

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：36102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710253

研究課題名(和文)新規類縁体の創製を目指したマニユマイシン系抗生物質の生合成研究

研究課題名(英文)Biosynthetic study of manumycin antibiotics for creating novel analogs

研究代表者

伊藤 卓也 (Ito, Takuya)

徳島文理大学・薬学部・講師

研究者番号：90517484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：アスカマイシン生産菌の遺伝子を解析したところ、アスカマイシンの生合成に関与する遺伝子クラスターの存在が明らかになった。シクロヘキサン合成酵素(AsuB3)及び5-アミノレブリン酸合成酵素遺伝子(D3)を破壊したところ、アスカマイシンが生産されなかったことから、この遺伝子クラスターがアスカマイシンを生合成することが証明された。また、新規アスカマイシンの創製を目的として、これら遺伝子破壊株を利用したmutasynthesisによる方法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Sequence analysis of genome from asukamycin producing strain revealed a gene cluster involve in the biosynthesis of asukamycin. Genetic disruption of cyclohexane synthase (asuB3) and 5-aminolevulinate synthase (asuD2), individually abrogated asukamycin production, this confirmed the involvement of the asu gene cluster in asukamycin biosynthesis. Mutasynthesis approach using these mutants was developed for the generation of novel asukamycin analogs.

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：放線菌 mutasynthesis 生合成 遺伝子工学

## 1. 研究開始当初の背景

これまでに放線菌やカビなどの微生物からは、多種多様な生物活性物質が見出されてきた。その中には、感染症やガンなどの治療薬として使用され、多くの人命を救ってきているものも少なくない。近年、免疫抑制剤であるシクロスポリン、FK506や糖尿病治療薬であるアカルボースのように、抗菌活性や抗ガン活性以外の生物活性を示す代謝産物も微生物から単離されている。このように医薬品や医薬リード化合物の探索において、微生物由来の二次代謝産物はさらに重要な探索源になると考えられる。しかしながら、毒性が強い、あるいは、体内で分解されやすいなどの理由により、医薬品としては利用できない生物活性二次代謝産物も多い。このことから、毒性の軽減および薬効の向上、薬物動態の改善を目的として、有機合成的に代謝産物の一部を修飾・変換して医薬品開発することが多く、高脂血症薬プラバスタチンや糖尿病薬ボグリボースなども微生物代謝物を化学変換して開発された。近年、化学的手法だけでなく、遺伝子工学および分子生物学的手法を用いて活性物質生産菌を改変し新たな新規類縁体を産生させる技術も確立されようとしている。

マニユマイシン系抗生物質は、抗菌活性および抗真菌活性、殺虫作用など多様な生物活性を有することが報告されている。最近、マニユマイシン系抗生物質が RAS フェルネシルトランスフェラーゼ、およびインターロイキン 1 $\beta$  変換酵素を阻害することが報告されている。これらのことから、抗ガン剤あるいは抗炎症剤の開発において、新たなマニユマイシン類縁体の創製が期待されている。

一方、放線菌 *Streptomyces nodosus* subsp. *asukaensis* ATCC 29757 から産生されるアスカマイシンは、マニユマイシン系に属する抗腫瘍抗生物質である。その構造は、マニユマイシン系抗生物質の特徴である 2-amino-4-hydroxy-5,6-epoxycyclohex-2-enone 部分 (C7N unit) と、“lower chain” および “upper chain” と呼ばれる *trans*-トリエン構造からなっている。“Upper chain” の末端にはシクロヘキサン環が、“lower chain” の末端には 2-amino-3-hydroxycyclopent-2-enone (C5N unit) が存在する。今回、著者らは生物活性および化学構造が興味深いアスカマイシンに注目し、新たな類縁体の創製およびアスカマイシンの生合成経路解明を目指した分子生物学的および分子生物学的手法を用いたアスカマイシンの生合成研究に挑戦した。

## 2. 研究の目的

放線菌は、多種多様な生物活性物質を産生することが知られており、その中には医薬品として応用されるものも少なくない。しかしながら、強い毒性のために医薬品としては利用できない代謝産物も多い。このことから、

毒性の軽減および薬効の向上を目的とした類縁体合成が望まれている。近年、分子生物学的手法を使った抗生物質の生合成研究が盛んに行われるようになり、このような手法を利用すれば新規類縁体の創製が期待できる。このようなことから、今回、申請者は、放線菌 *S. nodosus* subsp. *asukaensis* ATCC 29757 が産生するアスカマイシンに注目し、新たな類縁体創製を目指して、以下の研究を計画した。

