

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07136

研究課題名(和文) 潜在的標的分子を指標としたターゲットマイニングによる化合物探索

研究課題名(英文) Compound discovery by target mining using potential target molecules

研究代表者

佐藤 道大 (SATO, Michio)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：10629695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題において、Cladobotryum属真菌が生産する免疫抑制活性を有するFR901483の生合成遺伝子クラスターを同定し、さらにその生合成経路をすべて明らかにすることに成功した(JACS, 143, 132-136, 2021)。加えて、本遺伝子クラスターに存在するFrzK (アミドホスホリボシルトランスフェラーゼ, PPAT)が、生産菌における耐性遺伝子であることを示し、その耐性機構を明らかにすることができた(論文執筆中)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FR901483は、タクロリムスやサイクロスポリンなどの免疫抑制剤とは異なる作用機序を有する化合物として単離されてきた化合物である。しかしながら、どのような作用機序かはまだ明らかになっていなかった。我々は、本化合物の耐性遺伝子を特定し、耐性遺伝子=標的分子であることを明らかにした。このことから、本化合物がどのように免疫抑制活性を示したのかがわかった。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we identified the biosynthetic gene cluster of FR901483, which has immunosuppressive activity produced by Cladobotryum sp. fungi, and further clarified the entire biosynthetic pathway (JACS, 143, 132-136, 2021). In addition, FrzK (amidophosphoribosyltransferase, PPAT) in this gene cluster was shown to be a resistance gene in the producing fungi, and the resistance mechanism was clarified (paper in progress).

研究分野：天然物化学

キーワード：天然物生合成 標的分子 自己耐性 ゲノムマイニング

### 1. 研究開始当初の背景

天然資源から生物活性物質を探索する、いわゆる「モノ取り」は、古くから行われてきているが、単離されやすい化合物はあらかた取り尽くされ、新しい化合物の獲得が困難になってきている。これが大きな要因となり、創薬シーズを古典的手法で獲得する流れは、その費用対効果の低さから、アカデミア・インダストリー問わず衰退してきている。しかしながら、天然から得られる化合物は、人智を超えた構造や活性を有する化合物も多く、その重要性は今なお失われていない。

次世代シーケンサーが普及し、微生物の全ゲノム解析情報が近年、急速に蓄積されてきている。これらゲノム情報により、化合物生産に関わる生合成遺伝子を容易に探索することが可能となっている。また、微生物のゲノム中には獲得されている化合物の数よりもはるかに多い生合成遺伝子が存在するということが明らかとなってきた (Wang CC et al, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2011)。これは、ゲノム上には存在するが、7割以上の生合成遺伝子が休眠状態であることを示している。このような遺伝子を活性化する試みが、近年盛んに行われている。エピジェネティックな制御を緩める、クラスター固有の転写制御因子を利用する、クラスターに存在する遺伝子をすべて異種宿主において発現する等、様々な方法がとられている (Osada H et al, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2016)。また、研究室で培養できる微生物は、存在する微生物のわずか数パーセントしかないとされており、そのような難培養微生物に関しては、メタゲノムライブラリを利用した遺伝子発現が行われている (Brady SF et al, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2012)。このような遺伝子配列の探索はゲノムマイニングと呼ばれる。休眠している遺伝子や、培養できない微生物の代謝産物を知る大きなツールとなってきているが、一方で、どの遺伝子を発現するのか、その選択が問題となっている。ある遺伝子群を発現させても、これまで見つかっている化合物しか見出せない、これまでの「モノ取り」研究と同様に、新しい化合物の獲得は困難なままである。

### 2. 研究の目的

本研究では、微生物とくに糸状菌のゲノム情報というビッグデータを活用し、効率的なゲノムマイニングを行うことで、新しいドラッグリード化合物の獲得を目的とする。微生物の二次代謝産物生合成遺伝子は、ゲノム中の一部に集積したクラスターとなっている。この生合成遺伝子クラスターの中には、化合物の合成に必要な遺伝子だけでなく、産生菌における耐性遺伝子と考えられる遺伝子が存在していることがある。毒性の強い化合物は、産生菌にとっても有害であり、それを回避するための仕組みが当然必要となる。化合物に対する耐性機構は、(1) トランスポーターのような排出ポンプによるもの、(2) 化合物の代謝 (解毒)、(3) 化合物と結合するタンパク質による排出、などが挙げられる。これら耐性機構を担う遺伝子は、生合成遺伝子クラスターに存在することが多い。特に (3) の結合タンパク質は、その化合物の標的分子 (ターゲット) であることが予想される。例えば、糸状菌の一種である *Aspergillus* 属真菌が産生する高脂血症薬として使用されているロバスタチンの生合成クラスターには、その標的である HMG-CoA reductase ホモログが存在している。また、抗がん活性を有するフマギリンの標的分子は、メチオニンアミノペプチダーゼ II (MetAP2) であり、そのクラスターにも MetAP2 ホモログが存在している。

