン部の形成にどのような順番で desaturase/acetylenase が関与するのかが不明である。C20 脂肪酸を基質と

する AMP ligase を生合成に機能させるには更なる検討が必須である。細菌ポリイン類を生産する細菌種を効率良く探索するために、誘導ラマン分光法の利用を検討したが、期待したほどの感度が得られなかったため、別の方法を検討する必要がある。

## 文献

- 1) Ross, C., Scherlach, K., Kloss, F. and Hertweck, C. (2014), The Molecular Basis of Conjugated Polyynes Biosynthesis in Phytopathogenic Bacteria. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**: 7794-7798.
- 2) Murata, K., Suenaga, M., and Kai, K. (2022) Genome mining discovery of protegenins A–D, bacterial polyynes involved in the antioomycete and biocontrol activities of *Pseudomonas protegens*. *ACS Chem. Biol.* **17**: 12, 3313-3320.
- 3) Kai, K., Sogame, M., Sakurai, F., Nasu, N., Fujita, M. (2018) Collimonins A–D, unstable polyynes with antifungal or pigmentation activities from the fungus-feeding bacterium *Collimonas fungivorans* Ter331. *Org. Lett.* **20**: 3536-3540.