

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：23803
 研究種目：若手研究（A）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21688009
 研究課題名（和文）ゲノム情報を基盤とした二次代謝産物の探索及び遺伝子資源の物質生産への応用
 研究課題名（英文） Genome mining and microbial production of secondary metabolites

研究代表者
 鮒 信学 (FUNA NOBUTAKA)
 静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授
 研究者番号：70361574

研究成果の概要（和文）：ゲノム情報を基盤とした生合成研究はゲノムマイニングと呼ばれることがある。ゲノムを宝の山と見立て、採鉱するという意味合いだ。我々は、放線菌、糸状菌、イネのゲノムからポリケタイド合成酵素をスクリーニングした。その結果、新規な I 型および III 型ポリケタイド合成酵素を見いだすことができた。また、それらのポリケタイド合成酵素を用いてポリケタイドの微生物生産に成功した。

研究成果の概要（英文）： Genome mining is an innovative approach to isolating novel natural products by utilizing the genome data of bacteria, fungi, and plants. We characterized novel type I and type III polyketide synthases by genome mining studies of *Streptomyces*, *Aspergillus*, and *Oryza sativa*. We manipulated polyketide biosynthesis to generate libraries of “unnatural” natural products by microorganisms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
2010 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	18,600,000	5,580,000	24,180,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：ポリケタイド、III 型ポリケタイド合成酵素

1. 研究開始当初の背景

微生物や植物は、ポリケタイド、テルペノイド、アルカロイド、非リボソームペプチドなどの多様多様な二次代謝産物を生産する。二次代謝産物はその構造多様性から多様な生物活性を持つ物が多く、人類は抗生物質、抗ガン物質などの医薬品や農薬等として多大な恩恵を受けてきた。しかしながら、新規二次代謝産物の発見数は減少の一途を辿っている。ポストゲノム時代の天然物化学研究としてゲノムマイニングは大変興味深い。ゲ

ノムマイニングとは、ゲノム解析により見出された遺伝子を解析することで、既知化合物の生合成遺伝子の同定や、新規酵素の発見を目指す研究である。最近、種々の生物のゲノム配列が明らかになっており、二次代謝物質の生合成遺伝子が次々と同定されている。興味深いことに、ほとんどのゲノム解読株において、既知化合物の数よりも未知生合成遺伝子クラスターの数の方が多く、これらは通常の培養条件発現しない、「眠っている」遺伝子であると考えられる。

2. 研究の目的

糸状菌 *Aspergillus* 属、放線菌 *Streptomyces* 属、イネ *Oryza sativa* などのゲノムデータベースから機能未知遺伝子の探索を行い、新規有用物質合成酵素の取得を目指す。また得られた遺伝子資源を用いて有用物質の生産系の構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) 生合成酵素遺伝子のクローニング・異種発現系の構築および酵素活性の検討

各生物のゲノム情報を基に触媒機能を試験する酵素遺伝子を選定した。真核生物は cDNA ライブラリー、原核生物はクロモソームをそれぞれ調製し、これらを鋳型として PCR 法により目的遺伝子を取得した。大腸菌を宿主とした pET システムを用いヒスチジンタグ融合蛋白として発現・精製し、*in vitro* 活性を検討する。スターター基質として C2~C22 の炭素鎖の飽和脂肪酸 CoA エステルを、伸鎖基質として [2-¹⁴C]malonyl-CoA を用い反応を行い、TLC およびラジオオートグラフィーにより解析した。反応の進行が見られるものについては、LC-APCIMS を用い、標品との比較により生成物の構造を決定した。本研究課題では放線菌 *Streptomyces griseus*、枯草菌 *Bacillus subtilis*、イネ *Oryza sativa*、粘菌 *Myxococcus xanthus* の III 型ポリケタイド合成酵素、の III 型ポリケタイド合成酵素、また、ウコン *Curcuma longa* の cDNA ライブラリーからクルクミンの生合成に関与する酵素の探索を行った。

4. 研究成果

(1) *Actinoplanes missouriensis* 由来の新規テルペノイドポリケタイド融合化合物合成に関わる遺伝子クラスターの機能解析

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* 由来の III 型ポリケタイド合成酵素 (AgqA) を含む Agq オペロンの機能を解明した。III 型ポリケタイド合成酵素 (AgqA) は、長鎖脂肪酸、マロン酸、メチルマロン酸由来の基質から alkylresorcinol の合成を触媒する。メチル基転移酵素 (AgqB)、酸化酵素 (AgqC)、プレニルトランスフェラーゼ (AgqD) の作用により、alkylresorcinol は alkyl-*O*-geranyl-hydroquinone に変換される。本経路は、*A. missouriensis* における Agq オペロンの共発現体および野生株が生産する alkyl-*O*-geranyl-hydroquinone 類を単離・精製することにより機能を決定した。

