

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21580104

研究課題名（和文） リベロマイシン誘導体創製に向けた新規生合成酵素群の反応機構解明

研究課題名（英文） Elucidation of reaction mechanism of novel biosynthetic enzymes for derivatization of reveromycin

研究代表者

高橋 俊二 (TAKAHASHI SHUNJI)

独立行政法人理化学研究所・化学情報・化合物創製チーム・チームヘッド

研究者番号：30311608

研究成果の概要（和文）：

リベロマイシン生合成遺伝子クラスターの遺伝子破壊株を作製し、蓄積した中間代謝物の単離・構造解析を行った。これにより生合成経路の推定に必要な多くのリベロマイシン類縁体の構造が明らかとなった。さらに異種発現酵素を用いて反応を解析した結果、RM-A1a(トリオール中間体)を基質としてジヒドロキシケトン合成酵素(RevG)及びスピロアセタール環化酵素(RevJ)により立体特異的にスピロアセタール環を形成する新規反応が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

We disrupted reveromycin biosynthetic gene cluster and analyzed the structure of biosynthetic intermediates isolated from each disruptant. We identified various reveromycin derivatives required for the speculation of its biosynthetic pathway. Moreover, the analysis of biosynthetic mechanisms using RM-A1a (triol intermediate) and recombinant enzymes resulted in the identification of dihydroxy ketone synthase (RevG) and spiroacetal synthase (RevJ), which are involved in stereospecific spiroacetal formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：放線菌、天然化合物、ポリケチド、リベロマイシン A、スピロアセタール化合物、生合成

1. 研究開始当初の背景

放線菌は二次代謝産物の宝庫であり、医薬品や生命現象を解明するバイオプローブなど多くの化合物を生産する。近年、放線菌のゲノム解析が行われ、二次代謝物生産に関わると予想される多数の生合成遺伝子クラスターが見出されている。クラスター中には、相同性検索による機能推定が困難な遺伝子群が存在し、これらの解明はポストゲノム時代の重要課題である。

これまでに、骨粗鬆症治療薬として開発が期待されているリベロマイシン A を生産する放線菌 (*Streptomyces reveromyceticus*) のゲノム配列解析と遺伝子機能アノテーションを進め、機能未知遺伝子群を含む全長約 90 kb のリベロマイシン生合成遺伝子クラスターを同定していたが、生合成機構の解明は進んでいなかった。

2. 研究の目的

本研究では、リベロマイシン生合成遺伝子クラスターに存在する新規ポリケチド修飾酵素群の中で、有機化学的には困難だが、酵素的には容易な反応に着目した。創薬シーズ導出にむけた新規誘導体の創製手法の開発を目指し、未知の酵素反応の解析を行った。

3. 研究の方法

リベロマイシン生合成遺伝子クラスターの全遺伝子破壊を効率的に進めるために、 λ Red システムを用いた。これまで、破壊ベクター作成は制限酵素サイトに依存し、ベクター構築に時間を要していたが、効率的組み換えが可能な大腸菌システムを利用することで、標的遺伝子部位への耐性遺伝子導入や必要に応じた耐性マーカーの in frame 除去を行なった。

リベロマイシン生産菌への遺伝子導入は、接合法を用いた。上記のように作製した遺伝子破壊ベクターを用いて、リベロマイシン生合成遺伝子クラスターの各遺伝子の破壊を行い、サザンハイブリダイゼーションにより遺伝子破壊株を確認した。その後、破壊株を培養し、代謝産物を LC/MS を用いて解析した。蓄積する生合成中間産物を単離・精製し、構造決定を行なった。

中間代謝産物は、破壊された遺伝子産物である酵素の基質と考えられるため、大腸菌または放線菌を用いた異種発現系を用いて酵素の大量発現・精製を行い、生化学的反応を解析した。

