

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：32680

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16401

研究課題名(和文)放線菌由来ポリケチドの多様性創出に関わる立体選択的エノイル還元機構の解明

研究課題名(英文) Stereoselective enoyl reduction mechanism involved in diversity creation in polyketides from *Streptomyces* sp..

研究代表者

石川 和樹 (ISHIKAWA, Kazuki)

武蔵野大学・薬学部・助教

研究者番号：30779822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、放線菌由来のBIQ系ポリケチドの生合成経路上に存在するエノイル還元酵素群の機能解明を目的に行った。その結果、アクチノロジン生合成に関するエノイル還元酵素ActVI-2が高い立体選択性を有した反応を触媒することを明らかにする出来た。さらに、分子モデリングソフトによる解析により反応機構の一部を明らかにすることが出来た。また、ActVI-2類縁酵素として、ActVI-2とは逆の立体選択性示す酵素を見出しており、今後詳細な機能解析を行うことで、エノイル還元酵素群の反応機構の解析に大いに寄与することが可能と考えている。また、これらの研究結果の一部は、国際雑誌や国内学会で発表を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、エノイル還元酵素としてActVI-2の機能を明らかにした。これにより、これまでに未解明であったACT生合成経路の一工程を解明することができた。さらに、本酵素が厳密な立体制御機構を有していたことから、最終生成物であるACTの立体化学の構築に大きく関与していることを明らかにすることができた。ACTは、放線菌由来の二次代謝産物研究においてモデル化合物として世界中で広く研究対象とされている。そのため、ACT生合成酵素の同定は、ACT生合成研究だけでなく、これらの研究を基礎とする多くの研究に新たな知見を与えることで、将来的な研究の発展に寄与することができたと考えている。

研究成果の概要(英文)：This study was performed to elucidate the functions of a group of enoyl reductases on the biosynthetic pathway of BIQ-based polyketides from actinomycetes. As a result, it was clarified that ActVI-2, an enoyl reductase involved in actinorhodine biosynthesis, catalyses the reaction with high stereoselectivity. Furthermore, part of the reaction mechanism was clarified by analysis using molecular modelling software. In addition, an enzyme which is an ActVI-2 analogous enzyme showed opposite stereoselectivity to ActVI-2 has been found, and detailed functional analysis in the future will greatly contribute to the analysis of the reaction mechanism of the enoyl reductase group. Some of the results of these studies have been published in international journals and at national conferences.

研究分野：天然物化学

キーワード：Streptomyces enoyl reductase actinorhodin polyketide

1. 研究開始当初の背景

ベンゾイソクロマンキノン (BIQ) 系ポリケタイドは、抗菌活性を含む有用な生理活性を示すことから、近年、新薬開発への応用を目指した生合成経路の解明が試みられている (Taguchi et al, *Chem. Biol.*, 2013)。特に、放線菌由来 BIQ 系ポリケタイドの基本骨格の構築に参与する Type II 型ポリケタイド合成酵素 (PKS) の *in vitro* 解析が盛んに行われてきた (Ichinose et al, *ChemBioChem*, 2017)。一方、BIQ 系ポリケタイドの多様性を創出する生合成後半では、生合成酵素遺伝子は推定されているが、生合成中間体の不安定さ等から酵素機能の解明は進んでいない。特に、DNPA の立体選択的なエノイル還元反応は、最終生成物の BIQ 骨格の 15 位に不斉炭素を構築することにより、BIQ 系ポリケタイドの構造的多様性を創出する重要な分岐点である (図 1)。さらに、本反応は、BIQ 系ポリケタイドのアクチノロジン (ACT) やグラナチシン (GRA) 等の生合成経路に共通して存在しており生合成において重要な酵素であることが推測されるにも関わらず、本酵素の機能解析は行われておらず、還元機構についても検討が行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、エノイル還元酵素群を用いた非天然型 BIQ 系ポリケタイドの創製を目指し、本酵素群による立体選択的なエノイル還元機構を解明する。研究期間内には、エノイル還元酵素群の発現システムの構築、酵素機能解析およびアミノ酸改変体の解析を通じ、本酵素群の反応基質に対する立体化学認識能を含めたエノイル還元機構を分子レベルで明らかにすることを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