すなわち、クラスターに存在する標的分子を指標にしてゲノムマイニングを行うことで、標的分子と相互作用を持つ化合物の効率的な獲得が可能となる (ターゲットマイニング)。さらに化合物と標的分子の関係が明らかになっているため、これまでの探索研究よりも迅速に創薬研究につながられる。またこの手法を確立することで、培養できない未知の微生物のポテンシャルを効率的に引き出すことも可能となる。本手法は、微生物による天然物生産における一つのブレークスルーとなり得る。

### 3. 研究の方法

本研究課題においては、生合成クラスターに存在する耐性遺伝子 (潜在的標的分子) の機能を

明確にするとともに、標的分子を指標に生合成遺伝子クラスターを探索し、化合物の同定を試みる。前者に関しては、化合物と標的分子の関係が予想されるため、これらの関係性を明らかにする。具体的には、はじめに推定標的分子をクローニングし、大腸菌もしくは出芽酵母を用いて組み換えタンパク質を獲得する。次いで得られたタンパク質を用いて、試験管内にて本来の反応を触媒するかを確認する。加えてタンパク質と対応する化合物との相互作用を解析する。相互作用解析においては、タンパク質-化合物の共結晶、ブルダウンアッセイ、ピアコアや NMR などを利用する。また、本来の標的分子はクラスター内ではなくゲノム中の別の座にコードされているため、それをクローニングしコントロールとして用いる。化合物と二つの標的分子の関係性を明確にすることで、生合成クラスターに存在する推定標的分子の意義を生理学的に証明することができる。表 1 には、化合物とその生合成クラスターが明らかになっているものの中で、耐性遺伝子を有する化合物が示されている。これら化合物と標的分子の解析を行う。

表 1. 天然物とクラスターに存在する推定耐性遺伝子およびその生産糸状菌

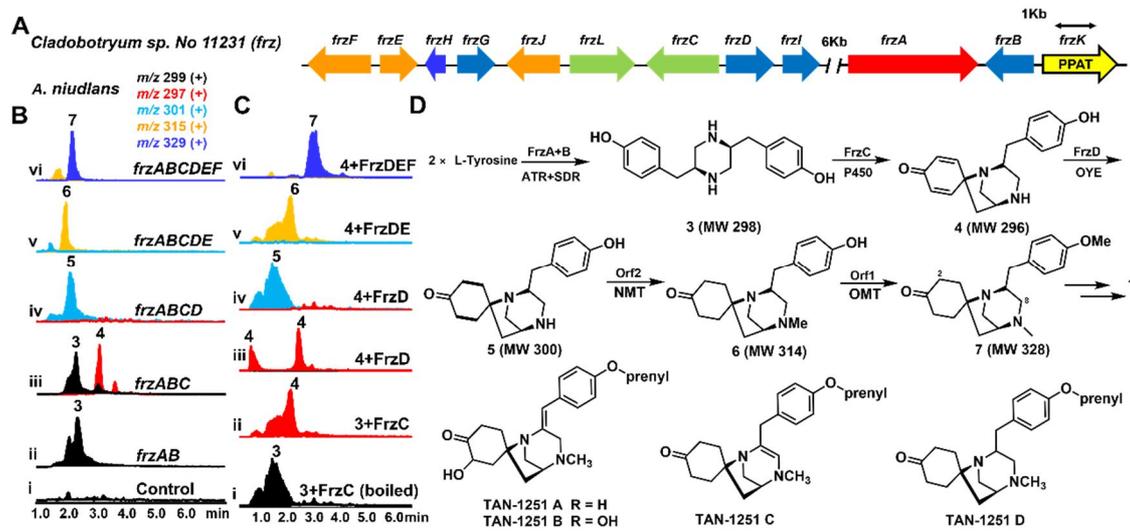
Target	Natural products	Fungal species
HMG-CoA reductase	lovastatin	<i>Aspergillus terreus</i>
MetAP2	fumagillin	<i>A. fumigatus</i>
ATP synthase, ATPase	aurovertin	<i>Metarhizium anisopliae</i>
IMP dehydrogenase	mycophenolic Acid PKS	<i>Penicillium brevicompactum</i>
Histidine kinase-like ATPases	cytochalasin	<i>A. clavatus</i>
G3PDH	heptelidic acid	<i>Trichoderma virens</i>

