

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22700

研究課題名（和文）ヌクレオシド天然物の生合成におけるヘテロ原子導入機構の解明

研究課題名（英文）Investigation into the heteroatom incorporation into nucleoside natural products

研究代表者

牛丸 理一郎 (Ushimaru, Richiro)

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・助教

研究者番号：10873648

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、放線菌 *Streptomyces calvus* T-3018 が生産するヌクレオシド天然物 nucleocidin の生合成経路における、リボース骨格へのフッ素原子の導入および、スルファメート部位の形成を含む生合成経路の解明を目的とし、遺伝子破壊実験と *in vitro* 酵素反応解析を計画した。生合成遺伝子クラスターに含まれる遺伝子を網羅的に破壊することにより、生合成に必須である遺伝子を同定し、生合成機構を提唱した。生合成を担うと考えられる酵素を可溶性タンパク質として大腸菌または放線菌から異種発現、精製し、生合成初期段階における酵素の機能を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヌクレオシド骨格は抗ウイルス薬や抗生物質などの医薬品に頻りにみられる化学構造であり、生物活性の発現に重要な役割を果たしている。本研究により得られた生合成情報をもとにヘテロ原子を含む希少ヌクレオシド天然物の新規生合成経路や新規酵素の発見が期待できる。また、同定した生合成酵素あるいは適切なアミノ酸置換を施した酵素変異体を用いることにより新規生物活性ヌクレオシド化合物の創出も期待できる。

研究成果の概要（英文）：Genes in the nucleocidin biosynthetic gene cluster were individually deleted by genetic manipulation. Enzymes responsible for the initial steps during the biosynthesis were characterized by *in vitro* assays. Based on the results, a possible biosynthetic pathway has been proposed.

研究分野：天然物化学

キーワード：天然物生合成 ヌクレオシド天然物

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

微生物由来のヌクレオシド二次代謝産物は構造的多様性に富み、抗菌、抗がん、抗ウイルス活性など様々な生物活性を示すため、医薬品開発における利用が期待されている。Streptomyces calvus T-3018 が生産する nucleocidin は 4-フルオロリボースを基本骨格とし、また一級スルファメート部位 (R-OSO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) を側鎖として持つ極めてユニークなヌクレオシド天然物である。Nucleocidin はフッ素原子を含む数少ない天然物の一つであることから、古くからその構造と生物活性に興味を持たれてきたが、その生合成経路の詳細は未だ明らかになっていない。特に、どのようにフッ素原子がリボース骨格に組み込まれるのか、またどのようにスルファメート部位が形成するのかは不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、nucleocidin の生合成経路における、リボース骨格へのフッ素原子の導入および、スルファメート部位の形成に関わる酵素群を同定し、それらの触媒機能を解明することを目的とした。天然に存在する炭素-フッ素結合形成を触媒する酵素は、S-アデノシル-L-メチオニンとフッ素アニオンを基質として 5'-フルオロ-5'-デオキシアデノシンを合成する fluorinase が唯一報告されている。一方、nucleocidin 生産菌 S. calvus T-3018 はこの酵素をコードする遺伝子を持たないため、nucleocidin 生合成におけるヌクレオシド骨格のフッ素化については大部分が謎である。さらに、一級スルファメートは硫酸エステルとアミン基質の縮合によって形成されると予想されるが、それに関与する酵素群は、他の天然物生合成経路においては一切報告されていない。したがって、本提案における nucleocidin の生合成研究では、新機能を持つ酵素群の発見が大いに期待される。

### 3. 研究の方法

Nucleocidin の生合成路を明らかにするために放線菌 Streptomyces calvus T-3018 を用いて複数の生合成遺伝子を破壊し、破壊株の代謝物を HPLC、LCMS によって解析する。また生合成酵素を大腸菌または放線菌から異種発現、精製し、in vitro 酵素反応解析を行なう。その結果に基づき Nucleocidin の予想生合成経路を提唱する。

### 4. 研究成果

まずはじめに、報告されている条件下で Streptomyces calvus T-3018 を培養し、Nucleocidin の生産を試みた。HPLC や LCMS によって培養液を解析したが、Nucleocidin は検出されなかった。そこで、S. calvus T-3018 中の nucleocidin 生合成クラスターを手がかりに、nucleocidin を生産しうる、放線菌株を探索した。その結果、Streptomyces aureorectus DSM 41692 が nucleocidin の生産を少量生産することを明らかにした。

次に nucleocidin の生合成経路に関与する遺伝子を同定するため、遺伝子破壊実験を行った。遺伝子 nucG, nucI, nucJ, nucK, nucL, nucN, nucO, nucP, nucQ を破壊し、代謝物を LCMS で解析した。その結果、nucJ を除く全ての破壊株で nucleocidin が生産されなかった。このことから、nucG, nucI, nucK, nucL, nucN, nucO, nucP, nucQ は nucleocidin の生合成経路に必須であることが明らかとなった。nucJ 破壊株では nucleocidin の生産が確認されたものの、その量は野生株と比べて著しく低下した。このことから nucJ は nucleocidin の生合成には直接関与しないものの、nucleocidin を増加させる役割があることが示唆された。nucleocidin 生合成遺伝子クラスターの発現を制御している可能性が考えられる。また、nucQ 破壊株では野生株では検出できない新たな化合物を検出した。この化合物は生合成中間体、または生合成中間体の分解物であることが考えられるため、現在構造決定を行っているところである。

nucL と nucP はメチル基転移酵素をコードする。しかしながら、nucleocidin の構造はメチル基を持っていないが、遺伝子破壊の結果から nucL と nucP は nucleocidin の生合成に関わっていることが明らかとなった。

