

平成 31 年 5 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19233

研究課題名(和文)クリプティック遺伝子活性化を起点としたモノづくり研究

研究課題名(英文)Biosynthetic research on cryptic gene activation

研究代表者

掛谷 秀昭 (Takeya, Hideaki)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：00270596

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)：放線菌 *Streptomyces* sp. HEK616 および細菌 *Tsukamurella* sp. の複合培養系における新規抗真菌物質 5aTHQs 類および新規抗生物質 streptoaminals (STAMS) 類の生合成機構解析の結果、両化合物群が同一の新規 II 型ポリケチド合成酵素 (PKS) によって生合成されることを明らかにした。さらに、希少放線菌 *Saccharothrix* sp. における新規抗がん剤 saccharothriolides 類の生合成における推定中間体を実証するための precursor-directed in situ synthesis (PDSS) 法を確立し中間体の発見に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の成果は、微生物の潜在的物質生産能力の覚醒や微生物代謝産物中の不安定生合成中間体の実証に関して大きなブレークスルーになる可能性を秘めている。特に、クリプティック遺伝子の活性化を起点としたモノづくり研究に関する研究成果は、創薬リード化合物を指向した新規二次代謝産物の探索・同定研究およびケミカルスペースの拡充研究などに貢献可能であり、学術的にも社会的にも意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The common biosynthetic gene cluster for both antifungal 5-alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines (5aTHQs) and antimicrobial streptoaminals (STAMS) produced by the combined-culture of *Streptomyces* sp. HEK616 and *Tsukamurella* sp. TP-B0596 were identified. The gene cluster contained nine genes including a unique type II PKS system.

Meanwhile, an unstable intermediate of saccharothriolides production, presaccharothriolide C2 produced by the rare actinomycete *Saccharothrix* sp. A1506 was discovered, and precursor-directed in situ synthesis (PDSS) method was established.

研究分野：生物有機化学 ケミカルバイオロジー

キーワード：天然物化学 ケミカルバイオロジー 複合培養 クリプティック遺伝子 生合成 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

大村智博士らのノーベル医学・生理学賞の受賞(2015年)などにより、天然物医薬品探索の重要性・有用性が再認識されつつあるが、化学構造的にも生物活性的にも多様性を有する新規化合物群のさらなる創出・開発が希求されている。ゲノムマイニングの時代を迎え、「クリプティック(cryptic; 隠された/休眠している)遺伝子の活性化を起点としたモノづくり研究」が新規二次代謝産物の探索・同定研究、ケミカルスペースの拡充研究にもたらすインパクトは大きい。本研究代表者らは研究開始当初までに、新規抗真菌物質 5aTHQs 類および新規抗生物質 streptoaminals 類が異なる 2 種類の微生物(放線菌 *Streptomyces* sp. & 細菌 *Tsukamurella* sp.) の複合培養によってのみ産生されること[*Angew. Chem. Int. Ed.* 55, 10278 (2016); *Org. Lett.* 17, 1918 (2015)], 希少放線菌 *Saccharothrix* sp. が Trp (トリプトファン) 添加培地により新規抗がん剤 saccharothriolides 類を産生すること[J. Nat. Prod. 79, 1891 (2016); *Chem. Commun.* 51, 8074 (2015)], などを見出していた。

### 2. 研究の目的

放線菌 *Streptomyces* sp. および細菌 *Tsukamurella* sp. の複合培養系における新規抗真菌物質 5aTHQs 類および新規抗生物質 streptoaminals 類の生合成機構を明らかにすること、希少放線菌 *Saccharothrix* sp. における新規抗がん剤 saccharothriolides 類生合成における推定不安定中間体を実証するための PDSS 法 (precursor-directed in situ synthesis 法) の確立および推定不安定中間体の単離・構造解析などを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究課題では、下記の研究項目を設定し研究を遂行した。

#### 項目 1. *Streptomyces* sp. HEK616 と *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 の複合培養における 5aTHQs 類及び streptoaminals の生合成機構解析

5aTHQs 類および streptoaminals 類の詳細な化学的標識実験による生合成経路の確定、*Streptomyces* sp. HEK616 のドラフトゲノムシーケンス情報による生合成遺伝子クラスター解析・クローニング、*Streptomyces lividans* TK23 を宿主とした異種発現実験等を用いて解析した。