本研究では、上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、エノイル還元酵素群の機能解析および本酵素群による立体選択的なエノイル還元機構の解明を目的に、下記の方法 (Step1-4) で以下のことを明らかにする。

[Step 1] ACT 生合成経路由来 ActVI-2 の機能解析

ActVI-2 によるエノイル還元機構の解明のために、精製 ActVI-2 の機能解析 (至適 pH/温度、基質特異性など) を行う。まず、精製 ActVI-2 と (S) との酵素実験により至適 pH/温度の検討を行う。さらに、(R)-DNPA との酵素実験を行い、ActVI-2 の反応基質に対する立体選択性の検討を行う。基質特異性の検討に用いる基質は、生合成酵素遺伝子を導入した放線菌の培養抽出液から取得する。さらに、反応生成物の標準品は、有機化学的手法により、(S) または (R)-DNPA から誘導体化後、HPLC などを用いて精製する。

[Step 2] エノイル還元酵素群の発現と精製

エノイル還元酵素の機能解析を行うため、大腸菌を用いた組換え酵素の発現システムの構築を行う。まず、推定エノイル還元酵素遺伝子 (*actVI-4*, *med9*, *gra28*, *gra30*) を大腸菌用のタンパク発現用ベクターに導入し、酵素発現用ベクターを構築する。これらは、タンパク発現用大腸菌株に形質転換し、得られた形質転換体を用いて酵素の発現・精製を行う。発現・可溶化がうまく進まない場合は、発現用宿主やコドンの最適化を行う。

[Step 3] エノイル還元酵素 ActVI-2 の機能解析

エノイル還元酵素群による反応機構の解明のために、Step 2 で精製した酵素を用いて、反応に必要な補酵素の決定および機能解析を行う。酵素反応液の HPLC 分析により反応生成物が検出された場合には、LCMS や NMR を用いて構造解析を行う。エノイル還元活性が確認出来ない場合は、Fe²⁺などの金属イオンや異なる補酵素を添加し、反応への影響を検討する。

[Step 4] エノイル還元酵素 ActVI-2 の部分的アミノ酸変異体の作製および機能解析

エノイル還元酵素 ActVI-2 の詳細な反応機構の解明のために、Step 3 までに用いたエノイル還元酵素群のアミノ酸改変体を作製する。分子モデリングソフト MOE を用いた各エノイル還元酵素の反応基質とのドッキングシミュレーションや立体構造の比較により、酵素による反応基質の立体化学認識能などに関与すると推測される候補アミノ酸残基を探索する。反応に関与する可能性のあるアミノ酸のアミノ酸変異体は、(S)、(R)-DNPA や生合成中間体に対する酵素活性を評価する。これにより、立体選択的なエノイル還元活性に関与するアミノ酸残基を特定し、本酵素群の反応機構を明らかにする。

4. 研究成果

エノイル還元酵素 ActVI-2 は、*Rhodococcus erythropolis* L88 株を発現用宿主として用い、組換え酵素として取得した (図 1B)。これを用いて緩衝液中で (S)-DNPA に対するエノイル還元能を評価した結果、(S)-DNPA の消失に伴う DDHK の生成が観察された (図 1C)。さらに、本酵素のさらなる機能解析を行った結果、本酵素によるエノイル還元活性は、至適 pH が 6.5 で補酵素 NADPH を必要とすることが明らかになった。また、基質特異性を評価した結果、15 位立体異性体である (R)-DNPA に対してはエノイル還元を示したが、ACT 生合成関連化合物である DMAC に対しては活性を示さなかった。