後者に関しては、化合物が特定されていない未知の生合成クラスターに存在する耐性遺伝子に着目する。我々はこれまでに、耐性遺伝子と考えられる遺伝子を有する生合成クラスターを、様々な真菌ゲノムから探索し、発見している。例えば、U2 というスプライソソームを構成する核内低分子リボヌクレオタンパク質をコードする遺伝子を有するクラスターである。スプライソソームは、標的分子として研究されているが、これを標的とした治療は、臨床的にはまだ確立していない。また、アミドホスホリボシルトランスフェラーゼ (PPAT) を有するクラスターも見出している。本酵素は、プリン生合成の初発段階を担う酵素である。免疫抑制薬であるレフルノミドは、核酸の *de novo* 合成を阻害する。PPAT が耐性遺伝子であるならば、このクラスターが産生する化合物は、免疫抑制薬のドラッグリード化合物への応用が期待できる。これら二つの遺伝子クラスターは、RT-PCR の結果から休眠型であることがすでに明らかとなっている。そこで、遺伝子を有するクラスターを活性化し、化合物の生産を試みる。生産された化合物の構造を明らかにするとともに、化合物の生物活性を明らかにする。

#### 4. 研究成果

我々は、上述した PPAT が耐性遺伝子と考えられる遺伝子クラスターを見出し、本遺伝子クラスターが、免疫抑制活性を有する FR901483 (1) の生合成遺伝子であることを明らかにした (図 1)。本遺伝子クラスターに存在する各遺伝子を糸状菌 *A. nidulans* にすべて導入することにより、化合物 1 の全生合成を達成した (*J. Am. Chem. Soc.*, 2021, 143, 132-136)。このとき、リン酸基転移酵素を除く遺伝子導入株においては、化合物 1 の脱リン酸体の生産量は高かったが、すべての遺伝子を導入した株においては、化合物 1 の生産量は著しく低下した。しかしながら、クラスター中に存在する推定耐性遺伝子の PPAT ホモログ、FrzK を導入することで、この現象を回避することができた。このことから、FrzK は化合物 1 の耐性に関わる酵素であることが明らかとなり、潜在的な標的分子であることが示唆された。

さらに、化合物 1 がどのように PPAT を阻害しているのか、および FrzK が 1 による阻害をどのように回避しているのか、そのメカニズムの解明を目指した。まず、大腸菌由来 PPAT が化合物 1 による活性阻害を受けることを確認し、1 存在下で大腸菌由来 PPAT のタンパク質の結晶化を行い、その構造を解析した。その結果、大腸菌 PPAT と 1 の複合体結晶構造が得られ、その阻害メカニズムを明らかにすることができた (論文執筆中)。また、FrzK と他種生物由来 PPAT のアミノ酸配列のアライメント、FrzK の構造モデルから、1 による阻害活性をどのように回避しているかを推定し、部位特異的変異導入により、その仮説を立証することに成功した (論文執筆中)。



