

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：32425

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670048

研究課題名(和文) 微生物の生物機能を用いた次世代ケミカルプロセスの構築

研究課題名(英文) Unprecedented enzyme-catalyzed generation of complexity in fumagillin-pseurotin biosynthesis

研究代表者

野口 博司 (Noguchi, Hiroshi)

日本薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：60126141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の生産する fumagillin (1) は強力な血管新生阻害活性を示す。我々は1が有する重要なファーマコフォアに着目し、生合成経路を改変することで非天然型誘導体を創製を目的に研究を行った。同時に、全く別のファーマコフォアを有する血管新生阻害剤 synerazol (2) の創製にも挑戦した。4種類の新規 fumagillin 誘導体を10種類以上の新規 synerazol 誘導体を獲得し、その化学構造を決定した。さらに極めて興味深いことに、ある種の生合成遺伝子破壊株からは、1や2とは全く異なる骨格構造を有す化合物も獲得された。

研究成果の概要(英文)：We identified a novel mechanism of an enzymatic trans-to-cis isomerization of an olefin that plays a part in generating the observed chemical diversity among the pseurotin-type fungal secondary metabolites. In vitro characterizations of pseurotin biosynthetic enzymes revealed that the glutathione-S-transferase PsoE required a participation of the bifunctional epoxidase-C-methyltransferase PsoF to complete the trans-to-cis isomerization of a pathway intermediate, presynerazol. The PsoE-glutathione-presynerazol complex crystal structure indicated that stereospecific glutathione-presynerazol conjugate formation is the principal function of PsoE. Moreover, this study revealed PsoF to have an additional, unexpected oxidative isomerase activity, making it a trifunctional enzyme that is key to the complexity generation in pseurotin biosynthesis.

研究分野：天然物化学

キーワード：生合成 天然物化学 物質生産 抗生物質 生物活性 酵素化学 微生物 反応機構

## 1. 研究開始当初の背景

着香料や染料、芳香剤、薬剤などの高付加価値物質、あるいはそれら化合物の前駆体および原料となるファインケミカルの多くは、原油を用いた化学合成によって供給されている。また、化学合成には加圧、加熱、冷却、乾燥などを行なうために電力や燃料の使用が必要不可欠となり、有限な化石燃料などの資源を多大に消費する。また、化学合成は毒性を示す副産物や環境に有害な有機溶媒やガスの排出も伴う。従って、環境に調和した持続可能な工業生産を実現するには、有限な資源消費の抑制および化学合成に必要なエネルギーと副産物の発生削減が必須となる。主要なファインケミカルの一つである芳香族化合物、特にカテコール (CAQ) は用途が広く、主に香料、芳香剤、農薬の原料として使用されている。CAQ は年間 2000 万トンレベルで工業生産されており、全世界における年間生産額は約 100 億円に達する (Fiege, H. et al. Ullmann 's Encyclopedia of Industrial Chemistry 2000)。CAQ の最終生産過程である過酸化水素によるフェノールの水酸化は低公害なプロセスである (Sato, K., et al. Science 1998)。一方、フェノール (Weber, M., et al. Ullmann 's Encyclopedia of Industrial Chemistry 2004) およびその原料となるベンゼン (Folkens, H.O. Ullmann 's Encyclopedia of Industrial Chemistry 2000)、プロペン (Griesbaum, K., et al. Ullmann 's Encyclopedia of Industrial Chemistry 2000) の生産は原油由来の炭化水素の加工と精製に依存している。また、CAQ から生合成可能な本研究課題の目的化合物の一つである *cis,cis*-ムコン酸 (ccMA) は、ナイロンなどのポリアミド系プラスチックの原料であるアジピン酸の前駆体である。現在、アジピン酸の工業生産によって温室効果の原因となる一酸化二窒素や酸性雨の原因となる窒素酸化物を含む有害な副産物を排出することが知られている。しかしながら、アジピン酸は年間約 25 億トン (Musser, M.T. Ullmann 's Encyclopedia of Industrial Chemistry 2000) もの莫大な量が消費されている。このような状況下、これまでに無い革新的な環境調和型の生産プロセスの開発が望まれている。さらに芳香族化合物に関しては、carbofuran (農薬) やバニリン (香料)、4-tert-butylcatechol (重合停止剤) などの化学製品の重要原料であり、大量に生産されている。これらの製造プロセスに関しても環境調和型の生産プロセスへ移行することが近年期待されている。