#### 項目 2. 希少放線菌 *Saccharothrix* sp. A1506 が生産する saccharothriolides 類の生合成における不安定中間体の実証

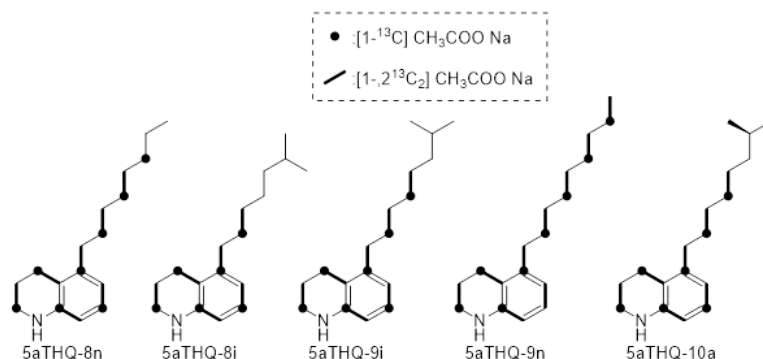
Saccharothriolides 類の生産培地における Trp の有無による推定生合成中間体 presaccharothriolide X の存在量変化に関する検討を LC-MS 解析等などにより行った。さらに、*in situ* における各種求核試薬を用いた推定生合成中間体の補足法を検討し、確立した PDSS 法を活用して各種類縁化合物群を設計・創製した。

### 4. 研究成果

2 つの研究項目に関して、下記の非常に有意義な研究成果が得られた。

#### 項目 1. *Streptomyces* sp. HEK616 と *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 の複合培養における 5aTHQs 類及び streptoaminals の生合成機構解析

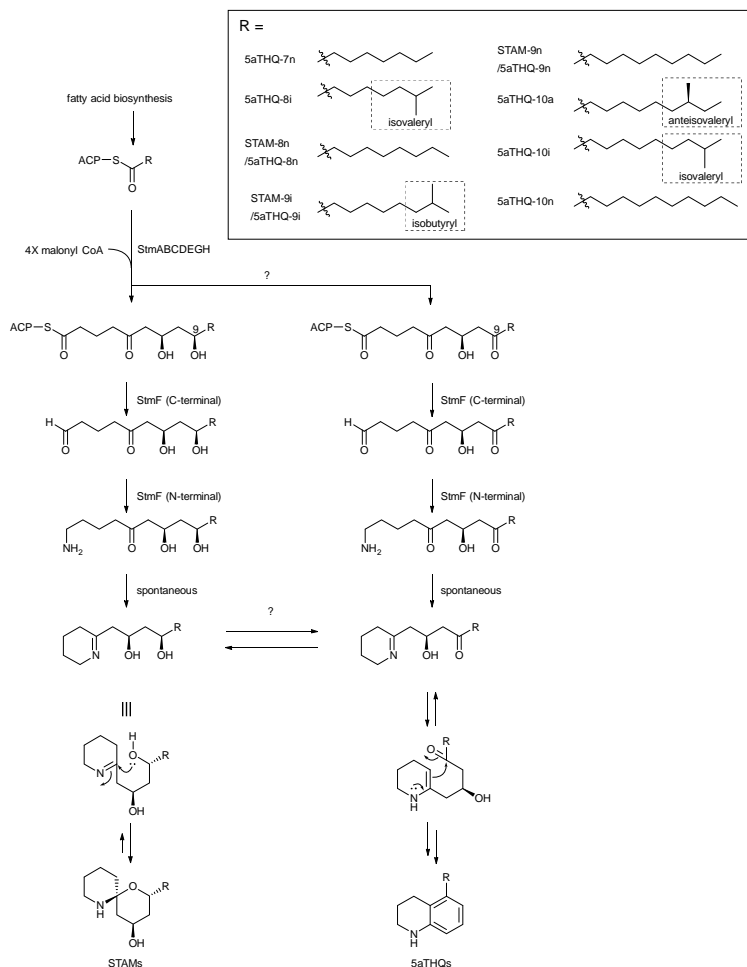
5aTHQs および streptoaminals (STAMs) の生合成解析にあたり、当該複合培養系において [1-<sup>13</sup>C] 酢酸ナトリウムおよび [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>] 酢酸ナトリウムを添加し、5aTHQs の標識パターンを解析した。その結果、下図に示した通り、5aTHQs 類の生合成には予想通り、酢酸単位の連続的な縮合反応が関与することが示唆された。