次に生合成遺伝子がコードする酵素の触媒機能を明らかにするため、in vitro 反応解析を行った。まず、スルファメート部位の形成に関わると考えられた NucA, NucB, NucW を大腸菌、または放線菌ホストを用いて発現、精製し、反応に用いた。その結果から、NucA, NucB, NucW は PAPS の生産を担っていると考えられた(図1)。

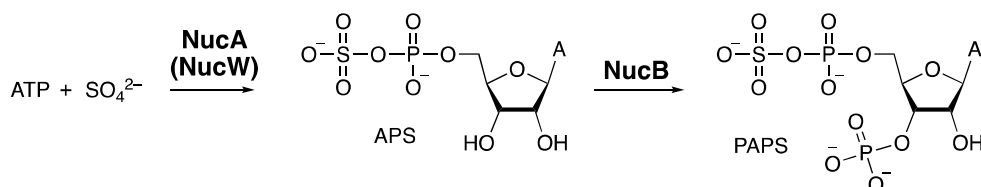


図1 .PAPS の予想生合成経路

次に、nucleocidin 生合成遺伝子クラスターによってコードされる糖転移酵素 NucGT を発現、精製し、反応に用いた。アデノシンと UDP グルコースを用いたときにグルコースによって修飾されたアデノシンが生成し、構造を NMR によって決定した。このことから、nucleocidin 生合成はアデノシンから開始し、NucGT によって糖修飾される可能性が示唆された(図 2)。なお、最近同様の結果が、O'Hagan らによっても報告されている。

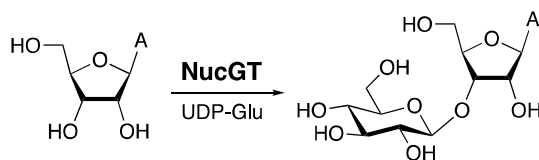
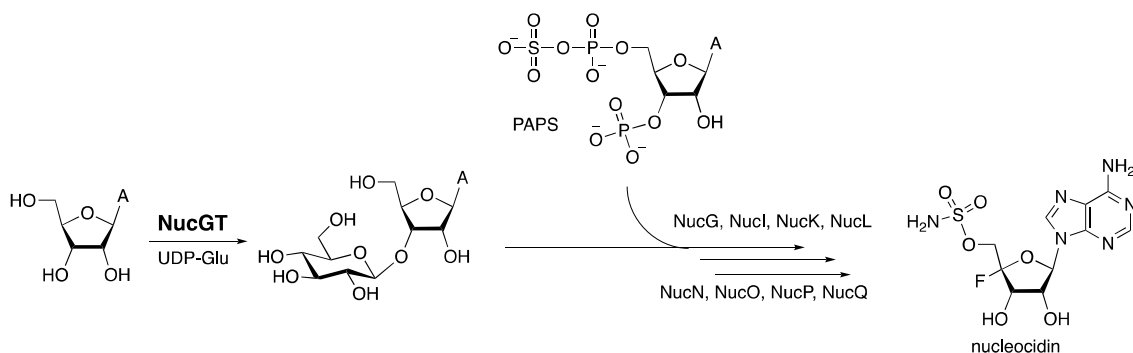


図 2. NucGT の反応

以上の結果より、nucleocidin 生合成初期段階と生合成に関与する酵素群を明らかにした。



さらに、nucleocidin 生合成を明らかにするため、NucG, NucI, NucK, NucL, NucN, NucO, NucP, NucQ を大腸菌、または放線菌ホストを用いて発現、精製を完了した。

本研究では、放線菌 *Streptomyces calvus* T-3018 が生産するヌクレオチド天然物 nucleocidin の生合成経路における、リボース骨格へのフッ素原子の導入および、スルファメート部位の形成を含む生合成経路の解明を目的とし、遺伝子破壊実験と *in vitro* 酵素反応解析を計画した。生合成遺伝子クラスターに含まれる遺伝子を網羅的に破壊することにより、生合成に必須である遺伝子を同定し、生合成機構を提唱した。生合成を担うと考えられる酵素を可溶性タンパク質として大腸菌または放線菌から異種発現、精製し、生合成初期段階における酵素の機能を同定した。今後は、遺伝子破壊代謝物の構造解析と酵素反応解析を行い、nucleocidin の生合成解析を進める。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