本研究課題において、これまでその阻害剤が見つからない PPAT の阻害剤として R901483 を見出し、その阻害機構を明らかにすることができた。また、これまでに生合成クラスターに存在する耐性遺伝子に言及した研究報告は少なく、その機能を明らかにしたことは、それら遺伝子の生理的意味を明らかにできたという点において、学術的にも重要な知見となった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kobayashi Takuma, Toyoda Takeshi, Tajima Yuya, Kishimoto Shinji, Tsunematsu Yuta, Sato Michio, Matsushita Kohei, Yamada Takanori, Shimamura Yuko, Masuda Shuichi, Ochiai Masako, Ogawa Kumiko, Watanabe Kenji, Takamura-Enya Takeji, Totsuka Yukari, Wakabayashi Keiji, Miyoshi Noriyuki	4. 巻 34
2. 論文標題 o-Anisidine Dimer, 2-Methoxy-N4-(2-methoxyphenyl) Benzene-1,4-diamine, in Rat Urine Associated with Urinary bladder Carcinogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Research in Toxicology	6. 最初と最後の頁 912 ~ 919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.0c00536	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zhou Tao, Hirayama Yuichiro, Tsunematsu Yuta, Suzuki Nanami, Tanaka Seiji, Uchiyama Nahoko, Goda Yukihiro, Yoshikawa Yuko, Iwashita Yuji, Sato Michio, Miyoshi Noriyuki, Mutoh Michihiro, Ishikawa Hideki, Sugimura Haruhiko, Wakabayashi Keiji, Watanabe Kenji	4. 巻 143
2. 論文標題 Isolation of New Colibactin Metabolites from Wild-Type Escherichia coli and In Situ Trapping of a Mature Colibactin Derivative	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 5526 ~ 5533
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c01495	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsunematsu Yuta, Maeda Naoya, Sato Michio, Hara Kodai, Hashimoto Hiroshi, Watanabe Kenji, Hertweck Christian	4. 巻 143
2. 論文標題 Specialized Flavoprotein Promotes Sulfur Migration and Spiroaminal Formation in Spirochlorine Biosynthesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 206 ~ 213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.0c08879	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sato Michio, Kishimoto Shinji, Yokoyama Mamoru, Jamieson Cooper S., Narita Kazuto, Maeda Naoya, Hara Kodai, Hashimoto Hiroshi, Tsunematsu Yuta, Houk Kendall N., Tang Yi, Watanabe Kenji	4. 巻 4
2. 論文標題 Catalytic mechanism and endo-to-exo selectivity reversion of an octalin-forming natural Diels-Alderase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Catalysis	6. 最初と最後の頁 223 ~ 232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41929-021-00577-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Zhang Zhuan, Tamura Yui, Tang Mancheng, Qiao Tianzhang, Sato Michio, Otsu Yoshihiro, Sasamura Satoshi, Taniguchi Masatoshi, Watanabe Kenji, Tang Yi	4. 巻 143
2. 論文標題 Biosynthesis of the Immunosuppressant (?) -FR901483	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 132 ~ 136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.0c12352	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Watanabe Daiki, Murakami Haruka, Ohno Harumi, Tanisawa Kumpei, Konishi Kana, Tsunematsu Yuta, Sato Michio, Miyoshi Noriyuki, Wakabayashi Keiji, Watanabe Kenji, Miyachi Motohiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Association between dietary intake and the prevalence of tumourigenic bacteria in the gut microbiota of middle-aged Japanese adults	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-72245-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshikawa Yuko, Tsunematsu Yuta, Matsuzaki Nobuo, Hirayama Yuichiro, Higashiguchi Fumi, Sato Michio, Iwashita Yuji, Miyoshi Noriyuki, Mutoh Michihiro, Ishikawa Hideki, Sugimura Haruhiko, Wakabayashi Keiji, Watanabe Kenji	4. 巻 73
2. 論文標題 Characterization of Colibactin-Producing Escherichia coli Isolated from Japanese Patients with Colorectal Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 437 ~ 442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7883/yoken.JJID.2020.066	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uchikawa Misaki, Kato Mai, Nagata Akika, Sanada Shunsuke, Yoshikawa Yuto, Tsunematsu Yuta, Sato Michio, Suzuki Takuji, Hashidume Tsutomu, Watanabe Kenji, Yoshikawa Yuko, Miyoshi Noriyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Elevated levels of proinflammatory volatile metabolites in feces of high fat diet fed KK-Ay mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-62541-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawanishi Masanobu, Shimohara Chiaki, Oda Yoshimitsu, Hisatomi Yuuta, Tsunematsu Yuta, Sato Michio, Hirayama Yuichiro, Miyoshi Noriyuki, Iwashita Yuji, Yoshikawa Yuko, Sugimura Haruhiko, Mutoh Michihiro, Ishikawa Hideki, Wakabayashi Keiji, Yagi Takashi, Watanabe Kenji	4. 巻 42
2. 論文標題 Genotyping of a gene cluster for production of colibactin and in vitro genotoxicity analysis of Escherichia coli strains obtained from the Japan Collection of Microorganisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes and Environment	6. 最初と最後の頁 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41021-020-00149-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sarmales-Murga Christopher, Akaoka Fumito, Sato Michio, Takanishi Jun, Mino Takashi, Miyoshi Noriyuki, Watanabe Kenji	4. 巻 73
2. 論文標題 A new class of dimeric product isolated from the fungus Chaetomium globosum: evaluation of chemical structure and biological activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 320 ~ 323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-020-0281-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐藤 道大、岸本 真治、Cooper S. Jamieson、原 幸大、橋本 博、恒松 雄太、Houk N. Kendall、Yi Tang、渡辺 賢二
2. 発表標題 Diels-Alderaseのジアステレオ選択性および生成物阻害回避メカニズムの解明
3. 学会等名 第 62 回 天然有機化合物討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤 優衣、佐藤 道大、籠浦 倫美、恒松 雄太、竹仲 由希子、棚橋 孝雄、渡辺 賢二
2. 発表標題 共生型子囊菌Pyrenula sp.に由来するpyrenulic acid類の生合成研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田村優依, 佐藤道大, 谷口昌要, 笹村智司, 大津嘉弘, 永井浩二, 渡辺賢二
2. 発表標題 免疫抑制活性物質FR901483の生合成研究
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村優依, 佐藤道大, 谷口昌要, 笹村智司, 大津嘉弘, 永井浩二, 渡辺賢二
2. 発表標題 免疫抑制活性物質FR901483の生合成研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>免疫抑制活性物質FR901483の全生合成に成功  <a href="https://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/index.php/topic-res-res/1271-2020-12-30">https://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/index.php/topic-res-res/1271-2020-12-30</a></p>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	渡辺 賢二  (Watanabe Kenji)  (50360938)	静岡県立大学・薬学部・教授    (23803)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------