

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2015～2016
課題番号：15H05996
研究課題名(和文) 海綿由来細胞毒性物質カリクリンA生合成機構の全容解明

研究課題名(英文) Investigation of calyculin biosynthesis pathway

研究代表者

江上 蓉子 (EGAMI, Yoko)

北海道大学・薬学研究院・助教

研究者番号：50758612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、海綿由来細胞毒性物質カリクリンAの詳細な生合成機構の解明を目指した。カリクリン生産菌*Entotheonella* sp.は難培養性であり、その遺伝子の機能を解析する確立した方法がない。今回、カリクリン生合成遺伝子にコードされる推定修飾酵素および生合成中間体を調製し、カリクリンの構造に特徴的なニトリル、リン酸エステル、奇数ポリケチド鎖の生合成機構について*in vitro*における機能解析を行った。その結果、酸化酵素CaIDの解析において新たな酵素反応生成物を得ることができ、今後につながる重要な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to investigation of calyculin A biosynthetic pathway. Uncultured symbiont bacteria *Candidatus Entotheonella* sp. had been identified as calyculin producer. To obtain functional evidences of uncultured bacterial genome, there is no ways other than manipulate gene in cultivable heterologous host, or establish the cultivation condition. To analysis of the biosynthetic mechanisms for nitrile formation, phosphorylation at C17, and chain-shortening process during calyculin biosynthesis, putative tailoring enzymes and substrates were prepared based on bioinformatics of calyculin biosynthetic gene, and subjected to *in vitro* analyses. As a result, new compound was detected in CaID enzyme reaction.

研究分野：天然物化学

キーワード：カリクリンA 生合成

1. 研究開始当初の背景

海綿動物からは、これまでに様々な生物活性物質が単離報告されてきた。その中には、ハリコンドリル B に代表されるように抗がん剤のリード化合物として有望視されるものが複数あり、海綿は医薬品開発において重要な天然資源である。一方で、自然界において、これらの多くは海綿の化学防御物質としての役割を有すると考えられてきた。その構造に目を向けてみると、多様で複雑なものが多く、また、その生物活性も特異的であり、これらの分子構造が生産生物内で精緻に組み立てられたことが伺える。このような天然有機化合物の生合成機構を明らかにすることは学術的に興味深い。2000年以降の遺伝子解析技術の目覚ましい発展により、様々な生物の全ゲノム解析が進み、それに伴い、天然物の生合成研究も大きく進んできた。その一方で、海綿動物を起源とする生物活性物質の生合成研究は、世界中の研究機関において遂行されてきたにも関わらず、報告例は少ない。その要因の1つとして、長年、海綿二次代謝産物の真の生産者として考えられてきた共生微生物の存在があげられる。海綿動物には膨大な量の多種多様な微生物が共生していることが報告されており、かつ、そのほとんどが難培養性とされている。複雑な微生物叢から目的の生物活性物質の生合成遺伝子を取得すること、また、その生産者を同定することは極めて難しい。海綿を起源とする生物活性物質の生合成研究の数少ない成功例として、2014年、J. Pielらは八丈島産海綿 *Theonella swinhoei* に含まれる二次代謝産物の多くの生合成遺伝子が共生バクテリア '*Candidatus Entotheonella factor TSY1*' にコードされることを報告している (*Nature*, 506, 58, 2014)。さらに、我々は伊豆半島沿岸に生息する海綿 *Discodermia calyx* に共生するバクテリア '*Candidatus Entotheonella sp.*' をカリクリン A 生産菌として特定した (*Nat. Chem. Biol.*, 10, 648, 2014)。しかしながら、これらのバクテリアは培養困難であるため、生合成遺伝子を取得しても、その後、遺伝子機能を解析するための確立した方法がないのが現状である。実際に、海綿由来二次代謝産物の生合成遺伝子を取得した例は未だに僅か数例であり、さらに、その生合成経路を詳細に解析した例については皆無であった。

2. 研究の目的

本研究課題では、海綿 *D. calyx* 由来細胞毒性物質カリクリン A の生合成機構の詳細な解明を目指した。申請者らは、2010年よりカリクリン A の生合成研究を行ってきており、海綿メタゲノムから全長約 150 kb におよぶ巨大なポリケタイド合成酵素 (PKS) および非リボソーム型ペプチド合成酵素 (NRPS) をコードする *cal* 遺伝子の単離に成功している。DNA 配列より推測可能な生合