|  |                             |
|--|-----------------------------|
| 1. 著者名<br>Wang Shao-An, Lin Chia-I, Zhang Jiawei, Ushimaru Richiro, Sasaki Eita, Liu Hung-wen  | 4. 巻<br>117                 |
| 2. 論文標題<br>Studies of lincosamide formation complete the biosynthetic pathway for lincomycin A   | 5. 発行年<br>2020年             |
| 3. 雑誌名<br>Proceedings of the National Academy of Sciences  | 6. 最初と最後の頁<br>24794 ~ 24801 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1073/pnas.2009306117  | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する                |
| 1. 著者名<br>Ushimaru Richiro, Chen Zhang, Zhao Houyuan, Fan Po hsun, Liu Hung wen  | 4. 巻<br>59                  |
| 2. 論文標題<br>Identification of the Enzymes Mediating the Maturation of the Seryl tRNA Synthetase Inhibitor SB 217452 during the Biosynthesis of Albomycins   | 5. 発行年<br>2020年             |
| 3. 雑誌名<br>Angewandte Chemie International Edition  | 6. 最初と最後の頁<br>3558 ~ 3562   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/anie.201915275   | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する                |
| 1. 著者名<br>Mori Takahiro, Zhai Rui, Ushimaru Richiro, Matsuda Yudai, Abe Ikuro  | 4. 巻<br>12                  |
| 2. 論文標題<br>Molecular insights into the endoperoxide formation by Fe(II)/ -KG-dependent oxygenase Nvfl  | 5. 発行年<br>2021年             |
| 3. 雑誌名<br>Nature Communications  | 6. 最初と最後の頁<br>4417          |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41467-021-24685-6   | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する                |
| 1. 著者名<br>Shimo Shotaro, Ushimaru Richiro, Engelbrecht Alicia, Harada Mei, Miyamoto Kazunori, Kulik Andreas, Uchiyama Masanobu, Kaysser Leonard, Abe Ikuro | 4. 巻<br>143                 |
| 2. 論文標題<br>Stereodivergent Nitrocyclopropane Formation during Biosynthesis of Belactosins and Hormaomycins   | 5. 発行年<br>2021年             |
| 3. 雑誌名<br>Journal of the American Chemical Society   | 6. 最初と最後の頁<br>18413 ~ 18418 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1021/jacs.1c10201   | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する                |

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>牛丸 理一郎、Zhang Chen、Houyuan Zhao、Po-hsun Fan、Hung-wen Liu |
| 2. 発表標題<br>Albomycin生合成におけるセリルトRNA合成酵素阻害剤SB-217452の形成              |
| 3. 学会等名<br>第62回天然有機化合物討論会  |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>志茂 将太郎、牛丸 理一郎、阿部 郁朗            |
| 2. 発表標題<br>ホルマオマイシンの生合成におけるニトロシクロプロパン環の形成 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第141年会                    |
| 4. 発表年<br>2021年                           |

|                                     |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>牛丸 理一郎                   |
| 2. 発表標題<br>薬用トロパンアルカロイド生合成酵素の反応機構解析 |
| 3. 学会等名<br>日本生薬学会第67回年会（招待講演）       |
| 4. 発表年<br>2021年                     |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Richiro Ushimaru   |
| 2. 発表標題<br>Nitrocyclopropane ring formation in natural product biosynthesis |
| 3. 学会等名<br>Pacifichem 2021（国際学会）  |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>牛丸 理一郎                       |
| 2. 発表標題<br>天然物生合成におけるラジカル環化酵素の同定と触媒機構解析 |
| 3. 学会等名<br>日本化学会 第102春季年会 若い世代の特別講演     |
| 4. 発表年<br>2022年                         |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>牛丸 理一郎                       |
| 2. 発表標題<br>薬用トロパンアルカロイド生合成酵素の反応機構解析     |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第142年会 植物化学シンポジウム(招待講演) |
| 4. 発表年<br>2022年                         |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Richiro Ushimaru  |
| 2. 発表標題<br>Assembly of the peptidyl thionucleoside during the biosynthesis of albomycins |
| 3. 学会等名<br>The 3rd Lijiang International Forum on Pharmaceutical Sciences (招待講演) (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>志茂 将太郎、牛丸 理一郎、阿部 郁朗             |
| 2. 発表標題<br>ホルマオマイシンの生合成におけるニトロシク ロプロバン環の形成 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第 141 年会                   |
| 4. 発表年<br>2022年                            |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>志茂 将太郎、牛丸 理一郎、阿部 郁朗             |
| 2. 発表標題<br>ホルマオマイシンの生合成におけるニトロシク ロプロパン環の形成 |
| 3. 学会等名<br>日本生薬学会第 67 回年会                  |
| 4. 発表年<br>2021年                            |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>志茂 将太郎、牛丸 理一郎、阿部 郁朗             |
| 2. 発表標題<br>ホルマオマイシンの生合成におけるニトロシク ロプロパン環の形成 |
| 3. 学会等名<br>2021 年度 (第 35 回) 日本放線菌学会大会      |
| 4. 発表年<br>2021年                            |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|  |
|--|
| 東京大学薬学系研究科天然物化学教室<br><a href="http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~tennen/head.htm">http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~tennen/head.htm</a> |
|--|

|                           |                       |    |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 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 |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|