(2) I 型ポリケタイド合成酵素から生成物を解離する β -lactamase 型チオエステラーゼの機能解析

β -lactamase superfamily に属する

atrochryson carboxyl ACP thioesterase (ACTE) が、糸状菌 *Aspergillus terreus* の非還元型 I 型ポリケタイド合成酵素からの生成物の解離を担うことを示した。ACTE は既知の thioesterase (TE) ドメインとは異なり、金属を活性中心にもつ新規な TE であると予想された。その触媒機構に興味もたれたため、以下の実験を行った。大腸菌を宿主として組換え ACTE を発現・精製した本酵素は分子量約 32 kDa のモノマーであり、0-45°C において安定であった。また基質アナログである anthraquinone-2-carboxyl acid NAC thioester の加水分解反応において至適 pH は 8.5 であり、 K_m は $1.01 \pm 0.10 \mu\text{M}$ 、 k_{cat} は $24.5 \pm 0.9 \text{ min}^{-1}$ であった。キレート剤処理、部位特異的変異導入、ICP-AES 分析の結果、 β -lactamase と同様の金属結合モチーフをもち、活性には Fe に加え Co、Ni、Mn のいずれかが必要であることが明らかとなった。また速度論解析の結果、ACTE はベンゼン環、ナフタレン環を含む基質より、アントラキノン環を含む基質を好むことがわかった。

(3) *Myxococcus xanthus* の fatty acyl-AMP ligase 依存的 priming を介した芳香族ポリケタイドの生合成

ポリケタイド合成酵素のスターター基質は一般に CoA 体である。我々は *Myxococcus xanthus* ゲノム中に fatty acyl-AMP ligase (FAAL) と acyl carrier protein (ACP)、III 型ポリケタイド合成酵素 (FtpA) の 3 種のタンパク質をコードするオペロンを見出した。FtpA の反応における、FAAL による CoA 非依存的なスターター基質の供給経路の存在を明らかにした。LC-MS、NMR 分析により、FtpA オペロンを過剰発現させた *Streptomyces lividans* は alkylresorcinol を生産することが示された。*In vitro* 反応では、FtpA は長鎖脂肪酸の CoA 体、methylmalonyl-CoA、malonyl-CoA、2 分子を用い、alkylresorcylic acid を合成した。Alkylresorcylic acid は非酵素的脱炭酸により alkylresorcinol に変化した。 [¹⁴C]malonyl-CoA を用いた解併により、FtpA の重合反応の順番は、スターター基質、methylmalonyl-CoA、malonyl-CoA、malonyl-CoA であることが明らかになった。

(4) 放線菌 *Streptomyces griseus* における新規メチルトランスフェラーゼの機能解析

SrsA は放線菌 *S. griseus* 由来の III 型ポリケタイド合成酵素であり、alkylresorcylic acid の合成を触媒する。SrsA と SrsB を放線菌で共発現すると alkylresorcinol methyl ether を生産することから SrsB はメチル化酵素であることが予

想されていた。我々は膜蛋白 SrsB を放線菌で発現し、精製 SrsB を用いて *in vitro* 反応を行った。SrsB を Alkylresorcinol、SAM と共に振とうしたところ、反応は進行しなかった。そこで、SrsA の alkylresorcylic acid 生成反応と SrsB 反応を同時に行ったところ反応が進行し、alkylresorcinol methyl ether が生じた。これは、alkylresorcinol ではなく、alkylresorcylic acid が SrsB の真の基質であることを示している。

(5) イネ *Oryza sativa* の III 型ポリケタイド合成酵素の網羅的機能解析

イネ *Oryza sativa* は 28 種類の III 型ポリケタイド合成酵素をそのゲノムに有するが、サクラネチン、トリシンやアルキルレゾルシノールなど少数のポリケタイドしか単離されていない。つまり、イネのゲノムには単離されたポリケタイドよりも多くの III 型ポリケタイド合成酵素が存在し、イネの潜在的なポリケタイド生産能に期待がもたれる。我々は、イネの III 型 PKS の機能解析を網羅的に行った。

OsPKS11、OsPKS30 とそれぞれ命名した III 型ポリケタイド合成酵素は、いずれものナリンゲニンカルコンの合成を触媒するカルコン合成酵素と高い相同性を有していた。実際、OsPKS11、OsPKS30 は、カルコン合成酵素活性を示し、OsPKS11、OsPKS30 がイネにおけるサクラネチン、トリシンの生合成酵素であることが判明した。カルコン合成酵素は植物に幅広く存在する酵素であり、フラボノイドの生合成鍵酵素である。また、ARAS1、ARAS2 とそれぞれ命名した III 型 PKS はいずれも alkylresorcylic acid を生産する酵素であることが判明した。従って、ARAS1、2 がイネにおけるアルキルレゾルシノールの生合成酵素であることが明らかとなった。

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 7 件)

- ① Nakano, C., Funa, N., Ohnishi, Y., and Horinouchi, S. The *O*-methyltransferase SrsB catalyzes the decarboxylative methylation of alkylresorcylic acid during phenolic lipid biosynthesis by *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **194**, 1544-1551 (2012) 査読あり
DOI:10.1128/JB.06406-11
- ② Hayashi, T., Kitamura, Y., Funa, N., Ohnishi, Y. and Horinouchi, S. Fatty acyl-AMP ligase involvement in the

production of alkylresorcylic acid by a *Myxococcus xanthus* type III polyketide synthase. *ChemBiochem* **12**, 2166-2176 (2011) 査読あり
DOI:10.1002/cbic.201100344