続いて、*Streptomyces*. sp. HEK616 染色体 DNA の次世代シーケンサーによる塩基配列の解読、Edena を用いた *de novo* アセンブリによって総塩基長 9.3Mb のドラフトシ - ケンスを得た。BLAST のアルゴリズムを用いてポリケチド合成遺伝子を探索したところ、下表に示した 15 遺伝子からなる遺伝子クラスターを同定し、*stmA-I* が STAMs の合成遺伝子であることが確定した結果、本遺伝子クラスターを *stm* 遺伝子群と命名した。

ORF	Amino acids	Proposed function	Homologous protein; Organism, Identity/similarity (Accession No.)
Orf1	353	Dehydrogenase	Hypothetical protein; <i>S. albulus</i> , 87%/92% (AIA05110)
Orf2	215	TetR-type regulator	TetR/AcrR family transcriptional regulator; <i>S. albulus</i> , 85%/90% (AIA05111)
Orf3	392	P450	Cytochrome P450; <i>S. albulus</i> ; 86%/91% (AIA05112)
Orf4	64	Ferredoxin	Ferredoxin; <i>S. albulus</i> , 76%/84% (AIA05113)
Orf5	397	Ferredoxin reductase	FAD-dependent pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase; <i>S. albulus</i> , 75%/81% (AIA05114)
Orf6	61	unknown	No hits
StmA	192	Acyl carrier protein (ACP)	Hypothetical protein; <i>S. albulus</i> , 87%/93% (AIA05115)
StmB	436	Ketosynthase (KS)	$\beta$ -ketoacyl ACP synthase ; <i>S. albulus</i> , 83%/88% (AIA05116)
StmC	398	Chain length factor (CLF)	$\beta$ -ketoacyl ACP synthase; <i>S. albulus</i> , 76%/78% (AIA05117)
StmD	428	KS	$\beta$ -ketoacyl ACP synthase; <i>S. albulus</i> , 89%/93% (AIA05118)
StmE	463	CLF	$\beta$ -ketoacyl ACP synthase; <i>S. albulus</i> , 81%/87% (AIA05119)
StmF	961	Aminotransferase/reductase	Pyridoxalphosphate dependent aminotransferase, class III; <i>S. albulus</i> , 85%/90% (AIA05120)
StmG	248	Ketoreductase (KR)	$\beta$ -ketoacyl ACP reductase; <i>S. albulus</i> , 85%/92% (AIA05121)
StmH	264	KR	$\beta$ -ketoacyl ACP reductase; <i>S. albulus</i> , 86%/89% (AIA05122)
StmI	254	Thioesterase (TE)	Thioesterase; <i>S. albulus</i> , 71%/79% (AIA05123)

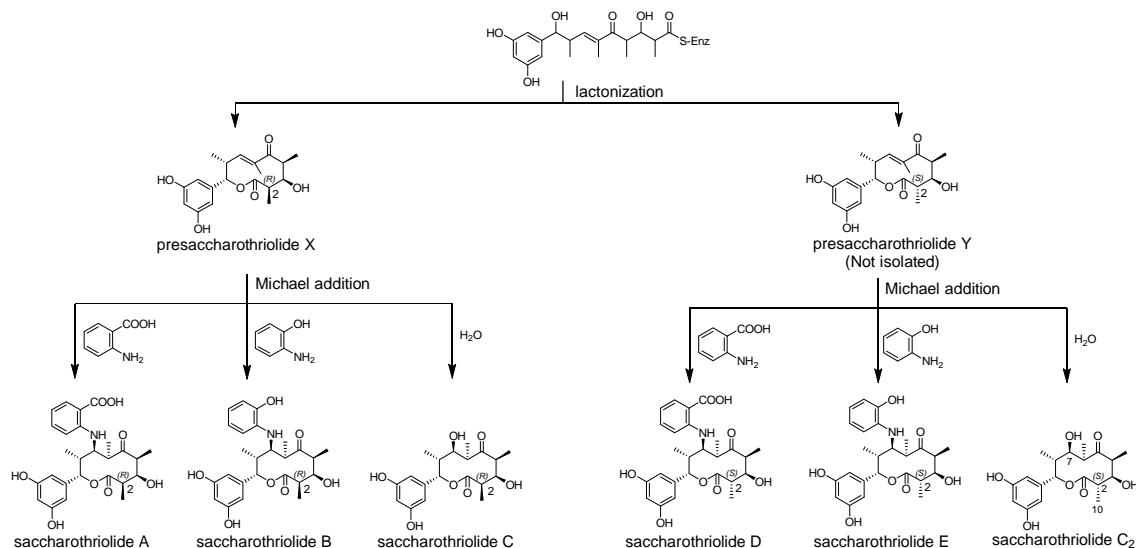
各遺伝子群の機能予測、遺伝子クローニング、*Streptomyces lividans* TK23 を宿主とした異種発現実験などの結果、5aHQs 及び STAMs の合成経路を下図の通り推定した。両化合物類とも新規の II 型ポリケチド合成酵素(PKS)によって合成されることが明らかになった。