- (1) アスカマイシン生合成遺伝子クラスターのクローニング
- (2) 遺伝子破壊株による新規アスカマイシン類縁体の創製
- (3) 遺伝類縁体の生産性の向上のための遺伝子改変株の調製

## 3. 研究の方法

- (1) アスカマイシン生合成遺伝子クラスターのクローニング

本化合物の生合成遺伝子クラスターを得る目的で、生産菌 ATCC 29757 のゲノム DNA から Fosmid 遺伝子ライブラリーを構築した。また、高速ゲノムシーケンサー (Illumina Genome Analyzer IIx) やプライマーウォーキングなどを利用して、陽性 Fosmid クローンを得る。さらに、得られた陽性クローンの塩基配列を特定し、ホモロジー解析を行い、遺伝子クラスターを特定する。これを基に、本化合物の生合成経路を予測する。

- (2) 遺伝子破壊株による新規アスカマイシン類縁体の創製

取得した遺伝子クラスターがアスカマイシンの生合成に関わっているかを確認する目的で、シクロヘキサン環、および C5N 部分の生合成に関与すると考えられる酵素遺伝子 (*asuB3*、および *asuD2*、両遺伝子) を破壊した株 ( $\Delta$ *asuB3* 株、 $\Delta$ *asuD2* 株、 $\Delta$ *asuB3/D2* 株) を調製する。Mutasyntesis とは、遺伝子破壊株に生合成中間体もしくは、それによく似た構造の基質を添加して培養することにより、新規類縁化合物を産生させる方法である。この方法を利用して、取得した遺伝子破壊株に種々のシクロアルカンカルボン酸を添加して培養し、新たな類縁体の創製を行う。

- (3) 遺伝類縁体の生産性の向上のための遺伝子改変株の調製

シクロアルカンカルボン酸を添加した破壊株の培養物からは、新規類縁体の産生は確認できたが、様々な生物活性試験に供するための十分な量は確保できなかった。したがって、大量に新規類縁体が産生されるシステムを構築する必要があった。クラスター中には、転写因子などの調節遺伝子が存在していた。これら調節遺伝子を導入した株を作製して、新規類縁体の生産性を向上させることを試みる。

## 4. 研究成果

- (1) アスカマイシン生合成遺伝子クラスター

## ーのクローニング

本菌株のゲノムシーケンサーなどの解析によりドラフト配列が得られた。この配列を基に ORF 解析および機能タンパク質のアノテーション解析を行ったところ、シクロヘキサン環部分を生合成する cyclohexane carbonyl (CHC) CoA ligase、および C7N unit を生合成する 3,4-AHBA 合成酵素と非常に相同性が高い遺伝子が認められた。そこで、これら酵素遺伝子の配列を基にプライマーを作製して遺伝子ライブラリーの PCR スクリーニングを行った。その結果、陽性の Fosmid クローンを取得し、asukamycin 生合成遺伝子クラスターの存在が類推できた。

アスカマイシンの生合成経路を予想した。C7N 部分の生合成は、また、dihydroxyacetone phosphate (DHAP) および aspartate 4-semialdehyde (ASA) を基質として、わずか 2 ステップで 3,4-AHBA を生成する酵素 GriH および GriI が発見されている。クラスター中にある AsuA1 および AsuA3 は、それぞれ GriH および GriI と非常に相同性が高いことから、アスカマイシンの 3,4-AHBA もこれら酵素により生合成されていることが予想された。一方、AsuB1-B4 は、シクロヘキサンカルボン酸を合成する酵素群と高い相同性を示した。したがって、CHC CoA は、シキミ酸からこの酵素群より生合成されることが支持された。また、C5N unit は、glycin および succinyl CoA を原料として 5-aminolevulinic acid (ALA) synthase により、ALA を経て生合成されると考えられる。トリエン構造は type II PKS により生合成されると予想された。

CHC CoA および 3,4-AHBA を出発原料として、これら酵素による炭素鎖伸長により upper および lower chain のトリエン体が構築される。その後、得られた 2 つのトリエンが amide synthetase (AsuD1) によりペプチド結合を形成し、lower chain の末端に C5N unit が縮合して protoasukamycin が作られる。さらに、monooxygenase (AsuE3, E2) により AHBA 部分がエポキシ体へと導かれアスカマイシンが得られると予想できる。

