

令和元年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04905

研究課題名(和文)ポリケチド合成酵素機能改変と難化学合成反応解明による新規天然化合物創出基盤の構築

研究課題名(英文) Modification of polyketide synthase and elucidation of enzyme reaction which is difficult in chemical synthesis, and creation of novel natural products

研究代表者

高橋 俊二 (Takahashi, Shunji)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：30311608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：多様な構造と強い生理活性から天然化合物は創薬探索源として重要である。天然化合物の生合成反応に関わるユニークな酵素を理解し活用することは重要な課題である。本研究では、ポリケチド化合物であるリベロマイシンA (RM-A) 生合成遺伝子クラスターに存在する酵素群に注目した。特に、生合成の最終段階の3級水酸基のエステル化は有機合成反応では極めて困難な反応であるが、本研究助成により、反応に関わる3つの酵素の結晶構造解析に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポリケチド化合物群は貴重な創薬探索源であり、ポリケチド合成酵素が有する機能ドメインとモジュール構造を改変することは、重要な学術課題である。また、生合成遺伝子クラスター全長を取得し、遺伝子改変を行う意義は極めて大きい。さらに、これらの化合物の構造修飾機構を明らかにすることも重要である。特にRM-A生合成過程には、有機合成的には極めて困難な3級水酸基のエステル化が存在する。これら生合成酵素群の反応機構解明は、難溶性化合物の水溶性向上及びプロドラッグ化手法の開発につながる。新しい学術知見をもとに、天然化合物の創出基盤を構築することによって、社会に貢献する創薬リード導出が期待される。

研究成果の概要(英文)：Natural products are important sources for drug discovery because of their diverse structures and strong biological activities. Understanding and utilization of unique enzymes involved in biosynthetic reactions of natural compounds is an important issue. In this study, we focused on enzymes involved in reveromycin A (RM-A) biosynthesis. Esterification of the tertiary hydroxyl group at the final stage of RM-A biosynthesis is a very difficult reaction in organic synthesis. With this research grant, we succeeded in crystal structure analysis of three enzymes responsible for the reaction.

研究分野：応用微生物学

キーワード：リベロマイシン ポリケチド合成酵素 異種発現 放線菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

人知を超えた構造と強い生理活性から天然化合物は創薬探索源として重要である。近年、微生物のゲノム解読が進展し、様々な二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターが見出されているが、これらに含まれる新奇酵素の機能を最大限に活用し化合物を生産することがポストゲノム時代の重要課題である。我々は、骨関連疾患治療薬として注目されているリベロマイシンA (RM-A) 生産菌の全ゲノム解読及びRM-A生合成遺伝子群の解析により、ポリケチド骨格形成の鍵となる遺伝子群及び未知生合成反応を触媒する酵素群を見出した。

## 2. 研究の目的

本研究では、ポリケチド化合物の構造形成に関わる酵素群に着目し、I型ポリケチド合成酵素や難化学合成反応を触媒する生合成酵素群の機能解明により、新規天然化合物の創出基盤を構築することを目的とした。

## 3. 研究の方法

ポリケチド化合物の構造多様化を行うために、I型ポリケチド合成酵素と修飾酵素遺伝子群を含むRM-A生合成遺伝子クラスター全長を有するBACベクターを構築し、*Streptomyces avermitilis* (SUKA17株)を宿主に用いて異種発現することにより、RM-A生産を検証する。I型ポリケチド合成酵素は、ketosynthase (KS), acyltransferase (AT), acyl carrier protein (ACP)を基本モジュールとした多様なケトアシル鎖の伸長とketoreductase (KR), dehydratase (DH), enoylreductase (ER)ドメインによる脱水還元プロセスの組み合わせにより構造多様化を達成している。ポリケチド伸長鎖選択に関与するATの基質特異性は、主にマロニルCoA及びメチルマロニルCoAが大部分をしめるが、RM-A, C, Dのアルキル側鎖の生合成に見られるようにユニークな伸長基質に対応するATが見出されており、ATドメイン改変によるポリケチド構造多様性の拡大は重要な課題である。また、生合成されたポリケチド骨格の修飾機構を解明することも重要である。本研究では、3級水酸エステル化反応に関わる酵素群の反応機構を解明するために、大腸菌及び放線菌を用いて各生合成酵素を精製する。生化学的手法を用いて酵素機能を解析するとともに、生合成中間体基質を調製し、共結晶構造解析を試みる。