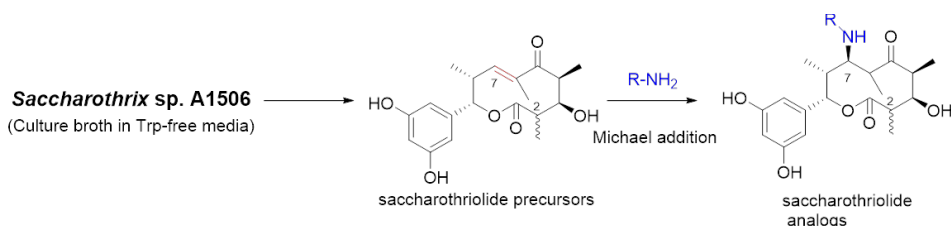
## 項目 2. 希少放線菌 *Saccharothrix* sp. A1506 が生産する saccharothriolides 類の生合成における不安定中間体の実証

我々はこれまでに、希少放線菌 *Saccharothrix* sp. A1506 株が生産する新規がん細胞増殖阻害物質 saccharothriolides A-F を見出している。なかでも、saccharothriolides A-E は分子内のすべての  $sp^3$  炭素が不斉炭素である 10 員環ラク톤を基本骨格としているのが特徴的である。Saccharothriolide F は、saccharothriolides A および D の C-2 位における脱メチル体であった。Saccharothriolides B と E、A と D はそれぞれジアステレオマーの関係にあるなど、同一生産菌におけるこれら類縁化合物の生産の意義および生合成経路に興味をもたれた。

そこで、saccharothriolides 類の生合成経路を下図に示した通り推定し、培養液の抽出方法および単離・精製方法を種々検討した結果、中間体 presaccharothriolide X の単離・同定に成功した。Presaccharothriolide X の化学構造は、各種スペクトル (NMR, MS, UV 等) の詳細な解析や ECD スペクトルの TD-DFT 法などにより決定した。



さらに、中間体 presaccharothriolide X の存在を証明できたことで、より効率的に、様々な求核試薬と反応させ簡便に saccharothriolide 類の類縁化合物を合成可能な precursor-directed *in situ* synthesis (PDSS) 法の開発に成功した。PDSS 法の利点は、反応性に富んだ不安定中間体の単離精製や生合成酵素の同定・精製が不要であることや任意の求核試薬を利用可能であることなどである。これまでに *Saccharothrix* sp. A1506 の培養抽出物に対して、求核試薬として *o*-anisidine などを用いた PDSS 法により、saccharothriolides G&H などの合成に成功している。



PDSS法によるsaccharothriolides類縁体の創製

Saccharothriolides A-H のヒト線維肉腫 HT1080 細胞における細胞増殖抑制活性試験の結果、saccharothriolide B が最も強く  $IC_{50}$  値は  $13.9 \mu\text{M}$  であり、C-2 位における置換基および立体化学、C-7 位および C-2'' 位における置換基など非常に興味深い構造活性相関を示した。さらに、presaccharothriolide X が saccharothriolide B と同程度の抗がん活性を有したことから、saccharothriolide B 分子内の 2-aminophenol が活性の on/off を制御可能な保護基であることが示唆された。saccharothriolide 類のより詳細な構造活性相関研究および薬理活性評価は今後の検討課題である。

さらに、複合培養系の汎用性を指向して、希少放線菌 *Saccharothrix* sp. A1506 株と細菌 *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 の複合培養系を検討した結果、presaccharothriolide X などの生産増強と新規物質 saccharothriolide C<sub>2</sub> の発見に成功した。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 12 件)