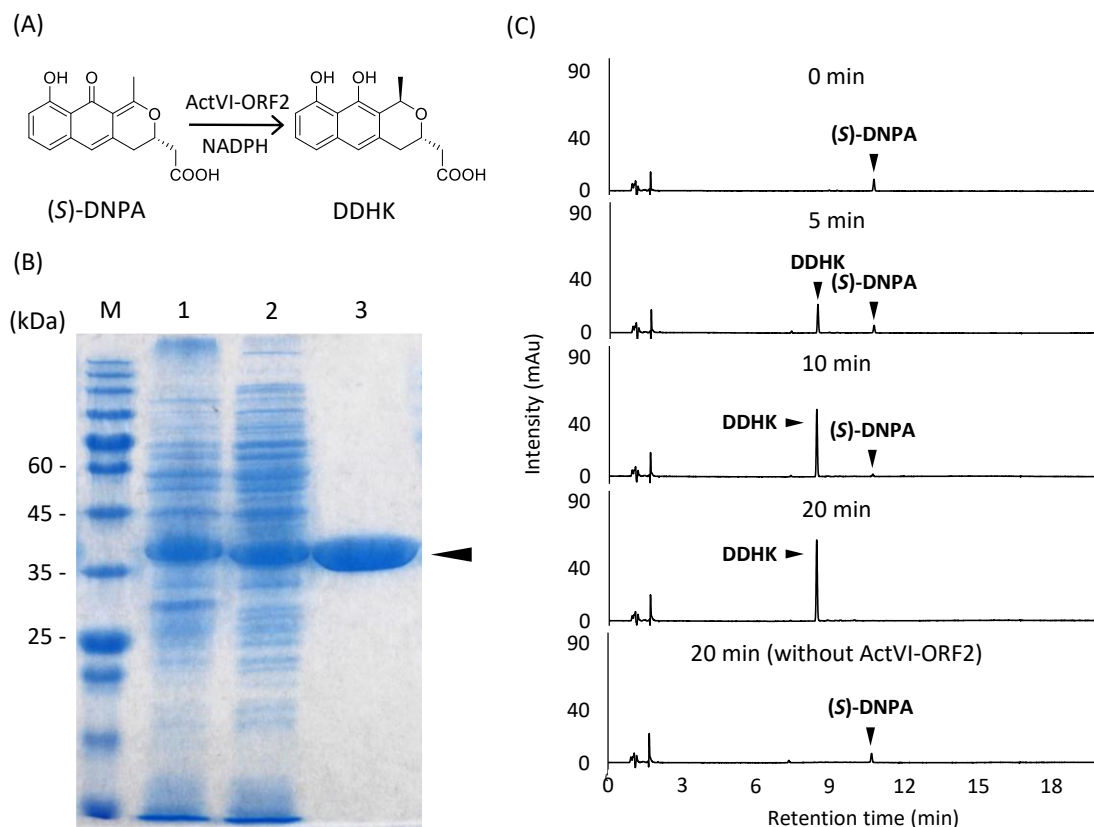
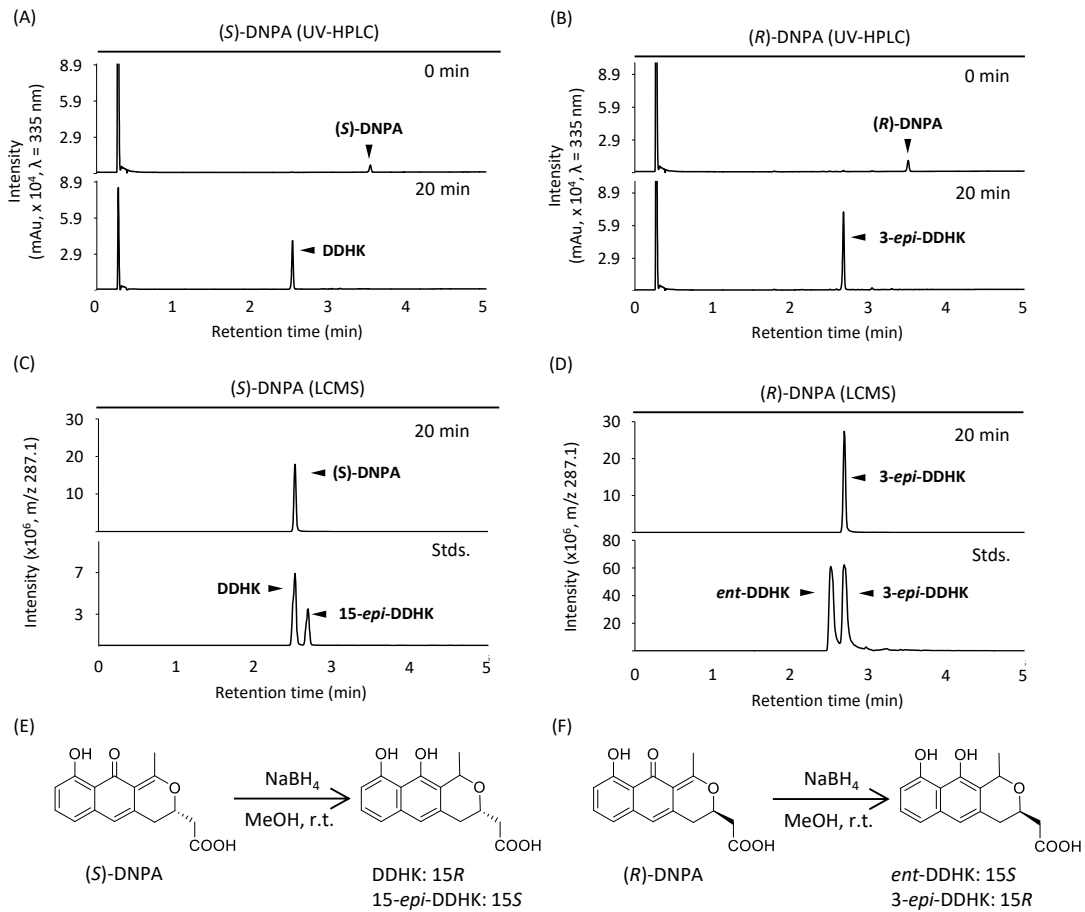