上記の期待に応えるべく、本研究によって得られる知見から、代謝経路、培養条件および化合物の精製技術の最適化を探索し、シアノバクテリアを活用した高効率な化合物の生合成システムの確立を目指す。将来的には、

確立したシアノバクテリア合成システムに様々な代謝経路を導入し、多くの医薬品や機能性食材の原料となりうる化合物の実用的な供給を試みる。

## 2. 研究の目的

糸状菌 *Aspergillus fumigatus* は化学構造の全く異なる 2 種類の血管新生阻害剤、fumagillin (1) および pseurotin 類を生産する。これまでに 1 の合成誘導体 TNP-470 について抗がん剤としての臨床開発研究が行われていたが、その副作用や薬物動態の悪さのために現在では開発が中止されている。我々は、依然として医薬品リードとして重要な 1 について、生合成遺伝子および生合成経路が未解明であったこと、遺伝子工学的手法を用いて非天然型誘導体を創出することで新たな医薬品候補を世に提供することを目的として、その生合成研究に着手した。

## 3. 研究の方法

[Fumagillin-pseurotin 複合型生合成遺伝子クラスターの発見]

その化学構造より、1 はテルペン骨格とポリケタイド骨格から構成されていると推測された。そこで *A. fumigatus* ゲノム中よりテルペン環化酵素、ポリケタイド合成酵素を含む遺伝子クラスターを探索したところ、第 8 番染色体上にこれらの条件を満たすクラスターが確認された。続いて本領域に含まれるテルペン環化酵素の遺伝子破壊株 *fma-TC* 株を構築した。その代謝産物を LC-MS にて解析したところ、1 の生産消失が認められた。以上の実験から、1 の生合成遺伝子クラスターを同定することに成功した。興味深いことに、*fma-TC* は全く別の二次代謝産物 pseurotin A (2) 生合成に必須な遺伝子 *psoA1* のすぐ近傍の約 2.5 kb 離れた位置に存在していた。

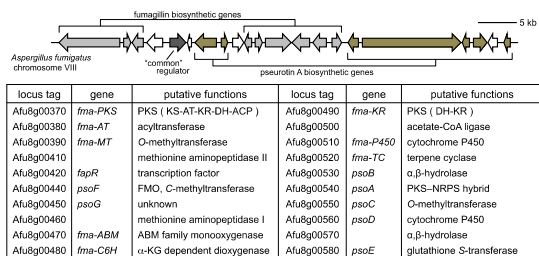


図 1. Fumagillin-pseurotin 生合成遺伝子クラスター

続いて、1 の生合成経路解明を目指した。1 の生合成遺伝子クラスターに存在する約 15 種の酵素遺伝子について、それぞれの遺伝子破壊株を作製した。その結果、8 種の遺伝子破壊株において 1 の生産が失われ、これらの遺伝子が 1 の生合成に必須であることが示唆された。一方、別の 2 種の遺伝子破壊株 (

psoF, psoG)では、1の生産に変化は認められなかったものの、予想外なことに2の生産が消失していた。さらに転写因子遺伝子 fapR 破壊株においては、1と2が共に生産されていない。以上の結果から、染色体上の本領域において1と2の生合成に必須な遺伝子が互いに交じり合って存在していること、加えて、一つの転写因子 FapR により各化合物の生合成が統一的に制御されていることが示唆された。そこで、当初2の生合成遺伝子として推定されていた計6種の遺伝子(psoAを含む)についても同様に遺伝子破壊を行い、うち4種の遺伝子が2の生合成に必須であることを実験的に確認した。以上、全く別の化学構造を持つ1および2が、約20種の酵素遺伝子から構成される一つの巨大クラスターによって生合成されると決定した(図1)。