- 1) Jiang, Y., Lu, S., Hirai, G., Kato, T., Onaka, H., Takeya, H. Enhancement of saccharothriolide production and discovery of a new metabolite, saccharothriolide C<sub>2</sub>, by combined-culture of *Saccharothrix* sp. and *Tsukamurella pulmonis*. *Tetrahedron Lett.* 60, 1072-1074, 2019. (DOI: 10.1016/j.tetlet.2019.03.034)
- 2) Ozaki, T., Sugiyama, R., Nishimura, S., Asamizu, S., Katsuyama, Y., Takeya, H., Onaka, H. Identification of the common biosynthetic gene cluster for both antimicrobial streptoaminals and antifungal 5-alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines. *Org. Biomol. Chem.* 17, 2370-2378, 2019. (DOI: 10.1039/c8ob02846j)
- 3) Takeya, H. Natural products-inspired chemical biology toward development of new antibiotics. *Jpn. J. Antibiot.* 71, 181-191, 2018.
- 4) Ishikawa, F., Tanabe, G., Takeya, H. Activity-based protein profiling of non-ribosomal peptide synthetases. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 420, 321-349, 2018) (doi: 10.1007/82\_2018\_133)
- 5) Lu, S., Nishimura, S., Takenaka, K., Ito, M., Kato, T., Takeya, H. Discovery of presaccharothriolide X, a retro-Michael product of saccharothriolide B, from the rare actinomycete *Saccharothrix* sp. A1506. *Org. Lett.* 20, 4406-4410, 2018. (10.1021/acs.orglett.8b01535)
- 6) Ishikawa, F., Takeya, H. The chemical biology of natural product biosynthesis: chemical tools for the proteomic analysis of nonribosomal peptide synthetases. *Front. Nat. Prod. Chem.* 3, 65-90, 2017. (DOI: 10.2174/9781681085340117030004)
- 7) Ishikawa, F., Kasai, S., Takeya, H. Tanabe, G. Visualizing the adenylation activities and protein-protein interactions of aryl acid adenylation enzymes. *ChemBioChem.* 18, 2199-2204, 2017. (DOI: 10.1002/cbic.201700361)
- 8) Konno, S., Ishikawa, F., Suzuki, T., Dohmae, N., Takeya, H., Tanabe, G. A chemoproteomics approach to investigate phosphopantetheine transferase activity at the cellular level. *ChemBioChem.* 18, 1855-1862, 2017. (DOI: 10.1002/cbic.201700301)
- 9) Lu, S., Nishimura, S., Ito, M., Kato, T., Takeya, H. Precursor-directed *in situ* synthesis of saccharothriolides G and H by the actinomycete *Saccharothrix* sp. A1506. *J. Antibiot.* 70, 718-720, 2017. (DOI: 10.1038/ja.2016.153).
- 10) 西村慎一, 掛谷秀昭, 松森信明. 生体膜を標的にする天然有機化合物: 天然物による厳密な脂質認識とそれに基づく表現型. *化学と生物*, 56, 678-685, 2018.
- 11) 掛谷秀昭. Discovery Science に魅せられて: 天然物創薬ケミカルバイオロジーの最前線. *化学と生物*, 56, 210-216, 2018.
- 12) 森山彰博, 片桐直宏, 西村慎一, 掛谷秀昭. 生体膜を標的とする天然物の作用機序解析を指向した LiDEL 法の開発. *日本ケミカルバイオロジー学会機関誌「ケミカルバイオロジー (Chemical Biology)」*, 10, 2-5, 2017.

