

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 9 月 29 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24580166

研究課題名(和文) 微生物二次代謝に見られる新奇な生合成機構の解明

研究課題名(英文) Biosynthesis of structurally unique microbial secondary metabolites

研究代表者

五十嵐 康弘 (Igarashi, Yasuhiro)

富山県立大学・工学部・教授

研究者番号：20285159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：構造的に特異な天然物の生合成機構の解明は、天然物の構造多様性の発生原理を理解し、生合成酵素の利用を可能にすることにより、医薬探索に有効な化合物ライブラリーを構築する上で有益な情報をもたらす。本研究では、研究代表者の研究室で放線菌と糸状菌から発見された、いくつかのポリケチド系新規化合物について生合成起源と生合成遺伝子の解析を行い、いずれも報告例のない、固有の生合成反応を経て生合成されることを明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Elucidation of biosynthetic mechanisms of structurally unique natural products makes it possible to understand the general principle of generation of structure diversity in natural products and utilize biosynthetic enzymes to create new natural products. Furthermore, it can provide useful information for the construction of potential compound library for drug discovery. In this study, we analyzed the biosynthetic origins and biosynthetic genes of several new secondary metabolites discovered in our laboratory from microorganisms and elucidated novel biosynthetic reactions involved in their synthesis.

研究分野：天然物化学

キーワード：微生物 二次代謝 生合成 ポリケチド

### 1. 研究開始当初の背景

近年、天然物からの医薬開発への関心が減退しているが、天然物こそが最も有望な新規リード探索源であるとの認識は依然強く開発研究者の間に残されている。コンビナトリアル合成は、低コストで膨大な数の化合物を供給できることから、天然物に替わる創薬ライブラリーと期待されたが、新薬創出の成果は思いのほか上がっていない。これは合成化合物の構造多様性が天然物に比べて小さく、合成化合物の構造が生物学的意味を持たないことが原因である。一方で、タンパク質の構造パターンには上限があり、天然物の生合成酵素と創薬の標的タンパクとが共通した部分構造を持つため、天然物は生体分子への高い親和性を本来有している。したがって、創薬ライブラリーの多様性を拡充し、新規なファルマコフォアを発見するためには、天然物の利用が有利と考えられる。

### 2. 研究の目的

上記の背景に鑑み、五十嵐らは、新たな創薬リード化合物の発見を目的として、UV スペクトルを指標とした分光学的スクリーニングによる、新規骨格生理活性物質の探索を進めてきた(引用文献①~⑤)。その結果、放線菌と糸状菌から生合成的に報告例のない新奇な構造上の特徴を有する化合物を複数得ることに成功し、いずれの生合成にも未知の反応様式が関与すると予想した。本研究では、それらの生合成の仕組みを解明することにより、新奇な反応形式の遺伝子工学的利用を可能にし、新規性と多様性に富んだ天然物ベースの創薬ライブラリーを創出することを最終的な目的として、以下に詳述する微生物由来二次代謝物の生合成経路の解明を試みることにした。

#### <引用文献>

- ① Y. Igarashi, T. Mogi, S. Yanase, S. Miyanaga, T. Fujita, H. Sakurai, I. Saiki, A. Ohsaki. Brartemicin, an inhibitor of tumor cell invasion from the actinomycete *Nonomuraea* sp. *J. Nat. Prod.*, **72**, 980-982 (2009)
- ② Y. Igarashi, Y. Kim, Y. In, T. Ishida, Y. Kan, T. Fujita, T. Iwashita, H. Tabata, H. Onaka, T. Furumai. Alchivemycin A, a bioactive polycyclic polyketide with an unprecedented skeleton from *Streptomyces* sp. *Org. Lett.*, **12**, 3402-3405 (2010)
- ③ T. Fukuda, Y. Sudoh, Y. Tsuchiya, T. Okuda, F. Fujimori, Y. Igarashi. Marianins A and B, prenylated phenylpropanoids from *Mariannaea camptospora* *J. Nat. Prod.*, **74**, 1327-1330 (2011)
- ④ Y. Igarashi, L. Yu, M. Ikeda, T. Oikawa, S. Kitani, T. Nihira, B. Bayanmunkh, W. Panbangred. Jomthonic acid A, a modified amino acid from a soil-derived *Streptomyces*.

