

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H01836

研究課題名(和文) 複雑骨格天然物の生合成マシナリーの解明と物質生産

研究課題名(英文) Biosynthetic studies on complex natural products

研究代表者

阿部 郁朗 (Abe, Ikuro)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・教授

研究者番号：40305496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,000,000円

研究成果の概要(和文)：複雑骨格天然有機化合物の生合成反応機構の解明と物質生産を目的とした。テレオシジンB、カリクリンA、アンチマイシン、メロテルペノイド、テルペノイド、インドールアルカロイド、ポリケタイドなど、各種複雑骨格天然物の生合成マシナリーの詳細や酵素反応機構の立体構造基盤の解明に成功し、一連の研究成果を印刷公表した。

研究成果の概要(英文)：We aimed to elucidate biosynthetic reaction mechanism of complex natural products. We succeeded in elucidating the details and structural basis of the biosynthetic machinery of various complex natural products such as telecidin B, calyculin A, antimycin, meroterpenoids, terpenoids, indole alkaloids, polyketides. We published the results in scientific journals.

研究分野：生物分子科学

キーワード：合成生物学 生合成 酵素 遺伝子 物質生産 構造生物学

1. 研究開始当初の背景

ポストゲノムの時代、多くの生物のゲノム情報が容易に入手可能で、ゲノムマイニング（遺伝子探索）が化合物の探索に直結する時代になった。最近、研究代表者らの研究室でも、海綿共生菌のメタゲノムなどから、非常に複雑で巨大な分子骨格をもった天然物の生合成遺伝子クラスターの取得に次々に成功しており、遺伝子の設計図をもとに生合成システムを改変したり、生合成酵素の立体構造情報に基づく触媒機能の操作、また、これら遺伝子の異種発現により、微生物を生産工場とした物質生産系の構築なども既に現実のものになりつつある。これにより、希少有用物質の安定供給や、天然物に匹敵する新規有用化合物ライブラリーの構築などが可能になる。生合成システムを利用した効率的な物質生産は、クリーンかつ経済的な新しい技術基盤として、医薬品など広く有用物質の安定供給を可能にするため、最近米国で報告された、モルヒネ（鎮痛薬）、タキソール（抗がん薬）、アルテミシニン（抗マラリア薬）などの微生物醗酵生産の試みのように、この分野の研究（合成生物学）は、資源が枯渇しつつある現代にあってますます重要になる。

2. 研究の目的

複雑骨格天然物の生合成反応機構の解明と物質生産を目的とする。具体的には、最近申請者の研究室でその生合成遺伝子クラスターの取得に成功した、(1)放線菌が生産する強力なタンパクリン酸化酵素（PKC）活性化作用を示す発癌プロモーターのテレオシジン B、(2)難培養性海綿共生菌が生産する強力なタンパク脱リン酸化酵素阻害剤であるカリクリン A、および、(3)これらの関連化合物をとりあげ、その生合成マシナリーの解明と物質生産系の構築をめざす。生合成の鍵となる段階を触媒する酵素については、X線結晶構造解析により、酵素反応の立体構造基盤を明らかにするとともに、結晶構造に基づく酵素触媒機能の拡張と最適化をめざす。また、これら遺伝子を異種発現系に再構成することにより、構造多様性の拡大と物質生産系の構築を実現する。

3. 研究の方法

テレオシジン B の生合成に関与する 4 つの酵素の *in vitro* 機能解析と X 線結晶構造解析により、その生合成マシナリーの全容を解明し、物質生産系を構築する。酵素反応中間体の静的配置及び酵素反応の進行に伴う動的変化を解明し、酵素触媒機能の制御に挑戦する。また、基質アナログ等を作用させることで、分子構造多様性の拡大と酵素触媒機能の拡張、最適化を実現する。一方、非常に複雑な骨格を有し、巨大な遺伝子クラスターによりコードされているカリクリン A については、比較的コンパクトなタンパクサイズで、大腸菌での異種発現が期待できる、post PKS

の修飾反応に関わる酵素の機能解析にまず着手する。即ち、3 つのリン酸基転移酵素と新奇なフラビン酸化酵素の、機能解析と X 線結晶構造解析を行い、生合成マシナリーの詳細を解明する。その他、これら関連化合物についても同様な学際的な方法論を用いて研究を進めた。

4. 研究成果

テレオシジンの骨格生合成において、インドールに異なる長さのプレニル基を、通常の反応とは異なるリバースプレニレーションで付加させる二つの酵素の結晶構造を得ることに成功し、そのメカニズムを解明した。また、二つの酵素の構造を比較した結果、プレニル基の長さを制御するメカニズムも明らかにした。プレニル化は天然物の活性を向上させるために重要な反応として知られているため、本成果は生体触媒によるドラッグデザインへの貢献、例えば、有機合成では困難な反応などに本酵素を用いることが期待される。加えて、テレオシジンについては、非リボソーム型ペプチド合成酵素 TleA と P450 酸化酵素 TleB の構造機能解析を行った。L-tryptophan と L-valine から、9 員環インドラクトラムを構築する非リボソーム型ペプチド合成酵素 TleA と、ペプチド鎖の酸化的環化を触媒する新奇な P450 酸化酵素 TleB についても同様に、大腸菌に異種発現した組み替え精製酵素を用いて、*in vitro* 精密機能解析と X 線結晶構造解析を試み、後者については高分解能で構造解析に成功した。

カリクリン A については、大腸菌での異種発現可能な post PKS 修飾反応に関わる酵素の機能解析に着手した。現在なお、3 つのリン酸基転移酵素と新奇なフラビン酸化酵素の、機能解析と X 線結晶構造解析が進行中である。

一方、医薬品として重要な複雑骨格天然物であるポリケタイドの合成酵素にも着手した。細菌のゲノム中より見出した巨大なポリケタイド合成酵素の異種発現により、既知のポリケタイドと似ているものの異なる構造を持つ新しいポリケタイドが生合成されることを発見した。そこで、自然界がどのように構造の違いを作り分けているかを、遺伝子を解析することにより調べた結果、構造の違いは遺伝子が組み変わることに起因していることを明らかにした。さらに、遺伝子中で組み換えが起きる領域や組み換えの規則についても部分的に解明することに成功した。ポリケタイド合成酵素は組み立てラインのような構造を取り、遺伝子の配列と得られる化合物の構造が対応することが特徴であり、今回の成果は組み立てラインのモジュールを自由自在に並べ替え、多様なポリケタイド化合物を作り出すことへの応用が期待される。

これ以外にも、9員環ジラクトン骨格を持ち、強力な電子伝達系阻害活性を有する抗生物質アンチマイシンや、様々な生物活性を示すβ-カルボリンアルカロイド、メロテルペノイドやセスタテルペン、インドールアルカロイドなど、各種複雑骨格天然物の生合成マシナリーの詳細や酵素反応機構の立体構造基盤の解明にも成功し、一連の研究成果を印刷公表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計65件)

以下、すべて査読あり

1. Awakawa, T., Mori, T., Nakashima, Y., Zhai, R., Wong, C. P., Hillwig, M. L., Liu, X., Abe, I. “Molecular basis for Mg²⁺-dependent allosteric control of indole prenylation by aromatic prenyltransferase AmbP1.” *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 6810-6813 (2018). DOI: 10.1002/anie.201800855
2. Wang, G.-Q., Chen, G.-D., Qin, S.-Y., Hu, D., Awakawa, T., Li, S.-Y., Lv, J.-M., Wang, C.-X., Yao, X.-S., Abe, I., Gao, H. “Biosynthetic pathway for furanosteroid demethoxyviridin and identification of an unusual pregnane side-chain cleavage”, *Nature Commun.*, **9**, 1838 (2018). DOI: 10.1038/s41467-018-04298-2
3. Nakashima, Y., Mori, T., Nakamura, H., Awakawa, T., Hoshino, S., Senda, M., Senda, T., Abe, I., “Structure function and engineering of multifunctional non-heme iron dependent oxygenases in fungal meroterpenoid biosynthesis”, *Nature Commun.*, **9**, 104 (2018). DOI: 10.1038/s41467-017-02371-w
4. Nakamura, H., Matsuda, Y., Abe, I., “Unique chemistry of non-heme iron dependent enzymes in fungal biosynthetic pathway”, *Nat. Prod. Rep.*, **35**, in press (2018). DOI: 10.1039/C7NP00055C
5. Wong, C. P., Awakawa, T., Nakashima, Y., Mori, T., Zhu, Q., Liu, X., Abe, I., “Two distinct substrate binding modes for the normal and reverse prenylations of hapalindoles by the prenyltransferase AmbP3”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **57**, 560-563 (2018). DOI: 10.1002/anie.201710682
6. Mori, T., Iwabuchi, T., Hoshino, S., Wang, H., Matsuda, Y., Abe, I., “Molecular basis for the unusual ring reconstruction in fungal meroterpenoid biogenesis”, *Nature Chem. Biol.*, **13**, 1066-1073 (2017). DOI: 10.1038/nchembio.2443
7. Lv, J.-M., Hu, D., Gao, H., Kushiro, T., Awakawa, T., Chen, G.-D., Wang, C.-X., Abe, I., Yao, X.-S., “Biosynthesis of helvolic acid and identification of an unusual C-4-demethylation process distinct from sterol biosynthesis”, *Nature Commun.*, **8**, 1644 (2017). DOI: 10.1038/s41467-017-01813-9
8. Zhang, L., Hashimoto, T., Qin, B., Hashimoto, J., Kozono, I., Kawahara, T., Okada, M., Awakawa, T., Ito, T., Asakawa, Y., Ueki, M., Takahashi, S., Osada, H., Wakimoto, T., Ikeda, H., Shin-ya, K., Abe, I., “Characterization of giant modular PKSS provides insight into genetic mechanism for structural diversification of aminopolyketides”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **56**, 1740-1745 (2017). DOI: 10.1002/anie.201611371
9. Mori, T., Zhang, L., Awakawa, T., Hoshino, S., Okada, M., Morita, H., Abe, I., “Manipulation of prenylation reactions by structure-based engineering of bacterial indolactam prenyltransferases”, *Nature Commun.*, **7**, 10849 (2016). DOI: 10.1038/ncomms10849
10. Mori, T., Awakawa, T., Shimomura, K., Saito, Y., Yang, D., Morita, H., Abe, I., “Structural insight into the enzymatic formation of bacterial stilbene”, *Cell Chem. Biol.*, **23**, 1468-1479 (2016). DOI: 10.1016/j.chembiol.2016.10.010
11. Matsuda, Y., Iwabuchi, T., Fujimoto, T., Awakawa, T., Nakashima, Y., Mori, T., Zhang, H., Hayashi, F., Abe, I., “Discovery of key dioxygenases that diverged the paraherquonin and acetoxyldehydroaustin pathways in *Penicillium brasilianum*”, *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 12671-12677 (2016). DOI: 10.1021/jacs.6b08424
12. Okada, M., Matsuda, Y., Mitsushashi, T., Hoshino, S., Mori, T., Nakagawa, K., Quan, Z., Qin, B., Zhang, H., Hayashi, F., Kawaide, H., Abe, I. “Genome-based discovery of an unprecedented cyclization mode in fungal sesterterpenoids biosynthesis”, *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 10011-10018 (2016). DOI: 10.1021/jacs.6b05799
13. Matsuda, Y., Mitsushashi, T., Lee, S., Hoshino, M., Mori, T., Okada, M., Zhang, H., Hayashi, F., Fujita, M., Abe, I., “Astellifadiene, a unique tetracyclic fungal sesterterpene: structure determination by an NMR-coupled crystalline sponge method and elucidation of its biosynthesis”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **55**, 5785-5788 (2016). DOI: 10.1002/anie.201601448
14. Qin, B., Matsuda, Y., Mori, T., Okada, M., Quan, Z., Mitsushashi, T., Wakimoto, T., Abe, I., “An unusual chimeric diterpene synthase from *Emericella varicolor* and its functional conversion to a sesterterpene

- synthase by domain swapping”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 55, 1658-1661 (2016).
DOI: 10.1002/anie.201509263
15. Wakimoto, T., Egami, Y., Abe, I., “Nature’s way of making the sponge-derived cytotoxin”, *Nat. Prod. Rep.*, 33, 751-760 (2016). DOI: 10.1039/C5NP00123D
 16. Matsuda, Y., Abe, I., “Biosynthesis of fungal meroterpenoids”, *Nat. Prod. Rep.*, 33, 26-53 (2016).
DOI: 10.1039/C5NP00090D
 17. Matsuda, Y., Awakawa, T., Mori, T., Abe, I., “Unusual chemistries in fungal meroterpenoid biosynthesis”, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 31, 1-7 (2016).
DOI: 10.1016/j.cbpa.2015.11.001
 18. Matsuda, Y., Iwabuchi, T., Wakimoto, T., Awakawa, T., Abe, I., “Uncovering the unusual D-ring construction in terretinin biosynthesis by collaboration of a multifunctional cytochrome P450 and a unique isomerase”, *J. Am. Chem. Soc.*, 137, 3393-3401 (2015).
DOI: 10.1021/jacs.5b00570
 19. Zhang, L., Mori, T., Zheng, Q., Awakawa, T., Yan, Y., Liu, W., Abe, I., “Rational control of polyketide extender units by structure-based engineering of a crotonyl-CoA carboxylase/reductase in antimycin biosynthesis”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 54, 13462-13465 (2015).
DOI: 10.1002/anie.201506899
 20. Mori, T., Hoshino, S., Sahashi, S., Wakimoto, T., Matsui, T., Morita, H., Abe, I., “Structural basis for the β -carboline alkaloids production by the microbial homodimeric enzyme McbB”, *Chem. Biol.*, 22, 898-906 (2015).
DOI: 10.1016/j.chembiol.2015.06.006

〔学会発表〕(計80件)

- 以下、すべて発表者：阿部郁朗（招待講演）
1. 2018/01/23 The Society for Industrial Microbiology (SIMB), “2nd International Conference on Natural Product Discovery and Development in the Genomic Era”, Clearwater Beach, Florida, USA, “Unusual Enzyme Reactions in Fungal Meroterpenoid Biosynthesis”.
 2. 2017/10/02 1st China-Japan Joint Symposium on Natural Product Biosynthesis, Shanghai, China, “Unusual Enzyme Reactions in Fungal Meroterpenoid Biosynthesis”
 3. 2017/07/30 The American Society of Pharmacognosy Annual Meeting, Portland, Oregon, USA, “Engineered Biosynthesis of Fungal Meroterpenoids”
 4. 2017/07/18 13th International Meeting on Biosynthesis, Function and Synthetic

- Biology of Isoprenoids (TERPNET 2017), Dalian, China, “Structure-guided Engineered Biosynthesis of Fungal Meroterpenoid”
5. 2017/05/31 9th US-Japan Seminar on Natural Product Biosynthesis, UCLA Lake Arrowhead Conference Center, California, USA, “Enzymes Involved in the Complex Natural Products Biosynthesis”
 6. 2016/10/16 13th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms (GIM2016), Wuhan, China, “Engineered Biosynthesis of Medicinal Natural Products”
 7. 2016/07/26 Cytochrome P450 Biodiversity & Biotechnology, Vancouver, Canada, “Multifunctional Oxygenases Involved in Complex Natural Products Biosynthesis”
 8. 2015/12/19 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015), Symposium on Bioorganic Reaction, Honolulu, Hawaii, USA, “Multifunctional Oxygenases in the Biosynthesis of Fungal Meroterpenoids”
 9. 2015/11/30 14th Federation of Asian and Oceanian Biochemists and Molecular Biologists (FAOBMB) Congress, Current Excitements in Biochemistry and Molecular Biology for Agriculture and Medicine, Hyderabad, India, “Engineered Biosynthesis of Medicinal Natural Products”
 10. 2015/09/30 Beilstein Organic Chemistry Symposium 2015, Natural Products, Prien, Germany, “Biosynthesis of Fungal Meroterpenoids”
 11. 2015/06/03 12th International Meeting on Biosynthesis, Function and Synthetic Biology of Isoprenoids (TERPNET 2015), Vancouver, Canada, “Biosynthesis of fungal meroterpenoids”

〔その他〕

ホームページ：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

脇本 敏幸 (WAKIMOTO, Toshiyuki)
北海道大学・薬学研究院・教授
研究者番号：70363900

(2015年より連携研究者)

岡田 正弘 (OKADA, Masahiro)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授
研究者番号：40377792
(2017年より連携研究者)

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

松田 侑大 (MATSUDA, Yudai)
東京大学・大学院薬学系研究科・助教
研究者番号：10720766
(2016年より連携研究者)

森 貴裕 (MORI, Takahiro)
東京大学・大学院薬学系研究科・助教
研究者番号：60734564
(2016年より連携研究者)

中村 仁美 (NAKAMURA, Hitomi)
東京大学・大学院薬学系研究科・助教
研究者番号：90800657

(3)連携研究者

森田 洋行 (MORITA, Hiroyuki)
富山大学・和漢医薬学総合研究所・教授
研究者番号：20416663

千田 俊哉 (SENDA, Toshiya)
大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・教授
研究者番号：30272868