### 〔学会発表〕(計 17 件)

- 1) 掛谷秀昭. 中長期テーマシンポジウム「生命科学における分子化学のプレゼンス」. 化学コミュニケーションが織りなす生命科学. 日本化学会第99春季年会(2019) 神戸, 3月, 2019. (招待講演)
- 2) 浅水俊平, 尾崎太郎, 西村慎一, 掛谷秀昭, 尾仲宏康. 複合培養における *Streptomyces* sp. HEK616 による 5aTHQs の生産機構, 日本農芸化学会 2019 年度大会. 東京, 3月, 2019.
- 3) Takeya, H. Development of cryptic antifungal 5aTHQs targeting cell membrane signaling. Asian Chemical Biology Initiative (ACBI) 2019 Yangon Meeting. Yangon, Myanmar, Jan. 2019. (招待講演)
- 4) 掛谷秀昭. 「シンポジウム・天然物創薬～日本の強みを生かした新潮流～」 天然物創薬の復権を期して: 微生物間化学コミュニケーションの利活用. 第402回 CBI 学会(情報計算化学生物学会)講演会. 東京, 1月, 2019. (招待講演)
- 5) Jiang, Y., Lu, S., Hirai, G., Kato, T., Onaka, H., Takeya, H. Towards the development of chemical communication molecules among microbes. The 1st International Symposium on Chemical Communication (ISCC2019). Tokyo, Jan. 2019.
- 6) 掛谷秀昭. 医薬品シード分子の多様性創出と細胞内標的探索・同定. 京大テックフォーラム. 東京, 10月, 2018. (招待講演)
- 7) 西村慎一, 杉山龍介, 仲谷崇宏, 尾崎太郎, 浅水俊平, 尾仲宏康, 掛谷秀昭. 微生物の複合培養で得られる 5aTHQ の膜親和性と生物活性. 第60回天然有機化合物討論会. 福岡, 9月, 2018.
- 8) 掛谷秀昭. 天然物創薬ケミカルバイオロジー～放線菌に魅せられて～. 2018年度(第33回)日本放線菌学会大会. 東京, 9月, 2018. (招待講演)

- 9) 掛谷秀昭. 天然物創薬ケミカルバイオロジーの醍醐味. 第 53 回天然物化学談話会. 大阪, 7 月, 2018. (招待講演)
- 10) Lu, S., Nishimura, S., Ito, M., Kato, T., Takeya, H. Discovery of pre-saccharothriolide X from the rare actinomycete *Saccharothrix* sp. The 13th Annual Meeting of Japanese Society for Chemical Biology, Tokyo, Jun. 2018.
- 11) Takeya, H. Microbial metabolites targeting microenvironment: a cell membrane signaling modulator and a hypoxia-response modulator. The 9th Japan-Korea chemical biology symposium, Incheon, Korea, May, 2018. (招待講演)
- 12) 掛谷秀昭. 「シンポジウム：これからの天然物サイエンス」—ケミカルスペース拡充戦略：微生物複合培養法及び PDSS (Precursor-Directed *in situ* Synthesis)法—, 日本農芸化学会 2018 年度大会. 名古屋, 3 月, 2018. (招待講演)
- 13) Lu, S., Nishimura, S., Ito, M., Kato, T., Takeya, H. Expansion of chemical space in saccharothriolides: Precursor-directed *in situ* synthesis (PDSS) in a rare actinomycete *Saccharothrix* sp. Natural Product Discovery & Development in the Genomic Era (Natural Products 2018), Clearwater, FL, USA. Jan. 2018.
- 14) 下村壮人, 尾崎太郎, 杉山龍介, 西村慎一, 浅水俊平, 掛谷秀昭, 尾仲宏康. 複合培養によって生産されるテトラヒドロキノリン化合物の解析. 第 32 回日本放線菌学会大会, 長野, 9 月, 2017.
- 15) 掛谷秀昭. 微生物複合培養法の利活用による創薬ケミカルバイオロジー. 第 12 回化学生態学研究会. 函館, 6 月, 2017. (招待講演)
- 16) Lu, S., Nishimura, S., Ito, M., Kato, T., Takeya, H. Generation of saccharothriolide analogs by precursor-directed *in situ* synthesis (PDSS) and their SAR study. The 12th Annual Meeting of Japanese Society for Chemical Biology, Sapporo, June, 2017.
- 17) 掛谷秀昭. 自然に学び、原理を紐解き、くすりを創る. 日本学術振興会 (JSPS)「日本におけるケミカルバイオロジーの新展開」に関する産学協力研究委員会 (JSPS 第 189 委員会)・H29 年度第 1 回定例会, 東京, 5 月, 2017. (招待講演)

〔図書〕(計 2 件)

- 1) 日本におけるケミカルバイオロジーの新展開第 189 委員会編, ケミカルバイオロジー化合物集, オーム社, 304 ページ (分担・pp82-84), 2019 年.
- 2) 京都大学大学院薬学研究科編, くすりをつくる研究者の仕事—薬のタネ探しから私たちに届くまで, 化学同人, 296 ページ (分担・pp63-82), 2017 年.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

該当なし

取得状況 (計 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/sc-molsci/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

該当なし

### (2)研究協力者

該当なし

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。