## (2) 遺伝子破壊株による新規アスカマイシン類縁体の創製

クラスター内の各タンパクの機能を確かめる目的で、シクロヘキサン合成酵素の機能を破壊した株  $\Delta$ asuB3、および C5N 部分を合成する酵素を破壊した株  $\Delta$ asuD2、両方の機能を破壊したダブルノックアウト株  $\Delta$ asuB3/D2 を調製した。

$\Delta$ asuB3 は、シクロヘキサン部分が欠如した類縁体が産生されていた。また、 $\Delta$ asuD2 は C5N 部分が欠如した類縁体が、 $\Delta$ asuB3/D2 は、両方の部分の化学構造が欠如した類縁体が産生されていた。そこで、これら破壊株に、生合成中間体によく似た基質を加えて培養すると、全く新しい類縁体が産生されると考え、 $\Delta$ asuB3 に、シクロペンタンカルボン酸、シクロブタンカルボン酸などを

添加して培養したところ、シクロヘキサン部分が置き換わった化合物が産生されていた。さらに、ダブルノックアウト株  $\Delta$ asuB3/D2 に、これらカルボン酸を加えたところ、C5N 部分は欠如し、シクロヘキサン部分が置き換わった類縁体が産生されており、mutasynthesis による新規類縁体の創製に成功した。

## (3) 遺伝類縁体の生産性の向上のための遺伝子改変株の調製

遺伝子破壊株  $\Delta$ asuB3 および  $\Delta$ asuB3/D2 を利用した mutasynthesis により、新規類縁体の産生は確認できたが、様々な生物活性試験に供給するだけの生産性は示していなかった。そこで、大量に新規類縁体が産生されるシステムを構築する必要があった。生合成遺伝子クラスター中には、転写因子などの調節遺伝子と相同性の高い asuR1-5 が存在していた。それぞれの遺伝子を破壊した株を調製して培養したところ、asuR1 および R5 株からは、全くアスカマイシンが産生していなかった。このことから、asuR1 および R5 は、生合成遺伝子の転写を促進することが考えられた。そこで、asuR1 および R5 を大量発現できるベクターを作製し、親株にベクターを導入した改変株を調製した。しかしながら、アスカマイシンの産生量は、親株に比べて、asuR1 導入株は 5 倍程度高かったが、asuR5 導入株は同程度しかなかった。クラスターでは、asuR1-R4 が連続して存在しているため、この 4 つの調節遺伝子をカセットとして導入した株を作製した。その結果、アスカマイシンの生産量は親株に比べて 20 倍と飛躍的に向上した。このことは、asuR1-R4 の 4 つの遺伝子が生合成クラスター全体の転写の促進に関わっていることがわかった。

したがって、 $\Delta$ asuB3 および  $\Delta$ asuB3/D2 に調節遺伝子 asuR1-R4 を導入した株にも、種々のシクロアルカンカルボン酸を添加した場合、数倍以上の生産量の向上が期待できた。そこで、この遺伝子改変株を調製し、同様に基質を添加して培養したところ、数倍程度の生産性が向上した。

## 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 Ito, T., Biosynthetic study of actinomycetes-metabolites for creating novel analogs, *Yakugaku Zasshi*, **2013**, 133, 1007-1015
- ② Xie, P., Sheng, Y., Ito, T., Mahmud, T., Transcriptional Regulation and Increased Production of Asukamycin in Engineered *Streptomyces nodosus* subsp. *asukaensis* Strains. *Appl. Microbiol. Biotech.* **2012**, 96, 451-460.
- ③ Yoshikawa, K., Otsu, M., Ito, T., Asakawa, Y., Kawano, S., Hashimoto, T., Aromatic

- Constituents of Cymbidium Great Flower Marie Laurencin and their Antioxidative Activity, *J. Nat. Med.* **2013**, 67, 217-221.
- ④ He, R., Wakimoto, T., Egami, Y., Kenmoku, H., Ito, T., Asakawa, Y., Abe, I. **Heterologously expressed** -hydroxyl fatty acids from a metagenomic library of a marine sponge. *Bioorgan. Med. Chem Lett.* **2012**, 22, 7322-7325
- ⑤ Yan, Y., Zhang, L., Ito, T., Qu, X., Asakawa, Y., Awakawa, T., Abe, I., Liu, Wen. Biosynthetic pathway for highly structural diversity of a common dilactone core in antimycin production. *Org. Lett.* **2012**, 14, 4142-4145.
- ⑥ He, R., Wakimoto, T., Takeshige, Y., Egami, Y., Kenmoku, H., Ito, T., Wang, B., Asakawa, Y., Abe, I. Porphyrins from a metagenomic library of the marine sponge, *Discodermia calyx*, *Molecular BioSystems.* **2012**, 8, 2334-2338.
- ⑦ Yoshikawa, K., Ito, T., Iseki, K., Baba, C., Imagawa, H., Yagi, Y., Morita, H., Asakawa, Y., Kawano, S., Hashimoto, T. Phenanthrene Derivatives from Cymbidium Great Flower Marie Laurencin and Their Biological Activities, *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, 605-609.