図 1. ActVI-2 による (S)-DNPA のエノイル還元

ActVI-2 のエノイル還元能の反応機構解明を目的に、(S)または(R)-DNPA の化学的還元反応によって作製した 4 種類の DDHK 誘導体を標準品として (図 2E, F)、ActVI-2 による生成物の LCMS による詳細な解析を行った。その結果、LCMS 分析においても (S)-DNPA の生成物として DDHK のみが検出され、15-*epi*-DDHK は全く検出されなかった (図 2A, C)。一方、(R)-DNPA の生成物としても 3-*epi*-DDHK のみが検出され、*ent*-DDHK は全く検出されなかった (図 2B, D)。以上の結果、ActVI-2 のエノイル還元能は、DNPA の 3 位の立体化学に影響されず、15 位を R 体に還元することが明らかになった。LCMS 分析から立体異性体が検出されなかった結果から、ActVI-2 のエノイル還元立体選択性は厳密に制御されていることが明らかになった。以上の実験結果から、ActVI-2 がエノイル還元酵素として、ACT 生合成経路において ACT の立体制御に大きく関与していることを明らかにすることができた。また、ActVI-2 と共にエノイル還元に関与することが推測されていた ActVI-4 についても、上記の ActVI-2 と同様の機能解析を行ったが、エノイル還元能は観察されなかった。一方、ACT 以外の BIQ 系ポリケチドであるメダマイシン (MED) やグラナチシン (GRA) の生合成に関与するエノイル還元酵素 (Med9, Gra28, Gra30) については、推測される酵素遺伝子の酵素発現および機能解析を行った。Med9 については、大腸菌や *Rhodococcus* などの酵素発現用宿主を用いて組換え酵素の取得を試みたが、機能解析を行うために十分な酵素を取得することは出来なかった。また、Gra28/30 については、大腸菌を用いることで組換え酵素を取得することは出来たが、(S)および(R)-DNPA に対してエノイル還元能を示さなかった。これらのエノイル還元酵素群の探索は引き続き進めていく予定である。



エノイル還元酵素として同定出来た ActVI-2 による反応機構の解析を行うため、分子モデリングソフト MOE を用いた *in silico* 解析を行った (図 3)。その結果、ActVI-2 によるエノイル還元において、重要と推測される候補アミノ酸を複数選抜した。そこで、これらのアミノ酸のエノイル還元活性への寄与を評価するため、対象のアミノ酸を Ala に置換したアミノ酸変異酵素を作製した。作製したアミノ酸変異酵素のエノイル還元能を評価した結果、トリプトファンなどの複数のアミノ酸が反応に寄与していることが明らかになった。特に、反応基質である (S)-DNPA のカルボン酸と相互作用していたトリプトファンは、酵素内において基質の位置を固定することで、エノイル還元活性に大きく寄与していることが明らかになった。今後は、反応に関与する可能性があるアミノ酸に注目した分子モデリング解析を行うことで、ActVI-2 の立体制御機構を解明する予定である。

