

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05872

研究課題名（和文）ゲノムマイニングと生合成酵素阻害剤処理を組み合わせた手法による新規化合物の探索

研究課題名（英文）Natural product discovery by a combination of genome mining and biosynthetic enzyme inhibitor

研究代表者

加藤 直樹（Kato, Naoki）

摂南大学・農学部・准教授

研究者番号：90442946

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）：天然物の創薬資源としての重要性は不変である。昨今の新規化合物発見の困難さを克服するための鍵が、微生物ゲノムに眠る多数の二次代謝物生合成遺伝子クラスター（BGC）である。ゲノムマイニングに生合成酵素阻害剤処理を組み合わせた新たな探索系を構築することが本研究のゴールであり、デカリン合成酵素Fsa2とその生合成経路をモデルに研究を実施し、本手法が有効であることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により構築したゲノムマイニングに二次代謝物生合成酵素阻害剤処理を組み合わせた探索系が、特定の部分構造を有する天然物を効率的な探索・収集に有効で、かつ生合成遺伝子クラスターへの紐付けも容易であることを実証した。よって本手法が今後、新規天然物探索の新たな手法の1つとなることが大いに期待できる。

研究成果の概要（英文）：Natural Product is an important resource in drug discovery. To overcome difficulties in finding new compounds, exploration of the biosynthetic gene clusters (BGCs) of natural products, which are rich in microbial genomes, is necessary. Aim of this study is to establish a new method to find natural products and their BGCs by a combination of genome mining and biosynthetic enzyme inhibitor. We demonstrated that this method was useful for identifying decalin compounds and their BGCs.

研究分野：応用微生物学

キーワード：生合成遺伝子クラスター 糸状菌二次代謝 天然物生合成 デカリン合成酵素 阻害剤

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

天然物は重要な創薬資源である。ペニシリンやアベルメクチンに代表される微生物由来の天然物は医薬・農薬として広く利用されてきた。昨今の多剤耐性菌の出現や感染症の拡大などの問題解決においても、天然物の探索源として重要性は不変である。しかしながら近年、新規化合物の発見が非常に困難となっており、新たな探索法が模索されている。その探索方法としては、生物活性を指標とした分画による方法や構造新規性を指向した方法などいわゆる「物取り」に立脚した方法、ゲノムマイニングや遺伝子改変、化合物処理による生産誘導など、微生物ゲノムが秘める生合成能力に着目した方法が挙げられる。どの手法も一長一短あるが、新しいアイデアを組み込むことで効率的な新規化合物探索ができるはずである。

天然物の生合成に関与する遺伝子はゲノム上で互いに隣接して存在しており、遺伝子クラスターと呼ばれている。微生物、特に放線菌や糸状菌ゲノムの中には、この生合成遺伝子クラスター(BGC)が数十個含まれている。ゲノム解読のコストが格段に下がり、公的データベースには大量の配列情報が登録されている。2ndFind や AntiSMASH などの解析ツールを用いることで、容易に多数の BGC 配列を抽出することができる。しかしながら、代謝物との紐付けがなされている BGC はごく一部に限られており、大多数はどんな代謝物の BGC か不明である。よって、この未開拓遺伝子資源を有効活用することは、新規化合物探索を進める上で重要であった。

2. 研究の目的

本研究のゴールは、ゲノムマイニングと生合成酵素阻害剤処理を組み合わせた新たな探索法を構築し、それを用いて新規化合物とその BGC を発見することであり、本研究では、デカリン合成酵素 Fsa2 とその生合成経路をモデルに、新規化合物とその BGC の取得を目的とした。

外部からの小分子化合物刺激による微生物代謝物の生産誘導は、対象微生物の遺伝子組換えを必要とせず、より広範な適用が期待できることから、当該分野におけるトピックスの 1 つとなっていた。そのようなエリシター分子の標的は、転写因子やエピジェネティクス制御に関わる因子などである。また、複数の BGC の生産が誘導されるが、どんな化合物が生産誘導されるかは予測困難であることが多い。それに対して、本研究では、生合成酵素阻害剤を探索に用いた。阻害剤により阻害される酵素を含む生合成経路のみが影響される点で、上述のエリシター分子より効果は限定的であることが想定されるが、中央代謝経路や他の二次代謝経路に影響を及ぼすことなく、特定の生合成経路の酵素を阻害することができれば、その部分構造を有する天然物の生産菌を効率的に探索・収集できることが期待された。