*J. Nat. Prod.*, **75**, 986-990 (2012)

- ⑤ Y. Igarashi, T. Zhou, S. Sato, T. Matsumoto, L. Yu, N. Oku. Akaeolide, a carbocyclic polyketide from marine-derived *Streptomyces*. *Org. Lett.* **15**, 5678-5681 (2013)

### 3. 研究の方法

#### [1]安定同位体標識化合物の取り込みによる生合成解析

各放線菌株を四日間前培養した後、生産用培地に移し、48時間経過後から24時間毎に四回にわたり、<sup>13</sup>C 標識化合物(培地 100 mL あたり 10~20 mg)を添加し、更に24時間培養した後、1-ブタノールで抽出した。抽出物は順相および逆相シリカゲルカラムにより精製し、得られた標識化合物の<sup>13</sup>C NMR スペクトルのピーク強度変化から標識炭素を決定した。

#### [2]ドラフトゲノム解析

各放線菌株のドラフトゲノム解析は、GS FLX+ (Roche)によるショットガン法と MiSeq (Illumina)によるペアエンド法を組み合わせで行った。得られたリードは Newbler v2.8 software を用いてアセンブルし、GenoFinisher software により Finishing した。遺伝子予測には Prodigal を用いた。得られた遺伝子情報から、ポリケタイド合成酵素 (PKS) と非リボソーム性ペプチド合成酵素 (NRPS) を検索し、ドメイン配列から生産物の構造を予測した。

### 4. 研究成果

#### [1] Alchivemycin に見られる tetrahydrooxazine 環の生合成

*Streptomyces* 属の生産する抗菌・抗浸潤活性物質 alchivemycin は、デカリン骨格を有する多環性ポリケタイドである。特に分子中央の tetrahydrooxazine 構造は天然、合成いずれにも前例のない共役複素環系であり、その生合成に興味を持たれた。その複素環骨格の生合成起源を解明するにあたり、<sup>13</sup>C 標識酢酸およびプロピオン酸の取り込み実験を行うと、基本骨格の予想される位置に取り込みが認められたが、複素環を構成する四炭素のうち二炭素は標識されなかった。複素環部分はテトラミン酸の生合成様式から *N*-ヒドロキシグリシンが前駆体と類推されたため、<sup>13</sup>C 標識グリシンと *N*-ヒドロキシグリシンの取り込みを行うと、いずれも複素環の予想される炭素が標識された。特にグリシンは極めて高効率で取り込まれたことから、生合成酵素はグリシンを基質として認識し、酵素との複合体を形成したのちに *N*-ヒドロキシグリシンへと水酸化される経路が強く示唆された(発表論文①)。

さらに生産菌のゲノム解析を行い、遺伝子配列の相同性に基づき PKS を抽出し、alchivemycin の炭素骨格形成に必要な遺伝子群を特定することに成功した。相同性配列の

みではアミノ酸の起源を特定することが困難であったが、グリシンの取り込み率が *N*-ヒドロキシグリシンに比較して圧倒的に高いことから、酵素はグリシンを基質として利用していると考えられた。

次いで、生合成遺伝子のマイニングにより同様の化合物を生産する微生物を探索したところ、ゲノムデータベース中に類似の遺伝子クラスターを保有する放線菌が3株存在することが判明した。そのうち2株 (NBRC 16556, NBRC 13981) を入手し、培養生産物を解析した結果、いずれも *alchivemycin A* を生産した。また、NBRC 13981 株は *alchivemycin* 新規類縁体を生産していた (論文投稿中)。

## [2] *Preussin* におけるピロリジン環の形成機構

昆虫病原糸状菌 *Simplicillium* の生産する免疫抑制物質 *preussin* はピロリジンの2位と5位にそれぞれベンジル基とアルキル基が置換したアルカロイドである。ピロリジン単環から成る化合物の生合成についてはあまり知られておらず、その生合成機構に興味を持たれた。まず側鎖部分はポリケタイド経路、芳香環部分はアミノ酸に由来すると予想し、<sup>13</sup>C 標識した酢酸およびフェニルアラニンを追加培養した。<sup>13</sup>C NMR および 2D-INADEQUATE スペクトルの解析に基づき、側鎖末端から芳香環へと炭素鎖伸長が進み、酢酸由来の一炭素が脱炭酸し、分子内還元的アミノ化反応を経てピロリジン環が形成される経路が推定された。ポリケタイド鎖の $\alpha$ -位がアミノ酸チオエステルを求核攻撃し炭素鎖を形成する経路は、テトラミン酸生合成とは異なる様式であり、糸状菌二次代謝の多様性を理解する上で興味深い知見が得られた (発表論文②)。

## [3] 多環性ポリケタイド *anthracimycin* における鏡像選択的生合成

*Streptomyces* 属から単離した浸潤阻害物質 BG32-16 (*anthracimycin*) は、デカリン骨格に14員環ラクトンが縮環した新規ポリケタイドである。非常に奇妙なことに、*Sorangium* 属粘液細菌から単離された、本化合物と同一の炭素骨格を有する *chlorotonil A* は *anthracimycin* とは逆の絶対構造を有する。そこで、*anthracimycin* と *chlorotonil A* が互いに鏡像異性体として生成するメカニズムの解明に向けて *anthracimycin* 生合成の解明を試みることにした。まず生産菌株のドラフトゲノム解析を行い、生合成遺伝子クラスターを同定した (発表論文③)。AT-less 型の type I PKS であることに加え、PKS 中に3個の methyltransferase ドメインが存在し、骨格中のメチル置換基がメチオニンに由来することが示唆された。放線菌の type I PKS において、AT-less は時々見られるが、メチル基をメチオニンから取り込む例は極めて珍しい。そこで、

<sup>13</sup>C 標識メチオニンと <sup>13</sup>C 標識酢酸の添加培養による取り込み実験を行い、*anthracimycin* が有する3個のメチル基はいずれもメチオニンに由来することを証明した (発表論文④)。

## [4] ポリケタイド化合物 *akaeolide* と *lorneic acid* の生合成における特異的な炭素-炭素結合形成反応

海洋由来 *Streptomyces* sp. NPS554 株から単離した細胞毒物質 *akaeolide* は、15個の炭素が中員環を形成している新規化合物である。通常、環状ポリケタイドは炭素鎖末端カルボキシル基との分子内エステルまたはアミド結合により環化していることから、本化合物のように炭素原子のみで環状構造を形成する場合は、PKS 以外の酵素反応が介在しなければならない。一方、同じ NPS554 株から単離されたホスホジエステラーゼ阻害剤 *lorneic acid* は、脂肪酸様構造の中央にベンゼン環を有するポリケタイドである。類縁構造がいくつか知られているが、生合成に関する報告はない。<sup>13</sup>C 標識化合物の取り込み実験の結果から、両化合物ともにポリケタイド主骨格構築後の炭素-炭素結合形成が示唆されたため、NPS554 株のドラフトゲノム解析を行い、生合成遺伝子の特定を試みた。その結果、本菌株のゲノム中には少なくとも8個の type I PKS 遺伝子クラスターが存在していたが、遺伝子配列から予測される酵素ドメインの配列に基づき、*akaeolide* の生合成遺伝子クラスターを特定した。また同時に *lorneic acid* の生合成に関わる遺伝子クラスターも特定することができた。いずれの PKS も <sup>13</sup>C 標識化合物の取り込み様式に一致する酵素ドメイン配列を有していた。*Akaeolide* の PKS クラスター下流には二つの P450 遺伝子と機能未知の *aldolase* 遺伝子がコードされており、これらが *akaeolide* 生合成に関与すると推定された。一方で *lorneic acid* の PKS クラスターに隣接して下流に P450 遺伝子がコードされているのみで、他には生合成に関わると考えられる遺伝子が見られなかった。また PKS のドメイン機能からは *lorneic acid* のベンゼン環部分が通常のアルドール反応により形成されるのではなく、ポリエン前駆体から生合成されることが示唆された (発表論文⑤)。Type II PKS によるポリケトン前駆体からの芳香環化反応はよく知られているが、鎖状化合物からの芳香環形成は報告がなく、化学反応としても極めて興味深い。

## [5] ゲノムマイニングによる新規マクロリド *akaemycin* の発見

上述のように、NPS554 株が保有する8個の type I PKS 遺伝子クラスターのうち2個が *akaeolide* と *lorneic acid A* の生合成遺伝子クラスターであると特定された。引き続き、残り6個のクラスターについてもドメイン解析を行った結果、それぞれの PKS により合成されるポリケチドの構造を予測することができ

た。3 個の PKS からは炭素鎖数 10 以下の小分子が生産物と予想されたが、残り 3 つの PKS からはそれぞれ炭素鎖長が 23 個, 24 個, 35 個のポリケチドが生産され、UV スペクトルの吸収極大波長はそれぞれ約 200 nm, 約 240 nm, 約 330 nm と推定した。これらの情報に基づき、NPS554 株培養混合物の HPLC データを再解析したところ、akaeolide と lorneic acid A 以外の未知成分ピークが 330 nm に吸収極大を示すことがわかり、これが炭素鎖長 35 のポリケチドに相当すると考えられた。遺伝子情報から新規構造と推定されたため、UV スペクトルを指標に、培養抽出物を順相および逆相シリカゲルカラムで分画し、逆相系 HPLC カラムによる最終精製により目的化合物を単離した。本化合物の分子量を精密質量分析により  $C_{36}H_{56}O_{10}$  と決定し、一次元および二次元 NMR スペクトルデータの解析により平面構造を明らかにした。本化合物は、4 つの二重結合とカルボニルが共役したポリエン構造、スピロケタール構造、ポリヒドロキシ鎖を含む新規大環状ラクトンであったことから、akaemycin と命名した。配座が固定されたスピロケタール部位の立体構造は NOE 相関により決定し、残りの不斉炭素の絶対配置は PKS 中のケトレダクターゼとエノイルレダクターゼのアミノ酸配列に基づき推定した。本化合物の類似構造は海洋放線菌から単離された marinisporolide A の一例にしか見出されず、構造的に希少な化合物と言える。本化合物は細菌、酵母には活性を示さず、*Penicillium* や *Rhizopus* などの糸状菌に選択的な抗菌作用を示した (発表論文⑥)。

#### 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 6 件)

- ① Y. Kim, Y. In, T. Ishida, H. Onaka, Y. Igarashi. Biosynthetic origin of alchivemycin A, a new polyketide from *Streptomyces* and absolute configuration of alchivemycin B. *Org. Lett.*, **15**, 3514-3517 (2013) 査読有
- ② T. Fukuda, Y. Sudoh, Y. Tsuchiya, T. Okuda, Y. Igarashi. Isolation and biosynthesis of preussin B, a pyrrolidine alkaloid from *Simplicillium lanosoniveum*. *J. Nat. Prod.*, **77**, 813-817 (2014) 査読有
- ③ H. Komaki, N. Ichikawa, A. Hosoyama, N. Fujita, Y. Igarashi. Draft genome sequence of marine-derived actinomycete *Nocardioopsis* sp. TP-A0876, a producer of polyketide pyrenes. *Genome Announc.*, **2**, pii: e00665-14 (2014) 査読有
- ④ E. Harunari, H. Komaki, Y. Igarashi. Biosynthetic origin of anthracimycin: a tricyclic macrolide from *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* (2016) in press. 査読有

- ⑤ T. Zhou, H. Komaki, N. Ichikawa, A. Hosoyama, S. Sato, Y. Igarashi. Biosynthesis of akaeolide and lorneic acids and annotation of type I polyketide synthase gene clusters in the genome of *Streptomyces* sp. NPS554. *Mar. Drugs*, **13**, 581-596 (2015) 査読有
- ⑥ T. Zhou, S. Sato, H. Komaki, Y. Igarashi. Bioinformatics-inspired isolation of akaemycin, a new macrolide from marine *Streptomyces* sp. *Curr. Biotech.* **4**, 249-253 (2015) 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 金英珠, 尾仲宏康, 五十嵐康弘 “Alchivemycin の絶対配置と生合成経路の解明” 2011 年度日本農芸化学会大会, 2011 年 3 月 26 日, 京都
- ② 福田隆雄, 須藤ユリ, 土屋有紀, 奥田徹, 五十嵐康弘 “糸状菌 *Simplicillium lanosoniveum* の生産する新規ピロリジンアルカロイドとその生合成” 2011 年度日本農芸化学会大会, 2011 年 3 月 26 日, 京都
- ③ 金英珠, 小倉弘, 五十嵐康弘 “海洋由来 *Nocardioopsis* が生産する pyrone 類の構造と生合成” 2012 年度日本放線菌学会大会, 2012 年 9 月 6 日, 東京
- ④ S. Hana, W. Panbangred, Y. Kim, Y. Igarashi “Biosynthesis of anteiso-methyl group in actinomycetes polyketides” JSPS Asian CORE Program, Young Scientist Seminar, Osaka, 2013 年 8 月 4 日, 大阪
- ⑤ 春成円十郎, 小牧久幸, 五十嵐康弘 “*Streptomyces* が生産する anthracimycin の生合成に関する研究” 2015 年度日本農芸化学会中部支部大会, 2015 年 9 月 19 日, 富山
- ⑥ T. Zhou, H. Komaki, N. Ichikawa, A. Hosoyama, S. Sato, Y. Igarashi “Biosynthetic study of akaeolide and lorneic acid A, two structurally unique polyketides from marine *Streptomyces*” 2016 年度日本農芸化学会大会, 2016 年 3 月 28 日, 札幌

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐 康弘 (IGARASHI Yasuhiro)  
富山県立大学・工学部・教授  
研究者番号 : 20285159