#### 4. 研究成果

##### [Fumagillin 生合成経路の解明]

2013年、上述した我々の研究とは独立してTangらは1の生合成遺伝子を同定し、テルペン環化酵素 Fma-TC が1のテルペン骨格の前駆体である  $\beta$ -trans-bergamotene (3)の合成を触媒することを報告した。同様な解析を行っていた我々は、1の生合成の完全解明を目指してTangらとの共同研究を開始した。1のテルペン部分はその生合成中間体である3と比較すると、高度に酸素官能基化されていることがわかる(図2)。すなわち、3よりfumagillol (7)に至る経路においては数段階の酸化反応が行われていると推測された。本クラスターには酸化酵素として、 $\alpha$ -ケトグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼ Fma-C6Hおよびシトクロム P450 である Fma-P450 が含まれていたため、まずはこれら遺伝子破壊株の代謝産物解析を行った。

fma-C6H株からはLC-MSにおいてm/z 429を示す代謝産物の生産が認められた。本物質を精製し、NMRスペクトル解析によりその化学構造を6-demethoxyfumagillin (8)と決定した。同様に、fma-MT株からは6-demethylfumagillin (9)を単離・構造決定した。

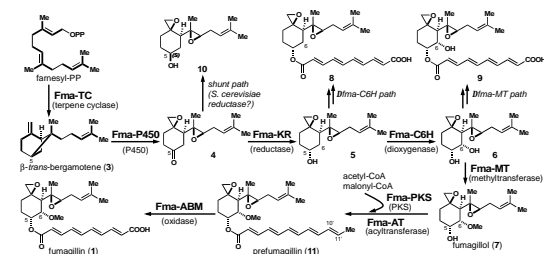


図2. Fumagillin 生合成経路

よって、1の6位メトキシ基はFma-C6Hによる酸化、Fma-MTによるメチル化により形成されると考えられた。そこで大腸菌を用いて調製したFma-C6H酵素について、8を基質に in

vitro 反応を試みたが、この場合、変換は全く認められなかった。そこで、この酸化反応がポリエン鎖付加前に起こると予想し、8をアルカリ加水分解して得た6-demethoxyfumagillol (5)を基質として反応させたところ、速やかに生成物として6-demethylfumagillol (6)を与えた。なお、Fma-C6HとFma-MTの共存下において5が7へと変換されることも確認した。

fma-P450株においては1が生産されず、一方で3の生産が検出された。A. fumigatus 野生株における3の生産量は検出限界以下であることから、Fma-P450酵素損失に伴い3が蓄積していると予測され、3がFma-P450の基質であることが示唆された。出芽酵母 Saccharomyces cerevisiae 異種発現系を用いて調製したFma-P450酵素に対し基質として3を加えたところ、5-epi-demethoxyfumagillol (10)の生成が認められた。ところがその5位水酸基は天然物1とは逆の立体配置(S配置)を有しており、10をfma-TC株培養系に添加しても1の生合成能の回復が認められなかったことから、10は生合成中間体ではないことが示唆された。その推定反応機構からFma-P450の真の産物はケトン体4であり、10は出芽酵母内在性の酵素により立体選択的に還元され生成したと考えられた。我々は、1の生合成経路においてはFma-KRが4の5位ケトンを選択的(R配置)に還元すると推測した。Fma-KRは一般的なPKSに含まれるDH-KRドメイン領域に相同性を示す、不完全なPKS様酵素である。本遺伝子破壊株fma-KRにおいては1の生産量が極端に減少したことから、本遺伝子は偽遺伝子などではなく、確かに機能を持つことが示唆された。そこで、異種発現により調製したFma-KRタンパク質について、4を添加したところ、予想通り5の生成が確認された。以上、生合成初期段階において、3を基質としてFma-P450、Fma-KR、Fma-C6H、Fma-MTの4つの酵素により7が形成されることを証明した。特にFma-P450は複数回の酸化反応を触媒する性質を持つ上で興味深い。その反応機構として、(i) 3の5位水素の引き抜きと続く水酸化、(ii) 9位水素の引き抜きに基づく bicyclo[3.1.1]構造のラジカル的開裂、及び続く5位水酸化と8,9位のオレフィン形成、(iii) 8,9位へのエポキシ化、(iv) 1,2位へのエポキシ化、という連続的な変換反応を触媒することが示唆された(図3)。