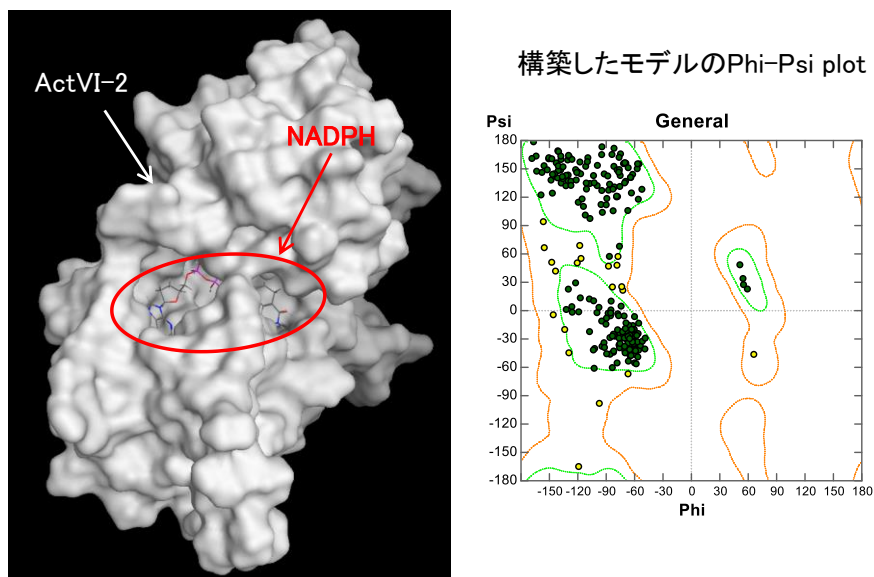


図 3. 分子モデリングソフト用いて構築した ActVI-2 と NADPH の分子モデル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishikawa Kazuki, Hashimoto Makoto, Komatsu Kunpei, Taguchi Takaaki, Okamoto Susumu, Ichinose Koji	4. 巻 66
2. 論文標題 Characterization of stereospecific enoyl reductase ActVI-ORF2 for pyran ring formation in the actinorhodin biosynthesis of <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 128727 ~ 128727
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2022.128727	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 ○石川 和樹, 橋元 誠, 市瀬 浩志
2. 発表標題 Actinorhodin生合成に関与する 立体特異的エノイル還元酵素の機能解析（第2報）
3. 学会等名 日本薬学会第141年会（広島）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○橋本実里, 石川和樹, 脇田知希, 橋元誠, 市瀬浩志
2. 発表標題 Granaticin 生合成の立体化学を制御するケト還元酵素 Gra-6 の機能解析
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ○小松薫平, 石川和樹, 橋元誠, 田口貴章, 市瀬浩志
2. 発表標題 ベンゾイソクロマンキノン系抗生物質生合成における立体特異的エノイル還元酵素の機能解析
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 ○山根万奈, 石川和樹, 橋元誠, 田口貴章, 市瀬浩志
2. 発表標題 ベンゾイソクロマンキノン系化合物生産株を用いた放線菌代謝能の活用
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 ○脇田 知希, 石川 和樹, 橋元 誠, 田口 貴章, 市瀬 浩志
2. 発表標題 Actinorhodin合成のin vitro再構成に向けた酵素反応条件の最適化
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ○市瀬 浩志, 田口 貴章, 淡川 孝義, 橋元 誠, 石川 和樹, 片川 和明, 熊本 卓哉, 大西 康夫, 岡本 晋
2. 発表標題 アクチノロジン合成に関与する二機能性酵素の同定と特性解析
3. 学会等名 第61回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 ○塩谷 瑠奈, 石川 和樹, 橋本 実里, 橋元 誠, 田口 貴章, 市瀬 浩志
2. 発表標題 Actinorhodin合成のin vitro再構成に向けた酵素反応条件の最適化 (第2報)
3. 学会等名 日本薬学会第143年会 (札幌)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------