阻害剤の標的とする生合成酵素は、HIV インテグラーゼ阻害物質エキセチンに代表されるデカリン含有 2-ピロリドン化合物の生合成経路において働くデカリン合成酵素 Fsa2 とした。本酵素ファミリーは立体選択的な分子内 Diels-Alder 反応を触媒し、デカリンの立体化学を制御する鍵酵素であり、これまでの研究で見出した特異的阻害剤を研究に用いた。

3. 研究の方法

(1) 生合成酵素阻害剤の同定；デカリン合成酵素 Fsa2 とそのホモログ Phm7 を用いて、その阻害剤を探索した。Phm7 の基質および産物と類似した部分構造を有する市販の小分子化合物を対象に、マイクロスケール熱泳動アッセイによる Phm7 リガンドのスクリーニングを行い、ヒット化合物を取得した。次いでその阻害効果を *in vitro* 酵素アッセイ系、および培養実験にて検証した。さらには、Phm7 との共結晶構造解析を行い、その結合部位の解析を行った。

(2) 生合成酵素阻害剤を用いたスクリーニング系の構築；これまでの研究で収集したデカリン化合物生産菌を用いて検証実験を行った。デカリン合成酵素阻害剤の有無でプレート培養、および液体培養を行い、その生産が阻害されることを確認した。生育や形態、他の代謝に影響を与えない阻害剤濃度を検討し、培養条件を最適化を行った。

(3) ゲノムマイニングによる候補 BGC の絞り込み；Fsa2 配列をクエリに blast 検索を行い、公的データベースから Fsa2 ホモログを含む BGC を収集した。配列相同性ネットワーク(SSN)解析を行うことで、Fsa2 ホモログ間の相同関係を可視化した。相同性の高い配列で形成されるグループを構成する BGC は同一または似た骨格の代謝物を作っている可能性が高いので、代謝物との紐付け済み BGC を含むクラスターは除外した。BGC と紐付けされていない既知化合物、または新規化合物の BGC から構成されるクラスターを本研究の標的とした。

(4) 新規化合物とその BGC の探索；土壌単離糸状菌約 1,500 株を探索源に、項目 2 で構築した系を用いてデカリン化合物生産菌を探索した。阻害剤の有無で培養した代謝物パターン変化を基に候補菌株を選定した。系統的にレアな候補株についてゲノム解読を実施した。大量培養し、目的化合物を分離精製し、各種機器分析により構造を決定した。候補 BGC の生合成への関与をノックアウト実験により検証した。

4. 研究成果

(1) 阻害剤スクリーニングを行った結果、*p*-メンタン誘導体が Phm7 および Fsa2 に結合すること

を見出した。フォマセチン生産菌 *Pyrenochaetopsis* sp. RK10-F058 株に由来する *phm7* 欠失株の菌系から細胞抽出液を用いた *in vitro* 酵素アッセイ系を用いることで、この化合物が濃度依存的に酵素活性を阻害すること、培養液に添加することでフォマセチン、エキセチンの生産を阻害することを確認した。さらには、本阻害剤と Phm7 との共結晶構造解析を行い、酵素を構成する2つのβ-ドメインの間に存在する基質結合ポケットの底部に化合物が結合することを見出した(図1)。

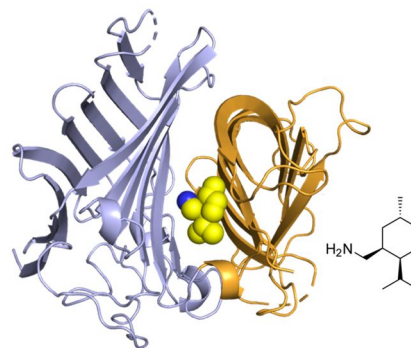


図1 Phm7 と阻害剤との共結晶構造

(2) デカリン合成酵素 Fsa2 について SSN 解析を行い、Fsa2 ホモログを含む BGC をその相同性から分類し、代謝物との紐付けがされていない未解析 BGC 群を見出した。さらに、当該 BGC を保持する糸状菌株のノックアウト実験を行うことで、BGC との紐付けがなされていないデカリン化合物の BGC を特定した(図2A)。