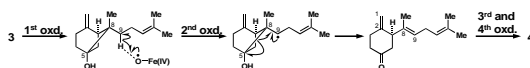


図3. Fma-P450による連続的酸化反応の推定反応機構

ところでTangらは、1のポリケタイド部分が dodecapentaenoate に由来し、これがFma-PKSにより合成されること、アシル基転

移酵素 Fma-AT によって 7 の 5 位にアシル化されることを報告している。一方、1 の生合成のためには dodecapentaenoate 部分の炭素-炭素二重結合が開裂する必要があり、本反応を司る酵素が存在すると予測された。Fma-ABM は DUF4188 と定義された機能不明ドメインを持つタンパク質とアノテーションされており、当初その機能予測が困難であった。その遺伝子破壊株 fma-ABM 株からは m/z 455 を示す化合物が検出され、その化学構造を prefumagillin (11)、すなわち二重結合開裂前の中間体であると決定した。そこで fma-ABM を出芽酵母にて発現させ、基質として 11 を添加したところ 1 への変換が認められた。以上の実験から Fma-ABM が 1 の生合成の最終段階、ポリケチド鎖二重結合の位置選択的開裂反応を触媒することを証明した(図 2)。

#### [Pseurotin 類生合成経路の解明]

2 やその類縁体である azaspiroline (12)、synerazol (15) もまた血管新生阻害活性を示すことが知られており、これらは 1 とは全く異なるファーマコフォアを持つことから医薬品リード候補としてまた重要である。加えて 2 の化学構造中にはスピロ環構造が含まれ、このような立体的に複雑な化学構造が如何にして構築されるのか未解明であったことから、その生合成研究に着手した。

PsoF はその N 末端領域にフラビン依存型酸化酵素(FMO)ドメインを、C 末端領域にはメチル基転移酵素(MT)ドメインを有することから他に類を見ない二機能性酵素であると推測された。psoF 株においては 2 の生産が消失し、その代わりに化合物 16 が極僅かながら生産された。16 の構造は 15 と比較して、10, 11 位のエポキシ基、3 位メチル基が欠如していたことから、PsoF がこれらの官能基を形成する機能を持つことが予測された。PsoF の MT ドメインは一般的な O-メチル基転移酵素よりもむしろ PKS 中に含まれる MT ドメインに高い相同性を示した。つまり、その機能は伸長中のポリケチド鎖に対する C-メチル化であると予測された。そこでポリケチド鎖伸長途中の基質ミミックを合成し酵素反応に供したところ、予想通り PsoF 依存的な C-メチル化反応が観測された。この C-メチル化は PsoA 酵素反応における PKS モジュールから NRPS モジュールへのアシル基転移に重要な役割を担っていた。すなわち PsoF が反復型 PKS(PsoA)におけるマロニル CoA の縮合回数 of 正確性を規定するゲートキーパーとして機能していることが強く示唆された。

一方、PsoF の FMO ドメインは 15 の 10, 11 位のエポキシ環形成に関与すると考えられた。そこで別途 psoE 株から獲得した presynerazol (14) について、組み換え PsoF

タンパク質による酵素反応に供したところ、確かに 10, 11 位オレフィンに対するエポキシ化が確認された。しかし、本酵素反応の生成物は天然物 2 ではなく、その 12, 13 位二重結合がトランス体である 17 であった。17 は *A. fumigatus* 野生株からは全く検出されない化合物であったが、psoE 株において多量に生産されていた。