4. 研究成果

遺伝子破壊と中間代謝産物の解析：リベロマイシン生合成遺伝子破壊株を作製し、蓄積した中間代謝産物の単離・構造解析を行った

結果、生合成経路を推定するために必要な多くのリベロマイシン類縁体 (RM-A1a, RM-T など) の構造が明らかとなった。一方、不安定な中間体を經由する場合には代謝中間産物の特定が困難であることから、異種発現酵素を用いて反応を解析した。その結果、RM-A1a (トリオール中間体) を基質としてジヒドロキシケトン合成酵素 (RevG) 及びスピロアセタール環化酵素 (RevJ) により立体特異的にスピロアセタール環を形成することが明らかになった。これまでに非酵素的に進行すると考えられてきた脱水環化反応に酵素が関与することが初めて示された。立体特異的スピロアセタール化合物を化学合成することは困難であるため、RevG 及び RevJ を用いた酵素的合成法は新規化合物創製につながる。

2. 生化学反応の解析：異種発現が困難であったフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) 依存酵素の可溶化条件を検討した。大腸菌のコードン使用頻度を考慮することにより、FAD が結合した高活性の酵素を調製することに成功した。また、脂肪酸-ポリケチドハイブリット形成に必要な鍵酵素 (脂肪酸-CoA リガーゼ) を調製し、反応条件を検討した結果、飽和及び不飽和脂肪酸に関わらず広い基質特異性を有する事が明らかとなった。

3. X 線結晶解析：P450 の結晶構造をもとにしてアミノ酸の部位特異的変異導入を行った。変異導入後の活性減少が問題であり、活性を損なわない部位への変異導入を検討した。FAD 依存酵素、脂肪酸-CoA リガーゼについては、結晶解析に適した、良好な結晶の創出に向けた条件を検討した。

以上、基盤研究 (C) 補助金を得ることにより Nature Chemical Biology への論文掲載を筆頭として リベロマイシン生合成について飛躍的な研究成果を上げることが出来た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- 1) Nogawa T., Takahashi S., Okano A., Kawatani M., Uramoto M., Saito T., and Osada H. Spirotoamides A and B, novel 6,6-spiroacetal polyketides isolated from a microbial metabolite fraction library. *J. Antibiot.*, 65(3):123-128, 2012. 査読有
- 2) Takahashi S., Toyoda A, Sekiyama Y, Takagi H, Nogawa T, Uramoto M, Suzuki R, Koshino H, Kumano T, Panthee S, Dairi T, Ishikawa J, Ikeda H, Sakaki Y,