(3) 阻害剤処理による新規探索法の Proof-of-concept 実験として、これまでに取得してきたデカリン化合物生産菌5株を用いて、デカリン合成酵素阻害剤の培地への添加により、標的とするデカリン化合物の生産が阻害されることを確認した(図2B)。

(4) 項目1で確立した培養条件を用い、土壌分離糸状菌を対象に阻害剤添加により代謝物生産パターンの変化する菌株の探索を行った。阻害剤添加により生産が阻害された菌株の中から、系統分類的にレアな糸状菌株についてのゲノム解読を実施し、推定デカリン化合物 BGC を保持する糸状菌株を複数取得した。さらには、そのうちの1株が新規デカリン化合物の生産菌であることを突き止めた。

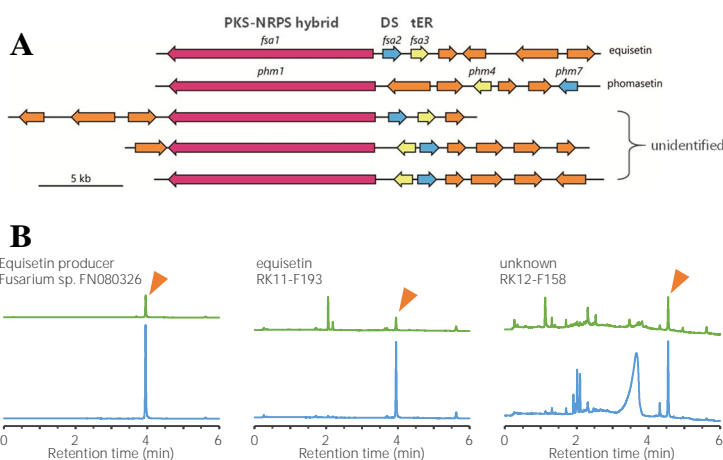


図2 SSN 解析により見出したデカリン化合物候補 BGC (A) と、阻害剤処理によるデカリン化合物の生産阻害 (B)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Nogawa Toshihiko, Kato Naoki, Shimizu Takeshi, Okano Akiko, Futamura Yushi, Takahashi Shunji, Koshino Hiroyuki, Osada Hiroyuki	4. 巻 76
2. 論文標題 Wakodecaline C, new tetrahydrofuran-fused decalin metabolite isolated from fungus <i>Pyrenochaetopsis</i> sp. RK10-F058	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 346-350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-023-00613-2	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 -

1. 著者名 Fujiyama Keisuke, Kato Naoki, Re Suyong, Kinugasa Kiyomi, Watanabe Kohei, Takita Ryo, Nogawa Toshihiko, Hino Tomoya, Osada Hiroyuki, Sugita Yuji, Takahashi Shunji, Nagano Shingo	4. 巻 60
2. 論文標題 Molecular Basis for Two Stereoselective Diels-Alderases that Produce Decalin Skeletons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 22401 ~ 22410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202106186	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤直樹, 野川俊彦, 海老原佳奈, 二村友史, 松田一彦, 丹羽隆介, 高橋俊二, 長田裕之
2. 発表標題 遺伝子改変糸状菌より収集したデカリン含有テトラミン酸化合物の構造活性相関
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤直樹, 藤山敬介, 永野真吾, 高橋俊二
2. 発表標題 デカリン合成酵素の阻害剤同定と共結晶構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤直樹、藤山敬介、永野真吾、高橋俊二
2. 発表標題 立体選択的[4+2]環化付加反応を触媒するデカリン合成酵素の阻害剤同定
3. 学会等名 第20回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤山 敬介、加藤 直樹、李 秀栄、衣笠 清美、渡邊 康平、滝田 良、野川 俊彦、日野 智也、長田 裕之、杉田 有治、高橋 俊二、永野 真吾
2. 発表標題 立体選択的Diels-Alder反応によりデカリン骨格を構築する酵素の分子基盤
3. 学会等名 第63回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤直樹、藤山敬介、野川俊彦、長田裕之、永野真吾、高橋俊二
2. 発表標題 デカリン合成酵素Phm7およびFsa2のin vitroアッセイ系の構築
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>応用微生物学研究室・摂南大学農学部 https://www.setsunan.ac.jp/~amblab_k/index.html</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
--	---------------------------	-----------------------	----

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