## 4. 研究成果

RM-A生合成遺伝子クラスター全長(91 kbp)をすべてBACベクターに導入することに成功した。さらに、放線菌*Streptomyces avermitilis*を用いてRM-Aの異種発現に成功した。また、RM-A生合成の最終段階は、RM-T1からRM-Aへの3級水酸基のエステル化である。この反応は有機合成では15000気圧が必要な非常に困難な反応である。詳細な反応メカニズムを解明するために、生化学反応により機能推定した3つの酵素を精製し、結晶化を検討した。その結果、X線結晶構造解析に成功した。

本研究助成によって、ポリケチド骨格形成から修飾反応に至るRM-A生合成研究を大きく推進し、新規天然化合物創出に向けて基盤となる知見を得ることが出来た。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計19件)

Panthee S., Takahashi S., Hayashi T., Shimizu T, and Osada H. -carboline biomediators induce reveromycin production in *Streptomyces* sp. SN-593. *Sci. Rep.* 9 (1), 5802, 2019. doi: 10.1038/s41598-019-42268-w 査読有

Hashimoto T., Hashimoto J., Kozone I., Amagai K., Kawahara T., Takahashi S., Ikeda

- H., Shin-ya K. Biosynthesis of quinolidomycin, the largest known macrolide of terrestrial origin: Identification and heterologous expression of a biosynthetic gene cluster over 200 kb. *Org. Lett.* 20(24), 7996-7999, 2018. doi: 10.1021/acs.orglett.8b03570 査読有
- Son S., Hong Y.S., Futamura Y., Jang M., Lee J.K., Heo K.T., Ko S.K., Lee J.S., Takahashi S., Osada H., Jang J.H., Ahn J.S. Catenulisporolides, glycosylated triene macrolides from the chemically underexploited actinomycete *Catenulispora* species. *Org. Lett.* 20, 7234-7238, 2018. doi:10.1021/acs.orglett.8b03160 査読有
- Kato N., Nogawa T., Takita R., Kinugasa K., Kanai M., Uchiyama M., Osada H., and Takahashi S. Control of the stereochemical course of [4+2] cycloaddition during trans-decalin formation by Fsa2-family enzymes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 57, 9754-9758, 2018. doi: 10.1002/anie.201805050 査読有
- Jang J.-P., Hwang G.J., Jang M., Takahashi S., Ko S.K., Osada H., Jang J.H., and Ahn J.S. Aturanosides A and B, glycosylated anthraquinones with antiangiogenic activity from a soil-derived *Streptomyces* species. *J. Nat. Prod.*, 81(9), 2004-2009, 2018. doi: 10.1021/acs.jnatprod.8b00307 査読有
- Jang J.-P., Hwang G.J., Kwon M.C., Ryoo I.-J., Jang M., Takahashi S., Ko S.K., Osada H., Jang J.H., and Ahn J.S. Pentaminomycins A and B, hydroxyarginine-containing cyclic pentapeptides from *Streptomyces* sp. RK88-1441. *J. Nat. Prod.*, 81 (4), 806-810, 2018. doi: 10.1021/acs.jnatprod.7b00882 査読有
- Kato N., Furutani S., Otaka J., Noguchi A., Kinugasa K., Kai K., Hayashi H., Ihara, M. Takahashi S., Matsuda K., Osada H. Biosynthesis and structure-activity relationship studies of okaramines that target insect glutamate-gated chloride channels. *ACS Chem. Biol.*, 13 (3): 561-566, 2018. doi: 10.1021/acscchembio.7b00878 査読有
- Takagi H., Nogawa T., Futamura Y., Takahashi S., and Osada H. Kinanthraquinone, a new anthraquinone carboxamide isolated from *Streptomyces reveromyceticus* SN-593-44. *J. Antibiot.* 71(4): 480-482, 2018. doi: 10.1038/s41429-017-0020-0 査読有
- ⑨ Khalid A., Takagi H., Panthee S., Muroi M., Chappell J., Osada H., and Takahashi S. Development of a terpenoid-production platform in *Streptomyces reveromyceticus* SN-593. *ACS Synth. Biol.* 6 (12): 2339-2349, 2017. doi: 10.1021/acssynbio.7b00249 査読有
- Nogawa T., Kato N., Shimizu T., Okano A., Futamura Y., Takahashi S., and Osada H. Wakodecalines A and B, new decalin metabolites isolated from a fungus *Pyrenochaetopsis* sp. RK10-F058. *J. Antibiot.* 71: 123-128, 2017. doi: 10.1038/ja.2017.103 査読有
- Otagiri M., Khalid A., Moriya S., Osada H., and Takahashi S. Novel squalene-producing thraustochytrids found in mangrove water. *Biosci Biotechnol Biochem.* 81(10): 2034-2037, 2017. doi: 10.1080/09168451.2017.1359485 査読有
- Amagai K., Ikeda H., Hashimoto J., Kozone I., Izumikawa M., Kudo F., Eguchi T., Nakamura T., Osada H., Takahashi S., and Shin-ya K., Identification of gene cluster for telomestatin biosynthesis and efficient production in heterologous host using specific promoter. *Sci. Rep.* 7: 3382, 2017. doi:10.1038/s41598-017-03308-5 査読有
- Zhang L., Hashimoto T., Qin B., Hashimoto J., Kozone I., Kawahara T., Okada M., Awakawa, T., Ito T., Asakawa Y., Ueki M., Takahashi S., Osada H., Wakimoto T., Ikeda H., Shin-ya K., Abe I. Characterization of giant modular PKSs provides insight into genetic mechanism for structural diversification of aminopolyol polyketides. *Angew. Chem. Int.*