成産物は、カリクリン A の構造と高い相関が認められ、本遺伝子クラスターがカリクリン生合成遺伝子であることが強く示唆された。しかしながら、*cal* 遺伝子にコードされる PKS-NRPS により構築される中間体の骨格が、最終的にカリクリン A へと成熟するためには、種々の修飾反応が生じる必要があり、その詳細な機構については未だ解明に至っていない。そこで、本研究では、カリクリン A の生合成経路における (1) ニトリル形成、(2) C17 位のリン酸化、(3) ポリケタイド鎖の減炭反応について、各修飾反応を担う酵素の探索およびその機能解析を行った。本研究は、天然物の新規生合成機構の解明に加え、難培養性微生物を起源とする生物活性物質の生合成研究において有用な方法論の提示に繋がる。

3. 研究の方法

カリクリン生産菌 '*Candidatus Entotheonella sp.*' は現時点で実験室下での培養に成功していない。そのため、天然物の生合成研究において広く利用されている遺伝子破壊などの生産生物を用いた手法を用いることが困難であった。本研究では、*cal* 遺伝子上にコードされている候補となるタンパク質を異種発現し、*in vitro* における機能解析を行った。酵素反応の基質は *cal* 遺伝子の配列情報と過去の類縁化合物の単離報告例から生合成経路を推測し、その部分構造を有機合成によって調製した。

(1) ニトリル生合成機構の解析

① リン酸基転移酵素 CalM および CalP の機能解析

末端アミド類縁体カリクリンアミド類が同一海綿から単離されていることから、カリクリン A のニトリルはアミドを経由して生合成される可能性を推定した。*cal* 遺伝子上流にはリン酸基転移酵素と配列相同性を有する機能未知タンパク質 CalM および CalP がコードされており、これらがアミドニトリル変換反応を担っている可能性が示唆された。そこで、これらのタンパク質をシャペロン存在下、大腸菌 BL21 (DE3) にて異種発現後、His-tag 精製し、酵素反応を行った。基質としてカリクリンアミド A、脱リン酸化体デホスホノカリクリンアミド A およびピロホスフェート体ホスホカリクリンアミド A を用いた。種々の 2 価金属イオン存在下、様々な pH および温度において酵素反応を行った。

② CalTE の機能解析

cal 遺伝子の下流にはカリクリンの骨格に認められない余分な PKS-NRPS がコードされており、その存在意義は不明である。チオエステラーゼ (CalTE) による生合成酵素からの切り離し機構の解析は、カリクリン末端構造の生合成に新たな知見を与える。そこで、CalTE の機能解析を行った。CalTE を

BLR(DE3)にて異種発現後、His-tag 精製した。また、余分な PKS-NRPS により生合成される末端部分の推定構造を合成した。

(2) C17 位リン酸化機構の解析

① CalM および CalP の機能解析

前項 (1)-①で記述したように、*cal* 遺伝子にはリン酸基転移酵素 CalM および CalP がコードされており、カリクリン A の C17 位リン酸化を担っている可能性が高い。そこで、(1)-①と同様の方法で、CalM および CalP の機能解析を行った。酵素反応の基質として、天然より単離報告されている脱リン酸化体デホスホノカリクリン A およびその末端アミド類縁体デホスホノカリクリンアミド A を用いた。

② C17 位ヒドロキシ基の立体化学の検討

リン酸エステルが結合する C17 位のヒドロキシ化を担うケトリダクターゼ (CalKRm19) のアミノ酸配列から推測可能な立体化学は、カリクリン A の構造と一致しない。そこで、CalKRm19 の立体選択性について検討した。CalKRm19 は、大腸菌 BLR(DE3)にて異種発現した。推定生合成中間体の部分構造を SNAC 体および CoA 体として有機合成により調製した。さらに、*Bacillus* 由来ホスホパンテテニルトランスフェラーゼ Sfp 触媒下、合成した CoA 体をアシルキャリアプロテイン (ACP) へローディングし、CalKRm19 の基質とした。

(3) ポリケタイド鎖減炭機構の解析

通常、PKS ではマロニル-CoA を伸長基質として C2 単位で炭素骨格が伸長されるが、カリクリン A のポリケタイド部分の炭素鎖は C25 である。この奇数炭素のポリケタイドの構築機構を解明するために、*cal* 遺伝子に認められるフラビン依存性モノオキシゲナーゼと相同性を有する CalD の機能解析を行った。CalD は、シャペロン共存下、大腸菌 BL21(DE3)にて異種発現した。また、生合成中間体として推定される部分構造を SNAC 体として合成し、様々な条件下、酵素反応を行った。

4. 研究成果

(1) ニトリル生合成機構の解析

① リン酸基転移酵素 CalM および CalP の機能解析

各種大腸菌を宿主として CalM および CalP の異種発現を試みたが、可溶性タンパク質としての発現が認められなかった。そこでシャペロンタンパク質との共発現を検討した結果、GroEL-GroES 存在下において BL21(DE3)による CalM および CalP の発現、His-tag 精製に成功した。様々な条件において、末端アミドのカリクリン類縁体を基質として酵素反応を行ったが、目的の酵素反応生成物は得られなかった。

② CalTE の機能解析

CalM および CalP の機能解析の結果、酵素反応の進行が認められなかったことから、カリクリンアミドがカリクリンの生合成前駆体ではない可能性が考えられた。ニトリル形成機構の糸口を得るため、PKS-NRPS からの切り離し機構に焦点を当てることにした。大腸菌 BLR(DE3)にて CalTE を異種発現し、His-tag 精製した。*cal* 遺伝子の配列から予想される生合成中間体の末端構造を現在有機合成により調製中であり、今後、CalTE による生合成酵素からの切り離し機構およびその後起こると推測されるニトリル形成の機構解明を目指す。

(2) C17 位リン酸化機構の解析

① CalM および CalP の機能解析

脱リン酸化体デホスホノカリクリン類を基質として CalM および CalP を用いた酵素反応を検討したが、C17 位がリン酸化された生成物は得られなかった。この結果より、デホスホノカリクリン A は分解産物であり、カリクリンの生合成前駆体ではない可能性が示唆された。

② C17 位ヒドロキシ基の立体化学の検討

① CalM および CalP の機能解析の結果から、カリクリン C17 位のリン酸化は、スピロアセタール環形成前におこる可能性が別の仮説として考えられた。*cal* 遺伝子には 13 のケトリダクターゼ (KR) がコードされており、これらのアミノ酸配列から推測可能なヒドロキシ基の立体化学は C17 位のみカリクリン A の構造と一致しない。そこで、リン酸エステル結合部位である C17 位の還元を担う CalKRm19 の立体選択性について検討した。有機合成により調製した推定生合成中間体を簡略化した SNAC 体を基質として、CalKRm19 による酵素反応を検討したが、新たな酵素反応生成物は得られなかった。過去の報告から、ACP が KR の活性発現に必須である可能性が考えられたため、用いる基質を CoA 体として合成し、Sfp 存在下、基質を ACP にローディングした。現在、調製した基質を用いて CalKRm19 との酵素反応を行っている。

(3) ポリケタイド鎖減炭機構の解析

各種大腸菌を宿主として様々な条件下 CalD の異種発現を検討したが、得られたタンパク質は全て不溶性であった。CalM/CalP と同様にシャペロンタンパク質との共発現を試みた結果、DnaK-DnaJ-GrpE 共存下、目的のタンパク質を可能性画分に得た。しかしながら、その後、His-tag 精製を行った結果、CalD の自己分解が認められた。種々のタンパク質精製条件を検討した結果、EDTA の添加により CalD の自己分解を抑えられることを明らかにした。合成した推定生合成中間体を基質として CalD の酵素反応を行った。反応の進行は HPLC および LC-MS により評

働した。様々な条件において酵素反応を行った結果、特定条件において新たな酵素反応生成物を得た。得られた CalD 反応生成物は極めて不安定であり、現在、その構造を解析中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① T. Wakimoto, Y. Egami, I. Abe, Nature's way of making the sponge-derived cytotoxin, *Nat. Prod. Rep.*, 33, 751-760 (2016) 査読有
DOI: 10.1039/c5np00123d
- ② Y. Nakashima, Y. Egami, M. Kimura, T. Wakimoto, I. Abe, Metagenomic analysis of the sponge Discodermia reveals the production of the cyanobacterial natural product kasumigamide by 'Entotheonella', *PLoS ONE*, 11, e0164468 (2016) 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0164468
- ③ 脇本 敏幸, 江上 蓉子, 阿部 郁朗、海綿-共生微生物系の化学防御機構、化学と生物, 53, 497-499 (2015) 査読無
DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.53.497

[学会発表] (計 1 件)

- ① 江上 蓉子, 脇本 敏幸、海綿由来 calyculin A の細胞毒性発現を担う活性化酵素の探索、第 62 回北海道薬学大会、2015 年 5 月 16 日、札幌コンベンションセンター(北海道、札幌)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江上 蓉子 (EGAMI, Yoko)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：50758612