- and Osada H. Reveromycin A biosynthesis uses RevG and RevJ for stereospecific spiroacetal formation. *Nat. Chem. Biol.* 7: 461-468, 2011. 査読有
- 3) Kato N, Suzuki H, Takagi H, Uramoto M, Takahashi S., and Osada H. Gene disruption and biochemical characterization of verruculogen synthase of *Aspergillus fumigatus*. *Chembiochem*. 12(5): 711-714, 2011. 査読有
 - 4) Kato N., Tokuoka M., Shinohara Y., Kawatani M., Uramoto M., Seshime Y., Fujii I., Kitamoto K., Takahashi T., Takahashi S., Koyama Y., and Osada H. Genetic safeguard against mycotoxin cyclopiazonic acid production in *Aspergillus oryzae*. *Chembiochem*. 12(9): 1376-1382, 2011. 査読有
 - 5) Suzuki H, Takahashi S., Osada H, and Yoshida K. Improvement of transformation efficiency by strategic circumvention of restriction barriers in *Streptomyces griseus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21(7): 675-678, 2011. 査読有
 - 6) Panthee S, Takahashi S., Takagi H, Nogawa T, Oowada E, Uramoto M, and Osada H. Furaquinocins I and J: Novel polyketide isoprenoid hybrid compounds from *Streptomyces reveromyceticus* SN-593. *J. Antibiot.*, 64(7): 509-513, 2011. 査読有
 - 7) Takayama H, Takahashi S., Osada H, Iwabuchi Y, and Kanoh N, Detection of cytochrome P450 substrates using small-molecule droplet array on NADH-immobilized solid surface. *Chembiochem*. 12(18): 2748-2752, 2011. 査読有
 - 8) Takahashi S., Takagi H., Toyoda A., Uramoto M., Nogawa T., Ueki M., Sakaki Y. and Osada H. Biochemical characterization of a novel indole prenyltransferase from *Streptomyces* sp. SN-593. *J. Bacteriol.* 192(11): 2839-2851, 2010. 査読有
 - 9) Nogawa T., Okano A., Takahashi S., Uramoto M., Konno H., Saito T., and Osada H. Verticilactam, a New Macrolactam isolated from a microbial metabolite fraction library. *Org. Lett.* 12 (20): 4564-4567, 2010. 査読有
 - 10) Rydén A.M., Ruyter-Spira C., Litjens R., Takahashi S., Quax W., Osada H., Bouwmeester H., Kayser O. Molecular cloning and characterization of a broad substrate terpenoid oxidoreductase from *Artemisia annua*. *Plant Cell Physiol.* 51(7): 1219-1228, 2010. 査読有
 - 11) Hashimoto M., Higuchi Y., Takahashi S., Osada H., Sakaki T., Toyomasu T., Sassa T., Kato N. and Dairi T. Functional analyses of cytochrome P450 genes responsible for the early steps of brassicicene C biosynthesis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19(19): 5640-5643, 2009. 査読有
 - 12) Kato N, Suzuki H, Takagi H, Asami Y, Kakeya H, Uramoto M, Usui T, Takahashi S., Sugimoto Y and Osada H. Identification of cytochrome P450s required for fumitremorgin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Chembiochem*. 10(5): 920-928, 2009. 査読有
- [学会発表] (計 25 件)
- 1) 高橋俊二、サクシニル化に関わるリベロマイシン生合成遺伝子の機能解析、日本農芸化学会、2012年3月22日～26日、京都女子大学
 - 2) 熊野匠人、リベロマイシン生合成における多段階酵素反応の再構築、日本農芸化学会、2012年3月22日～26日、京都女子大学
 - 3) 宮澤岳、2-アルキルマロニル-CoA 生合成機構の解析、日本農芸化学会、2012年3月22日～26日、京都女子大学
 - 4) Suresh Panthee, β -carboline compounds as biomediators of secondary metabolism in *Streptomyces reveromyceticus*. 日本農芸化学会、2012年3月22日～26日、京都女子大学
 - 5) Shunji Takahashi, Mechanism of 2-alkylmalonyl-CoA formation in reveromycin A biosynthesis, 16th International Symposium on the Biology of Actinomycetes, Dec11-15th, 2011, Puerto Vallarta, Mexico.
 - 6) Hiroyuki Osada, Biosynthetic Mechanism and Effective Production of Reveromycin A, 16th International Symposium on the Biology of Actinomycetes, Dec11-15th, 2011, Puerto Vallarta, Mexico.
 - 7) 野川俊彦、微生物代謝産物フラクシオンライブラリーより単離した新規スピロアセタールポリケチド、スピロトアミド A および B の構造、第 53 回天然有機化合物討論会、2011年9月27日～29日、大阪国際交流センター

- 8) Shunji Takahashi, Identification of key enzymes involved in spiroacetal formation in reveromycin A biosynthesis. International union of microbiological societies (IUMS), 放線菌学会共催、2011年9月7-9日、札幌コンベンションセンター
- 9) Takeshi Miyazawa, Analysis of 2-alkylmalonyl-CoA biosynthesis. International union of microbiological societies (IUMS), 放線菌学会共催、2011年9月7-9日、札幌コンベンションセンター
- 10) Takuto Kumano, *In vitro* reconstruction of post-PKS modification in RM-A biosynthesis. International union of microbiological societies (IUMS), 放線菌学会共催、2011年9月7-9日、札幌コンベンションセンター
- 11) Shunji Takahashi, Deciphering of reveromycin A biosynthesis and the production of novel derivatives International union of microbiological societies. (IUMS), 放線菌学会共催、2011年9月7-9日、札幌コンベンションセンター
- 12) 高橋俊二、遺伝子破壊によるリベロマイシン生合成機構の解析、日本農芸化学会、2011年3月27日~29日、京都女子大学
- 13) 熊野 匠人、リベロマイシン生合成におけるバイヤー・ビリガー酸化反応解析、日本農芸化学会、2011年3月27日~29日、京都女子大学
- 14) 宮澤岳、ブチルマロニル-CoA生合成機構の解析、日本農芸化学会、2011年3月27日~29日、京都女子大学
- 15) Suresh Panthee, Identification of biomediators that enhance reveromycin A production in *Streptomyces reveromyceticus*. 日本農芸化学会、2011年3月27日~29日、京都女子大学
- 16) 加藤直樹、分子内peroxide架橋形成を触媒するverruculogen合成酵素FtmFの機能解析・結晶化、日本農芸化学会、2011年3月27日~29日、京都女子大学
- 17) 高橋俊二、リベロマイシン A のスピロアセタール環化機構の解析、日本放線菌学会、2010年9月2日~3日、タワーホール船堀 (東京)
- 18) Suresh Panthee, Development of screening system and identification of biomediators of reveromycin A biosynthesis. 日本放線菌学会、2010年9月2日~3日、タワーホール船堀 (東京)
- 19) 高橋俊二、リベロマイニン A スピロケタール生成に関わる新規デヒドロゲナーゼの機能解析、日本農芸化学会、2010年3

- 月27日~30日、東京大学駒場
- 20) 高木海、リベロマイシン構造多様化に関わる2-アルキルマロニル CoA 生合成機構の解析、日本農芸化学会、2010年3月27日~30日、東京大学駒場
- 21) Shunji Takahashi, Analysis of Reveromycin A Biosynthetic Gene Cluste, International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Dec 15-20th, 2009, Honolulu, Hawaii, USA.
- 22) 高橋俊二、リベロマイシン A 生合成遺伝子クラスターの機能解析、第 82 回日本生化学会大会シンポジウム、2009年10月21日、神戸ポートアイランド
- 23) Shunji Takahashi, Biochemical and crystal structure analyses of revenomycine E hydroxylase (P450RME) in reveromycin A biosynthetic gene cluster. 15th International Symposium on the Biology of Actinomycetes (ISBA'15), Aug 20-25th, 2009, Shanghai, China.
- 24) 高橋俊二、リベロマイシン A のスピロケタール生合成機構の解析、日本放線菌学会、2009年7月16日~17日、秋田ビューホテル
- 25) Shunji Takahashi, Prenyltransferase from *Streptomyces reveromyceticus*, TERPNET2009, May 25-29th, 2009, University of Tokyo.

[図書] (計4)

- 1) 高橋俊二、生物工学会誌 vol 90 (2), p. 95, 2012.
- 2) 高橋俊二、長田 裕之、バイオサイエンスとインダストリー Vol. 69 (6) 486-487, 2011.
- 3) 長田裕之、高橋俊二、科学工業 Vol. 62 (8), p. 8-13, 2011.
- 4) Kuzuyama T., Hemmi H. and Takahashi S. In *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology*; Mander, L., Lui, H.-W, Eds.; Elsevier: Oxford, Vol. 1, pp 493-516, 2010.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：リベロマイシン A またはその生合成中間体の製造法およびスピロケタール環含有化合物の製造方法
 発明者：長田裕之、高橋俊二、榊佳之、豊田敦
 権利者：理化学研究所
 種類：特許
 番号：特願 2010-194222

出願年月日：2010年8月31日
国内外の別：国内

〔その他〕

新聞掲載

2011年06月06日 化学工業日報

2011年06月06日 日経産業新聞

プレスリリース

平成23年6月6日

独立行政法人 理化学研究所

放線菌による「リベロマイシン A」生合成機

序を遺伝子レベルで初めて解明

－トマトエキスが誘導する放線菌遺伝子を

探索し判明－

ホームページ

[http://www.riken.go.jp/r-world/research
/lab/asi/cb-ccc/index.html](http://www.riken.go.jp/r-world/research/lab/asi/cb-ccc/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 俊二 (TAKAHASHI SHUNJI)

独立行政法人理化学研究所・化学情報・化合

物創製チーム・チームヘッド

研究者番号：30311608