- Ed.*, 56 (7): 1740-1745, 2017. doi: 10.1002/anie.201611371 査読有
- Jang J.-P., Nogawa T., Futamura Y., Shimizu T., Hashizume D., Takahashi S., Jang J.-H., Ahn J.S., and Osada H. Octaminomycins A and B, cyclic octadepsipeptides active against *Plasmodium falciparum*. *J. Nat. Prod.*, 80(1): 134-140, 2017. doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b00758 査読有
- Nogawa T., Okano A., Lim C.L., Futamura Y., Shimizu T., Takahashi S., Ibrahim D., Osada H. Opantimycin A, a new metabolite isolated from *Streptomyces* sp. RK88-1355. *J. Antibiot.* 70, 222-225, 2017. doi: 10.1038/ja.2016.113 査読有
- Jang J.-P., Takahashi S., Futamura Y., Nogawa T., Jang J.-H., Ahn J.S., and Osada H. RK-1441, a new benadrostin derivative produced by *Streptomyces* sp. RK88-1441. *J. Antibiot.* 70, 102-104, 2017. doi: 10.1038/ja.2016.65 査読有
- Kim J., Ko S.-K., Kim H.-M., Kim Gun H., Son S., Kim G.S., Hwang G.J., Jeon E.S., Shin K.-S., Ryoo I.-J., Hong Y.-S., Oh H., Lee K.H., Soung N.K., Hashizume D., Takahashi S., Kim B.Y., Osada H. Jang J.-H., Ahn J.S. Stachybotrysin, an osteoclast differentiation inhibitor from a marine-derived fungus *Stachybotrys* sp. KCB13F013. *J. Nat. Prod.*, 79, 2703-2708, 2016. doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b00641 査読有
- Shinohara Y., Takahashi S., Osada H., and Koyama Y. Identification of a novel sesquiterpene biosynthetic machinery involved in astellolide biosynthesis. *Sci. Rep.* 6: article number 32865, 2016. doi: 10.1038/srep32865 査読有
- Ray L., Valentic T., Miyazawa T., Withall D.M., Song L., Milligan J.C., Osada H., Takahashi S., Tsai S.-C., and Challis G.L. A crotonyl-CoA reductase-carboxylase independent pathway for assembly of unusual alkylmalonyl-CoA polyketide synthase extender units. *Nat. Commun.* 7:13609. 2016. doi: 10.1038/ncomms13609 査読有

[学会発表](計 14 件)