- ③ Matsuzawa, M., Katsuyama, Y., Funa, N., and Horinouchi, S. Alkylresorcylic acid synthesis by type III polyketide synthase from *Oryza sativa*. *Phytochemistry* **71**, 1059-1067 (2010) 査読あり
DOI:10.1016/j.phytochem.2010.02.012
- ④ Katsuyama, Y., Hirose, Y., Funa, N., Ohnishi, Y., and Horinouchi, S. Precursor-directed biosynthesis of curcumin analogs in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **74**, 641-645 (2010) 査読あり
DOI:10.1271/bbb.90866
- ⑤ Awakawa, T., Yokota, K., Funa, N., Doi, F., Mori, N., Watanabe, H., and Horinouchi, S. Physically discrete β -lactamase-type thioesterase catalyzes product release in atrochryson synthesis by iterative type I polyketide synthase. *Chem. Biol.* **16**, 613-623 (2009) 査読あり
DOI:10.1016/j.chembiol.2009.04.004
- ⑥ Nakano, C., Ozawa, H., Akanuma, G., Funa, N., and Horinouchi, S. Biosynthesis of Aliphatic Polyketides by Type III Polyketide Synthase and Methyltransferase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **191**, 4916-4923 (2009) 査読あり
DOI:10.1128/JB.00407-09
- ⑦ Katsuyama, Y., Kita, T., Funa, N., and Horinouchi, S. Curcuminoid biosynthesis by two type III polyketide synthases in the herb *Curcuma longa*. *J. Biol. Chem.* **284**, 11160-11170 (2009) 査読あり
DOI:10.1074/jbc.M900070200

[学会発表] (計 11 件)

- ① 山梨智也、原 啓文、鮎 信学
「*Rhodococcus jostii* RHA1 株における β -ケトアジピン酸経路の新規バイパス経路の解析」日本農芸化学会 2012 年度大会 (京都)、2012 年 3 月
- ② Nobutaka Funa “Microbial production

of plant polyketides by utilizing diverse reactions of type III polyketide synthases” IUMS (International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology) 2011, Sept. 9, Hokkaido, Japan (2011)

- ③ 勝山 陽平、松井 美里、鮎 信学、大西 康夫、堀之内 末治「組換え大腸菌と組換え酵母の共培養による非天然型イソフラボンの生産」日本農芸化学会 2010 年度大会 (東京)、2010 年 3 月
- ④ 淡川 孝義、横田 康介、鮎 信学、大西 康夫、堀之内 末治「I 型ポリケタイド合成酵素から生成物を解離する β -lactamase 型チオエステラーゼの機能解析」日本農芸化学会 2010 年度大会 (東京)、2010 年 3 月
- ⑤ 林 貴之、鮎 信学、大西 康夫、堀之内 末治「*Myxococcus xanthus* 由来の fatty acyl-AMP ligase 依存的 priming 機構を持った III 型ポリケタイド合成酵素の機能解析」日本農芸化学会 2010 年度大会 (東京)、2010 年 3 月
- ⑥ 淡川 孝義、鮎 信学、藤田 信之、早川 正幸、大西 康夫、堀之内 末治「*Actinoplanes missouriensis* 由来の新規テルペノイドポリケタイド融合化合物合成に関わる遺伝子クラスターの機能解析」日本農芸化学会 2010 年度大会 (東京)、2010 年 3 月
- ⑦ 佐藤 龍太郎、宮永 顕正、小沢 弘樹、鮎 信学、宮園 健一、田之倉 優、大西 康夫、堀之内 末治「窒素固定細菌由来 III 型ポリケタイド合成酵素の環化機構の解析」日本農芸化学会 2010 年度大会 (東京)、2010 年 3 月
- ⑧ 勝山 陽平、宮園 健一、鮎 信学、田之倉 優、大西 康夫、堀之内 末治「ウコン由来クルクミン合成酵素 (CURS) の結晶構造解析」日本農芸化学会 2010 年度大会 (東京)、2010 年 3 月
- ⑨ Nobutaka Funa “A β -lactamase-type thioesterase responsible for product release in polyketide biosynthesis” 2010 RIKEN Chemical Biology International Symposium, Oct. 26, Saitama, Japan (2010)
- ⑩ Nobutaka Funa “Curcuminoid

synthesis by type III polyketide synthases and their application to microbial production of plant polyketides” Pacifichem 2010, Dec. 15, Hawaii, USA (2010)

- ⑪ Nobutaka Funa “Combinatorial biosynthesis of plant medicinal polyketides in microorganisms” 25th Naito Conference, Sept. 11, Hokkaido, Japan (2009)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鮎 信学 (FUNA NOBUTAKA)
静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授
研究者番号：70361574

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

なし。