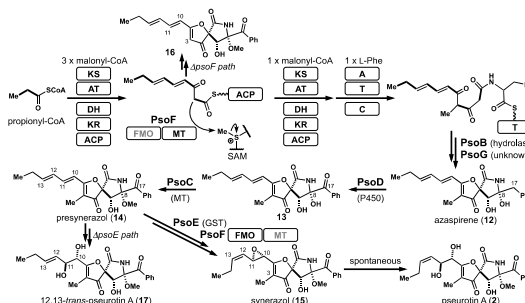


図 4. Pseurotin 類の生合成経路

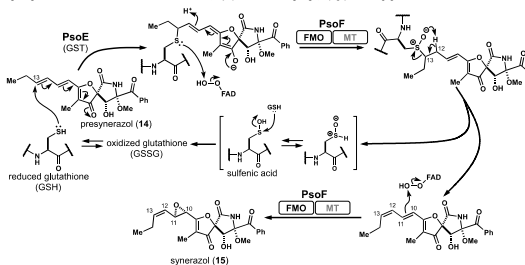


図 5. PsoE と PsoF によるグルタチオン依存的な酸化的二重結合の異性化

以上のことから、グルタチオン転移酵素 PsoE が二重結合の異性化に関与すると推測された。そこで実際に基質 14 に対して PsoE 及び PsoF を共処理したところ、生成物として 15 および 2 を選択的に与えた。詳細な検討の結果、本反応の進行には触媒量の還元型グルタチオン(GSH)が必須であること、PsoF を反応系に加えなければ異性化は全く進行しないことが判明した。次にその反応の詳細を解明することを目指し、PsoE タンパク質の X 線結晶構造解析に着手した。その結果、PsoE-14-GSH の三者複合体の結晶構造を 2.5 Å の分解能にて得ることに成功した。結晶構造中の PsoE タンパク質内部において、基質 14 はその 13 位炭素と GSH が共有結合を形成していた。PsoF 非存在下においては 14 の異性化が起こらないことを加味すると、本反応において (i) PsoE による 14 の 13 位への GSH 共役付加、(ii) PsoF による GSH 由来硫黄原子の酸化(スルホキシド生成)、(iii) スルホキシドの syn 脱離によるシス型オレフィンの形成、(iv) PsoF による 10, 11 位オレフィンのエポキシ化、という過程を経て 15 が形成されていると考えられた。

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 3件)

1. Yamamoto, T., Tsunematsu, Y., Hara, K., Suzuki, T., Kishimoto, S., Kawagishi, H., Noguchi, H., Hashimoto, H., Tang, Y., Hotta, K., Watanabe, K. Oxidative trans-to-cis isomerization of olefin in polyketide biosynthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 55, 6207-6210, 2016. (IF=11.709)
2. Yamamoto, T., Tsunematsu, Y., Noguchi, H., Hotta, K., Watanabe, K. Elucidation of pyranonigrin biosynthetic pathway reveals a mode of tetramic acid, fused  $\gamma$ -pyrone and exo-methylene formation. *Org. Lett.*, 17, 4992-4995, 2015. (IF=6.732)
3. Tsunematsu, Y., Fukutomi, M., Saruwatari, T., Noguchi, H., Hotta, K., Tang, Y., Watanabe, K. Elucidation of pseurotin biosynthetic pathway points to trans-acting C-methyltransferase: generation of chemical diversity. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, 8475-8479, 2014. (IF=11.709)

[学会発表](計 7件)

1. 天内優子、崔宰熏、恒松雄太、渡辺賢二、道羅英夫、鈴木智大、河岸洋和:冬虫夏草 *Cordyceps militaris* における cordycepin 生合成経路の研究、日本農芸化学会 2017 年京都大会、2017 年 3 月 17-20 日
2. 恒松雄太、野口博司、TANG Yi、渡辺賢二: Pseurotin 類生合成におけるスピロ環形成機構の解明
3. 日本薬学会第 136 年会(横浜市) 2016 年 3 月 26-29 日
4. 恒松雄太、山本 剛、渡辺賢二: 天然物生合成遺伝子を利用した新規素材探索
5. 新規素材探索研究会 第 15 回セミナー(横浜市) 2016 年 6 月 3 日 12.
6. 恒松雄太、山本剛、福富愛美、岸本真治、Lin Hsiao-Ching、Tang Yi、渡辺賢二: Fumagillin-pseurotin 生合成系における構造多様性創出を担う酵素群の機能解析、第 58 回天然物討論会(仙台市) 2016 年 9 月 14-16 日 32.
7. Yuta Tsunematsu, Tsuyoshi Yamamoto, Hiroshi Noguchi, Kinya Hotta and Kenji Watanabe: Elucidation of Pseurotin Biosynthetic Pathway revealing the unexpected role of glutathione S-transferase in natural product biosynthesis, *Pacificchem*

2015, Sheraton Waikiki, Honolulu, Hawaii (USA), 2015 年 12 月 15-20 日

[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

<http://sweb.u-shizuoka-ken.ac.jp/~kenji55-lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口博司 (NOGUCHI, Hiroshi)

研究者番号: 60126141

現在: 日本薬科大学・薬学部・教授

採択時: 静岡県立大学・薬学部・教授

(2) 研究分担者

渡辺賢二 (WATANABE, Kenji)

研究者番号: 50360938

静岡県立大学・薬学部・教授

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )