

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651239

研究課題名(和文)オカダ酸の生合成研究

研究課題名(英文)Biosynthetic Studies on Okadaic Acid

研究代表者

阿部 郁朗 (Abe, Ikuro)

東京大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40305496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：オカダ酸生産渦鞭毛藻*Prorocentrum hoffmanianum*より、オカダ酸の生合成に関わるポリケタイド合成酵素遺伝子の同定を目的とした。微生物由来PKSの保存アミノ酸を元に設計したプライマーを用い、藻体由来DNAより二種の、葉緑体由来DNAより一種の新規PKS遺伝子配列を取得した。また、高分解能LC-MSを用いて、藻体のタンパク質分析を行い、PKS酵素断片と思われるペプチド配列の取得に成功した。今後、得られたペプチド部分配列を用いて、DNAライブラリーをスクリーニングすることで、オカダ酸生合成遺伝子クラスターを同定する。渦鞭毛藻由来複雑骨格天然物の生合成機構の全容解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to identify a gene cluster involved in the biosynthesis of okadaic acid in the dinoflagellate *Prorocentrum hoffmanianum*. As a result, we succeeded in the PCR amplifications of two PKS genes from the DNA isolated from *P. hoffmanianum*, and one PKS gene from the chloroplast DNA separated from *P. hoffmanianum* by using the degenerate primers based on the conserved sequences of bacterial PKSs. We also successfully detected the peptide sequences of the candidate PKSs by LC-orbitrap MS analyses. This is the first detection of a putative PKS proteins from *P. hoffmanianum* by the proteomic approach. These results will pave the way to future studies to understand the biosynthesis of the complex secondary metabolites in dinoflagellates.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：オカダ酸 生合成 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

渦鞭毛藻は、他の生物種では見られない独特な構造を有する二次代謝産物の生産者として注目されており、phosphatase 阻害剤であるオカダ酸 okadaic acid (図 1A)、食中毒成分の brevitoxin、抗腫瘍化合物である amphidinolide 等のポリケチドを生産することが知られている。これまでに、okadaic acid、brevitoxin、amphidinolide のラベル体酢酸取り込みによる生合成経路の予想や、amphidinolide 生産藻由来 DNA ライブラリーからのポリケチド合成酵素 (PKS) 様遺伝子の取得など、その生合成に迫る研究がいくつか行われている (Izumikawa et al. *Eur. J. Biochem.* Vol. 267, 2000, pp. 5179; Kobota et al. *Biol. Pharm. Bull.* Vol. 29, 2006, pp. 1314)。しかし、実際にその生合成酵素遺伝子が同定され、生合成経路が明らかになった例は存在しなかった。また、これらの渦鞭毛藻由来のポリケチドはその共生細菌が真の生産者であるとする説がいくつか提唱されている。実際に、共生細菌由来と思われる、PKS 中、酢酸ユニットの伸長に関わる ketosynthase (KS) 遺伝子がいくつか検出されているが (Perez et al. *Mar. Drugs.* Vol. 6, 2008, pp. 164) その PKS 遺伝子の全長配列が同定された例は存在しない。

2. 研究の目的

本研究では、okadaic acid 生産渦鞭毛藻である *Prorocentrum hoffmanianum* の共生細菌より、okadaic acid 生合成に関わる PKS 遺伝子を同定することを目的とした。PKS への基質のロードに関わる acyltransferase (AT) が PKS 酵素本体と離れて存在する trans-AT PKS (Piel, *J. Nat. Prod. Rep.* Vol.27, 2010, pp.996) に着目して、遺伝子の探索を行った。大腸菌等を宿主とした異種発現系にてこれらを発現することで、遺伝子の機能の同定をめざした。これにより okadaic acid の骨格合成経路を明らかにし、渦鞭毛藻由来ポリケチド生合成機構の全容の解明を目的とした。一般に細菌のゲノムには、複数の PKS 遺伝子が存在するため、スクリーニングの過程で目的の遺伝子以外の PKS 遺伝子が得られる可能性も高い。そこで同時に、それら PKS 遺伝子の取得もめざした。本研究により、渦鞭毛藻由来の PKS 遺伝子が同定され、その複雑骨格二次代謝産物の生合成機構の詳細の解明が可能となる。これにより、渦鞭毛藻由来の微量代謝産物の安定供給系の構築、新規有用物質創成系の構築などが期待される。

3. 研究の方法

Okadaic acid については、これまでにアイソトープ標識酢酸の取り込み実験によってその生合成経路の概要が予想されている (図 1A)。Okadaic acid は 1、10、25、26 位の酢酸単位の 1 位が欠失した構造を持つ。従って、

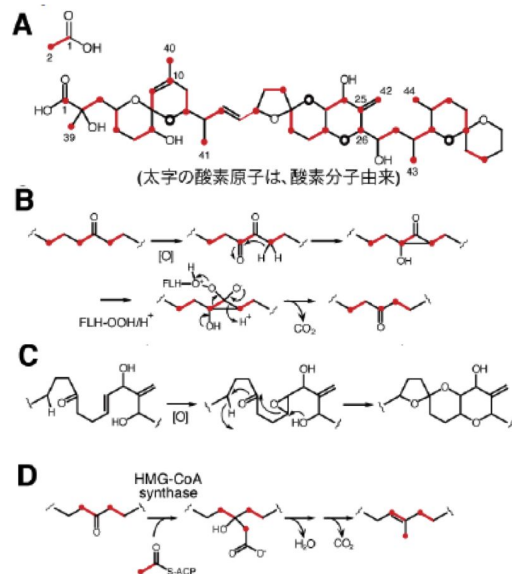


図 1 okadaic acid の予想生合成機構 (A) okadaic acid の化学構造とそのラベル酢酸ユニットの取り込みパターン、(B) Favorskii 酸化による骨格形成、(C) ポリエーテル環の生成機構、(D) HMG-CoA synthase による β -alkylation 反応

酢酸の 1 位が脱炭酸によって除かれる Favorskii 酸化がその生合成に関わることが予想される (図 1B)。また、okadaic acid の 8-12 位間、19-23 位間、22-26 位間、30-34 位間の酸素原子は酸素分子由来であることから (図 1A)、okadaic acid に存在するポリエーテル環は、二重結合が酸化されて生じた epoxide に由来するものと考えられる (図 1C)。こうした骨格形成機構は、これまでに知られている他のポリケチド生合成経路では見られず、新規で特殊な骨格形成機構の存在が予想された。さらに、okadaic acid の 39-44 位のメチル基は酢酸の 2 位に由来することから、HMG-CoA synthase が酢酸ユニットの 1 位の炭素を、ケトンの根本の炭素原子に求核攻撃することでメチル化を行う、 β -alkylation によって導入されるものと考えられる (図 D)。こうした β -alkylation はこれまで、AT-less PKS の関与する代謝経路に主に見出されていることから (Piel, *J. Nat. Prod. Rep.* Vol. 27, 2010, pp. 996)、okadaic acid の生合成には trans-AT PKS が関与することが予想された。Trans-AT PKS 遺伝子は細菌のみに見出されるため、okadaic acid の生合成遺伝子はその共生細菌が保有しているものと推測した。

(1) PCR による遺伝子探索プローブの作成

共生細菌由来の DNA または cDNA より HMG-CoA synthase、また trans-AT の KS 遺伝子配列をターゲットして縮重プライマーを作製し、PCR 法を用いて、DNA ライブラリーより目的の遺伝子クラスターを探索することを計画した。ここで、Okadaic acid 生産藻の *P. hoffmanianum* とは別に、類縁種であり

okadaic acid 非産生株の *Prorocentrum micans* をネガティブコントロールとして用いることで、脂肪酸合成酵素など、一次代謝に関わる酵素遺伝子を候補から除外した。また、共生細菌は、葉緑体のような細胞内に存在することが示唆されているため、市販の葉緑体除去キットを用いて葉緑体画分を分取し、それを PCR の鋳型に用いた。

(2) LC-MS による抽出タンパク質溶液中からの PKS タンパク質の検出

渦鞭毛藻はゲノムサイズが大きいことが知られているため、全ゲノムシーケンスなどの遺伝子情報を網羅的に調べる手法は困難である。そこで、DNA ベースで遺伝子配列から探索する手法とは別に、発現されたタンパク質の中からプロテオームの手法を用いて、PKS 酵素を LC-MS によって検出する方法も試みた。

PKS はその構造の一部である carrier protein 上に phosphopantetheine 基をロードし、そこに基質をロードすることでポリケチド伸長反応を触媒する。そこで、タンパク質を断片化したペプチド配列を LC-MS/MS 分析し、娘イオンの中から phosphopantetheine と一致するフラグメントを持つものを PKS タンパク質の一部として同定することが可能になる (Bumpus, S. B. et al., *Nat. Biotechnol.* Vol. 27, 2010, pp. 996) (図 2)。我々は、高分解能を持つ orbitrap-MS を用いて渦鞭毛藻由来のタンパク質を分析し、MS/MS ピークを精査することで、PKS タンパク質の検出を試みた。この方法により渦鞭毛藻にて発現している酵素タンパク質を候補として見出し、得られたタンパク質のアミノ酸配列を MS/MS によって決定、それを元にして primer を設計することで、効率良く候補遺伝子を探索できることが期待された。

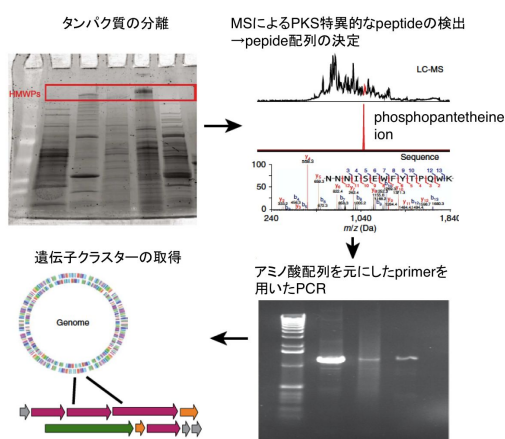


図 2 LC-MS を用いた PKS 特異的な peptide 配列の検出による生合成酵素遺伝子の探索

4. 研究成果

(1) *P. hoffmanianum* を、f/2 vitamin 培地にて蛍光灯に当てながら培養した。培養開始 2、3、4 週間後にそれぞれ藻体を集めて、液体窒素で凍結後、乳鉢で破碎した。クロロホルム、界面活性剤である CTAB、エタノール沈殿による精製の後ゲノム DNA を取得した。また、鞭毛藻の葉緑体を SIGMA 社の chloroplast isolation kit を用いて分離し、それぞれの DNA を proteinase K、lysozyme を用いて抽出した。葉緑体は細胞のサイズに基づいた遠心分離によって藻体と分離されるため、その共生細菌も葉緑体画分に含まれる可能性が高い。細菌由来 AT-less PKS の ketosynthase (KS) の保存アミノ酸を元に設計した縮重プライマー degKS2F, degKSR5 (Schirmer, A. et al., *App. Environ. Microbiol.* Vol. 71, 2005, pp. 4840) を用い、単離した DNA を鋳型として、PCR による KS 配列の増幅を試みた。その結果、藻体由来 DNA より二種の KS 配列 (PhoffKS1, PhoffKS2) を、葉緑体共生細菌由来 DNA より一種の KS 配列 (PhoffKS3) を取得した。これらはいずれも *P. hoffmanianum* より単離された既知の KS 配列と一致しない、新規遺伝子配列であった。Okadaic acid 合成酵素遺伝子由来の KS を絞り込むために、*P. hoffmanianum* 藻体より RNA を抽出し、RT-PCR を行った。その結果、PhoffKS1 遺伝子について cDNA からの増幅がみられた。この結果、PhoffKS1 遺伝子の転写が確認され、ターゲットの遺伝子配列である可能性が高いと考えられた。また、 β -alkylation に関わる HMG-CoA synthase 遺伝子の増幅を期待して、縮重プライマーを用いた PCR を行ったが、こちらでは増幅が検出されなかった。

(2) Okadaic acid 合成に関わる PKS タンパク質を探索するために、ノースウェスタン大学の Neil Kelleher 教授と共同研究を行い、高分解能 LC-MS によるプロテオーム解析を行った。*P. hoffmanianum* と *P. micans* を(1)と同様

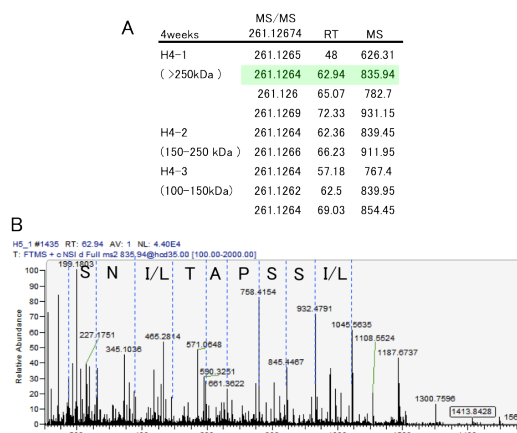


図 3 LC-MS を用いた *P. hoffmanianum* 特異的な PKS 由来 peptide の検出 (A) 培養 4 日目の藻体から検出した MS/MS に 261.1267 と誤差 0.001 以内の分子量ピークを含む peptide の一覧、(B) (A) の表中、緑で示した peptide のアミノ酸配列の同定

に培養し、培養開始 2、3、4 週間後にそれぞれ藻体を集め、プロテアーゼ阻害剤を含むバッファーにて懸濁後、超音波破碎にてタンパク質抽出液を取得した。抽出液を SDS-PAGE にて分離した後、PKS が含まれることが見込まれる 100 kDa 以上の高分子量画分を分取し、還元、アルキル化の後にトリプシン消化して、タンパク質をペプチド化し、LC-MS のサンプルとした。高分解能 LC-MS である LTQ-orbitrap MS を用いて、タンパク質分離に適した Aqua C18 3 ml particle size のシリカを充填したガラスカラムを用いてペプチドを分離し、分析した。その結果、*P. hoffmanianum*、*P. micans* 共に藻類に共通に含まれる光合成に関わるタンパク質である ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase や photosystem II protein が検出され、タンパク質の抽出、検出が適切に行われたことが分かった。次に、*P. micans* からのサンプルには検出されず、*P. hoffmanianum* からのタンパク質のみに検出され、phosphopantetheine 基に由来する娘イオン、MS 261.12674 を MS/MS フラグメント中に含むペプチドに注目して解析を行った。その結果、培養日数 2 日目、3 日目、4 日目のサンプルより、それぞれ 17、15、9 つの候補ペプチドを検出した。その中より、培養日数 4 日目のサンプル中に含まれる peptide のアミノ酸配列を MS/MS フラグメントより同定し、phosphopantetheine と結合するセリンを含むものを見出した(図 3A 緑部)。本 peptide は、SNITAPSSI のアミノ酸配列を持つことが分かり(図 3B) 他の PKS と弱い相同性を持つことが分かった。このことから、この peptide はオカダ酸合成 PKS である可能性が示唆された。今回の結果はオカダ酸生産藻体の *P. hoffmanianum* からの初の PKS 酵素断片の検出となり、オカダ酸合成酵素遺伝子の同定への大きな一歩となった。今後、得られたペプチド配列を元に DNA プローブを作成し、それを用いて *P. hoffmanianum* の DNA ライブラリーをスクリーニングし、オカダ酸合成 PKS 遺伝子クラスターの取得が期待される。

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 3 件)

Wilson, M. C., Mori, T., Rückert, C., Uria, A. R., Helf, M. J., Takada, K., Gernert, C., Steffens, U. a E., Heycke, N., Schmitt, S., Rinke, C., Helfrich, E. J. N., Brachmann, A. O., Gurgui, C., Wakimoto, T., Kracht, M., Crüsemann, M., Hentschel, U., Abe, I., Matsunaga, S., Kalinowski, J., Takeyama, H., Piel, J., An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire, *Nature*, Vol. 506,

2014, pp. 58-62. DOI : 10.1038/nature12959
査読あり

Yan, Y., Chen, J., Zhang, L., Zheng, Q., Han, Y., Zhang, H., Zhang, D., Awakawa, T., Abe, I., Liu, W., Multiplexing of combinatorial chemistry in antimycin biosynthesis expands the molecular diversity and utility, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, Vol. 52, 2013, pp.12308-12312. DOI : 10.1002/anie.201305569 査読あり

阿部 郁朗、生合成工学による創薬、*ファルマシア*, Vol. 50, 2014, pp509-511. 査読あり

{ 学会発表 } (計 4 件)

淡川 孝義, Ioana NTAI, 佐竹 真幸, Neil KELLEHER, 橘和夫, 阿部 郁朗, 「LC-MS による渦鞭毛藻由来ポリケタイド合成酵素の検出」日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 29 日、神奈川県横浜市

Abe, I., Expanding the catalytic repertoires of biosynthetic enzyme, *Enzyme Engineering XXII: Emerging topics in Enzyme Engineering (招待講演)*, 2013 年 9 月 22 日- 9 月 26 日、富山県富山市

Wakimoto, T., Abe, I., A bacterial symbiont of Japanese marine sponge *Discodermia calyx*, produces biologically active metabolites, XIV International Symposium on Marine Natural Products and 8th European Conference on Marine Natural Products, 2013 年 9 月 15 日- 9 月 20 日、La Toja, Galicia, Spain

Abe, I., Engineered biosynthesis of medicinal natural products, International Conference on Medicinal Chemistry and Timmerman Award 2013 (招待講演), 2013 年 10 月 29 日- 10 月 30 日、Jakarta, Indonesia

{ 図書 } (計 1 件)

Abe, I., Wiley, *Natural Products: Discourse, Diversity and Design (分担執筆)*, 2014

{ その他 }

東京大学大学院薬学系研究科天然物化学教室 <http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~tennen/head.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 郁朗 (ABE, Ikuro)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号 : 40305496

(2) 研究分担者

淡川 孝義 (AWAKAWA, Takayoshi)
東京大学・大学院薬学系研究科・助教
研究者番号：80609834