- 奥村 英夫、鬼頭 奈央子、佐藤 裕美、熊坂 崇、長田 裕之、高橋 俊二、リベロマイシン生合成に関わる RevK の結晶構造解析、農芸化学会、2019 年 3 月 24-27 日
- 鬼頭 奈央子、佐藤 裕美、奥村 英夫、熊坂 崇、長田 裕之、高橋 俊二、リベロマイシン生合成に関わるサクシニル化酵素群の相互作用解析、農芸化学会、2019 年 3 月 24-27 日
- 鬼頭 奈央子、佐藤 裕美、奥村 英夫、熊坂 崇、長田 裕之、高橋 俊二、リベロマイシン生合成に関わるサクシニル化酵素群の機能解析、放線菌学会、2018 年 9 月 11-12 日
- 高尾 理沙、鬼頭 奈央子、高木 海、野川 俊彦、長田 裕之、高橋 俊二、Kinanthraquinone 生合成遺伝子クラスターの解析、放線菌学会、2018 年 9 月 11-12 日
- 加藤 直樹、野川 俊彦、衣笠 清美、高橋 俊二、長田 裕之、立体選択的デカリン形成を担う Fsa2 ファミリー-Diels-Alderase の機能解析、農芸化学会、2018 年 3 月 15-18 日
- 鬼頭 奈央子、高橋 俊二、佐藤 裕美、奥村 英夫、熊坂 崇、長田 裕之、リベロマイシン生合成に関わるサクシニル化酵素群の機能解析、農芸化学会、2018 年 3 月 15-18 日
- 野川 俊彦、加藤 直樹、清水 猛、岡野 亜紀子、二村 友史、高橋 俊二、長田 裕之、糸状菌 *Pyrenochaetopsis* sp. RK10-F058 より単離した新規デカリン骨格含有二次代謝産物 wakodecaline C の構造、農芸化学会、2018 年 3 月 15-18 日
- 高木 海、野川 俊彦、二村 友史、長田 裕之、高橋 俊二、新規アントラキノ kinanthraquinone の同定と生物活性評価、農芸化学会、2018 年 3 月 15-18 日
- ⑨ 鬼頭 奈央子、高橋 俊二、佐藤 裕美、奥村 英夫、熊坂 崇、長田 裕之、リベロマイシン生合成に関わる RevM の機能解析、放線菌学会、2017 年 9 月 7-8 日

篠原 靖智、高橋 俊二、長田 裕之、小山 泰二、麹菌 *Aspergillus oryzae* が有する新奇セスキテルペン生合成経路の解明、農芸化学会、2017年3月17-20日

鬼頭 奈央子、高橋 俊二、宮澤 岳、前島 希、田中 美帆、室井 誠、奥村 英夫、熊坂 崇、長田 裕之、リベロマイシン生合成に関わる酸化還元酵素 RevM の機能解析、農芸化学会、2017年3月17-20日

奥村 英夫、鬼頭 奈央子、高橋 俊二、宮澤 岳、熊坂 崇、長田 裕之、リベロマイシン生合成に関わる RevM の結晶構造解析、農芸化学会、2017年3月17-20日

Ammara Khalid, Hiroshi Takagi, Suresh Panthee, Hiroyuki Osada, and Shunji Takahashi, Development of terpenoid production platform using *Streptomyces reveromyceticus*, 農芸化学会、2017年3月17-20日

天貝 啓太、池田 治生、新家 一男、高橋 俊二、アミノ酸置換による新規テロメスタチン類縁体の創製、放線菌学会、2016年9月8-9日

〔図書〕(計 1件)

宮澤 岳、高橋 俊二、長田 裕之、ポリケチド化合物の生合成に関与する新規カルボキシル化酵素、バイオサイエンスとインダストリー、Vol. 75 (4): 315-317, 2017. 査読有

〔その他〕

ホームページ

[http://www.riken.jp/research/labs/csrs/nat\\_prod\\_biosynth/](http://www.riken.jp/research/labs/csrs/nat_prod_biosynth/)

<http://www.csrs.riken.jp/jp/labs/npbu/index.html>

<http://www.npbirt.riken.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：奥村 英夫

ローマ字氏名：OKUMURA Hideo

所属研究機関名：公益財団法人高輝度光科学研究センター

部局名：タンパク質結晶解析推進室

職名：研究員

研究者番号(8桁): 90377903

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。