[学会発表] (計 13 件)

- ① 伊藤卓也、奨励賞受賞講演、新規生物活性類縁体の創製を目指した放線菌代謝産物の生合成研究、第 51 回日本薬学会中国四国支部学術大会 (島根)、2012 年 11 月 10-11 日
- ② 伊藤卓也、特別講演、新規生物活性類縁体の創製を目指した放線菌代謝産物の生合成研究、文科省戦略的研究基盤形成支援事業『疾患関連遺伝子及び疾患治療に用いる天然有機化合物の生合成遺伝子の包括的解析』第 3 回研究発表会、徳島文理大学薬学部 (徳島)、2012 年 7 月 7 日
- ③ Ito, T., Awakawa T., Qu, X., Yan, Y., Asakawa, Y., Liu, W., Abe, I., Cloning and Characterization of Antimycin Biosynthetic Gene Cluster and Huge PKS Gene Cluster, International Conference of Natural Products Biosynthesis (ICNPB) Enzymology, Structural Biology, Drug Discovery and Genome Mining, June 17-22 2012—Awaji Shima, Japan
- ④ 張驪驛、伊藤卓也、脇本敏幸、淡川孝義、浅川義範、阿部郁朗、メディオマイシン生合成遺伝子の同定、日本薬学会第 134 年会 (熊本)、2014 年 3 月 27-30 日
- ⑤ 長島史裕、井上進之介、上田淳也、新田佳代、仲松早希、八木康行、伊藤卓也、

- 浅川義範、本邦産、マレーシア産およびアルゼンチン産苔類のテルペノイド、日本薬学会第 134 年会 (熊本)、2014 年 3 月 27-30 日
- ⑥ 川崎崇、渡邊あゆみ、伊藤卓也、今村信孝、Oridamycin 生合成遺伝子のクローニング、日本薬学会第 134 年会 (熊本)、2014 年 3 月 27-30 日
- ⑦ 浅川義範、中山維摩、伊藤卓也、第 57 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会 (埼玉)、2013 年 10 月 5-7 日
- ⑧ 山田陽香、佐藤道大、伊藤卓也、高橋公咲、野口博司、渡辺賢二、放線菌由来新規化合物の探索、第 60 回日本生薬学会 (北海道)、2013 年 09 月 7-8 日
- ⑨ 阿部高大、Taifo Mahmud、兼目 祐充、浅川義範、伊藤卓也、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害物質トレストアチンの生合成遺伝子群のクローニング、日本薬学会第 133 年会 (横浜)、2013 年 03 月 27-30 日
- ⑩ 張 魔驛、Yan YAN、伊藤卓也、Xudong QU、淡川孝義、浅川 義範、Wen Liu、阿部 郁朗、アンチマイシン生合成経路の探索と新規アナログの生産、日本薬学会第 133 年会 (横浜)、2013 年 03 月 27-30 日
- ⑪ 小栗友紀、稲井誠、伊藤卓也、堀川美津代、加来裕人、角田鉄人、cryptolactone A 及びその誘導体の合成と生物活性評価、日本薬学会第 133 年会 (横浜)、2013 年 03 月 27-30 日
- ⑫ 脇本敏幸、江上蓉子、淡川孝義、伊藤卓也、兼目裕允、浅川義範、阿部郁朗、Calyculin A 生合成遺伝子クラスターの探索、第 54 回天然有機化合物討論会 (東京)、2012 年 9 月 18-20 日
- ⑬ 吉川和子、井関賀奈子、伊藤卓也、浅川義範、橋本敏弘、河野幸子、シンビジウム ‘グレートフラワー’ マリーローランサン’ の根の化学成分とそれらの抗菌活性について (2)、日本生薬学会第 59 回年会 (千葉)、2012 年 09 月 17-18 日

[その他]

ホームページ等

<http://p.bunri-u.ac.jp/lab01/home.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤卓也 (ITO TAKUYA)  
徳島文理大学薬学部講師  
研究者番号 : 90517484