

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19214

研究課題名(和文)アミノ酸配列に基づくポリケチド系天然物の構造予測と物質生産

研究課題名(英文) Predicting the chemical space generated by fungal polyketide synthase-nonribosomal peptide synthetase (PKS-NRPS) hybrid

研究代表者

南 篤志 (Minami, Atsushi)

北海道大学・理学研究院・准教授

研究者番号：40507191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：生成遺伝子の異種発現による天然物生産が可能な時代が到来し、微生物分野では「培養」から「生成マシナリー」へのパラダイムシフトが起こりつつある。医薬品や化学ツールとしての天然物の重要性を考慮すると、「遺伝子情報に基づいた天然物の構造予測と生産」が実現すれば分野を横断するより大きな変化につながると考えられる。こうした背景下、本研究課題では、糸状菌由来の繰り返し型ポリケチド合成酵素PKS-NRPSをモデルとしてアミノ酸配列から構造の新規性を予測できるか否かを検証した。その結果、PKS-NRPSの分子系統樹解析に基づく分類から構造新規性を予測することができることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの天然物化学者が「生物がどの程度の種類・数の天然物をつくることができるのか?」という点には興味を抱いているが、申請者の知る限りにおいて、明確な答えは得られていなかった。こうした状況下、申請者はバイオインフォマティクス解析の結果を化学的に解釈するという独自の方法論を提唱し、この問題を解決する端緒となる研究成果を得た。同様の手法により、他天然物の解析が進めば、上述した「問い」に対する回答が得られると期待される。

研究成果の概要(英文)：Fungal polyketide synthase (PKS)-nonribosomal peptide synthetase (NRPS) hybrids are key enzymes for synthesizing structurally diverse hybrid natural products (NPs) with characteristic biological activities. Predicting their chemical space is of particular importance in the field of natural product chemistry. Here, we conducted a phylogenetic analysis of PKS&#8211;NRPSs and a modification enzyme analysis of the corresponding biosynthetic gene cluster, revealing a hidden relationship between its genealogy and core structures. This unexpected result allowed us to predict 18 biosynthetic gene cluster (BGC) groups producing known carbon skeletons and 11 uncharacterized BGC groups. The limited number of carbon skeletons suggested that fungi tend to select PK skeletons for their survival during their evolution. This study provides insight into the chemical spaces of fungal PKs and the distribution of these biosynthetic gene clusters.

研究分野：天然物化学

キーワード：天然物 生合成 酵素 構造予測

## 1. 研究開始当初の背景

微生物や植物が生産する天然物は、生物が数十億年かけてスクリーニングした機能性分子である。その魅力は、人知を超えた複雑な化学構造や強力な生物活性に集約される。同等のケミカルスペースを化学合成で構築することは難しいため、天然物は医薬品などの重要なリソースとして再注目されている。従来、天然物は「培養」により取得されてきたが、培養可能な微生物は全体の1%程度であること、培養容易な微生物からの新規天然物の単離例が顕著に減少していること、1つの生物種から単離された天然物の数が遺伝子情報から予想される天然物の数を大きく下回っていることなどから、培養だけでは生物が生産可能な全ての天然物を取得することは難しい。この状況を打開するために汎用宿主を利用した天然物生合成マシナリーの再構築が活発に検討され、現在では、生合成遺伝子を利用した新規天然物の異種生産 (=ゲノムマイニング) が可能になりつつある。本手法では遺伝子情報さえあれば物質生産を検討できるため、新規天然物を取得できる可能性が大きく広がった。しかしながら、増加する遺伝子情報を効果的に活用したゲノムマイニングを実現する上で重要になる「標的遺伝子の選択」には多くの課題が残されている。

本研究では、構造多様性と多彩な生物活性を兼備した代表的な天然物であるポリケタイド(図3)を題材として、骨格構築酵素(PKS-NRPS)の配列情報から「構造の新規性」を予測することが可能か検証する。予測が可能であれば、ゲノムマイニングの特色を生かした新規ポリケタイドの異種生産が実現する。仮説の提唱だけでなく、独自に発展させてきた異種発現系を用いて仮説の妥当性を実験的に検証できる点が本申請者の強みである。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、骨格構築酵素(PKS-NRPS)の配列情報から「構造の新規性」を予測するために以下の項目を検討した。

1. 予備的知見に基づく「共進化仮説」を検証するため、公共データベースからPKS(-NRPS)のアミノ酸配列を網羅的に取得して系統樹解析を行う。次いで、各クレード内での修飾酵素遺伝子の保存性を調べる。仮説と矛盾しない結果が得られた場合、項目2を検討する。
2. 既知天然物と類似の骨格を与えると予想された複数のPKS(-NRPS)と修飾酵素遺伝子を麹菌内で異種発現する。得られた化合物の構造から「仮説」の妥当性を検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) 項目1の検討：骨格構築酵素遺伝子の網羅的取得と分子系統樹解析

生合成経路が既知のハイブリッド型ポリケタイド(h-PK)を化学構造に基づいて分類した。この分類結果を基に、次の手順でPKS-NRPSを含む生合成遺伝子クラスター(BGC)を分類した。

公共データベースから糸状菌由来のPKS-NRPSを含む遺伝子クラスターを網羅的に取得  
既知天然物を与える特徴的な修飾反応を担う酵素を特定

の修飾酵素に基づくBGCの分類

PKS-NRPSの分子系統樹解析に基づく分類結果と の分類結果の比較・対応づけ

### (2) 項目2の検討：麹菌異種発現による骨格構築酵素の機能解析

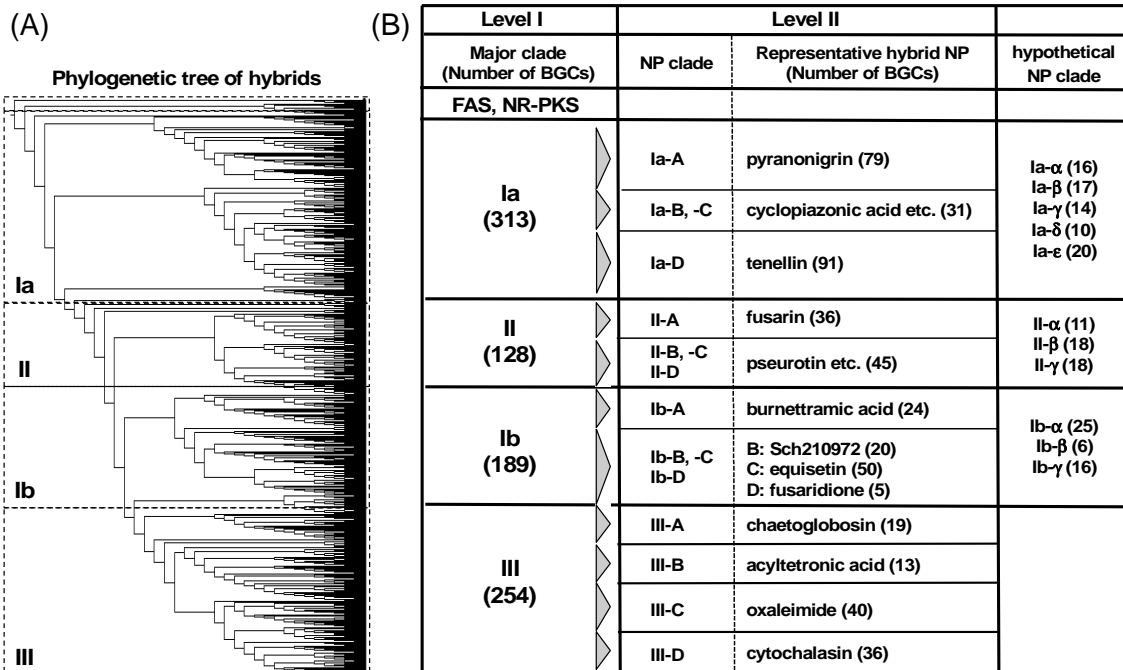
構造既知の天然物と同一クレードに属する複数の機能未知PKS-NRPSを異種発現用ベクターにクローニングした。次いで、各遺伝子を麹菌内で異種発現し、各種分光学的手法を用いて生成物の構造を決めた。生成物の構造から提唱した仮説の妥当性を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 「構造の新規性」の予測

公開データベースに登録されている1419種のBGCを収集し、上述した方法に従って分類した。その結果、53%にあたるBGCが既知h-PK群(18グループ)に分類できること、21%のBGCが新規h-PK群(11グループ)の構築に関わることを明らかにした。この分類数は、当初予定していた数よりも少なく、生物は進化の過程で自らにとって役に立つ分子を積極的に選択してきたことを示唆している。また、この分類結果をPKS-NRPSの分子系統樹解析の分類結果と比較すると、両者はよく一致していた。この結果は提唱した「共進化仮説」の妥当性を支

持する結果であると同時に、骨格構築酵素の分子系統樹解析から構造の新規性を予測することができることを示している。



## (2) 骨格構築酵素の機能解析

分類結果の妥当性を検証するため、equisetin 生合成に関わる PKS-NRPS (EqxS) と同一グループに分類された 3 種の PKS-NRPS の機能解析を行った。PKS-NRPS とその機能を補完する trans-ER を導入した形質転換体を作成し、その結果、1 種の形質転換体が EqxS 導入株と同じ生成物を与えた。この結果は、分類結果の妥当性を支持する結果である。一方、他 2 種の形質転換体では代謝産物の生産が確認できなかった。原因を特定するために転写解析を行うと、イントロンの除去が不完全であることがわかった。そこで、該当箇所を人工的に除去して再度解析したが、やはり生成物は得られなかった。これより、これら 2 種の PKS-NRPS は機能不全酵素であると予想された。

以上の結果は、原著論文 1 報 (投稿中)、総説・解説 1 報として公表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>南篤志、尾崎太郎、及川英秋                 | 4. 発行年<br>2020年 |
| 2. 出版社<br>シーエムシー出版                      | 5. 総ページ数<br>77  |
| 3. 書名<br>月刊ファインケミカル3月号 【特集】天然物合成化学の最新動向 |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|