

令和 4 年 5 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02144

研究課題名(和文) II型ポリケタイド合成酵素のもつ生合成マシナリーの解明

研究課題名(英文) Study on biosynthetic machinery of type II polyketide synthase

研究代表者

勝山 陽平 (Katsuyama, Yohei)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：50646437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：放線菌の持つポリケタイドに着目してその生合成機構の解析を行った。Yorpyrazoneの生合成においては20種程度の遺伝子破壊株を作製し、代謝解析を行った。これにより、yorpyrazoneの生合成中間体がgriseusin誘導体であることを示した。さらにgriseusin誘導体の生合成の一部を試験管内で再構成することに成功した。fogacinの生合成経路の一部をin vitroで解析するとともに、そのうち特に興味深い酵素のX線結晶構造解析に取り組んだ。ポリケタイド合成酵素がどのようにタンパク質間相互作用を制御し、効率的に二次代謝産物を生産しているか解析し、その機構の一部を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放線菌の生産する芳香族ポリケタイドは抗がん剤であるドキソルビシンのように有用な生物活性を持つものが数多く存在する。これらの生合成機構を深く理解することで、これらの化合物の生合成経路の人為的な改変を実現し、より生物活性の良い化合物や安定性の高い化合物の創出につながる。今回、生合成機構が未知であった芳香族ポリケタイドの生合成機構が複数明らかになった。また、これらの化合物の生合成にはタンパク質タンパク質間の相互作用メカニズムを理解することが大事であるが、それに関してもいくつかの重要な知見が得られた。本研究を継続し、これらの理解がさらに進めば新たな医薬品化合物候補の創出につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：We focused on the polyketides produced by actinomycetes and analyzed their biosynthesis. Twenty gene disruption strains were generated based on the yorpyrazone producer strain, and their metabolism was analyzed. The results showed that the biosynthetic intermediate of yorpyrazone is a griseusin derivative. Furthermore, we succeeded in reconstituting part of the biosynthesis of griseusin derivatives in vitro. We also analyzed a part of the biosynthetic pathway of fogacin in vitro. We also worked on the X-ray crystallographic analysis of a particularly interesting enzyme among them. We also analyzed how polyketide synthase regulates protein-protein interactions and efficiently produces secondary metabolites, and elucidated some of the mechanisms.

研究分野：生化学

キーワード：ポリケタイド 生合成 放線菌 二次代謝 酵素

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ポリケタイドは最も生物界に広く分布する化合物の一群である。実に多様な生物活性を持つ化合物が知られており、重要な医薬品資源でもある。これらの化合物はポリケタイド合成酵素 (PKS) により生合成される。PKS の研究は急速に進展しているが、II 型 PKS と呼ばれる酵素群は他の I 型や III 型に比べ研究が難航している。II 型 PKS により生産する化合物の中には抗生物質であるテトラサイクリン、抗ガン活性を持つドキシソルピシンが存在し、有用な化合物群と言える。

2. 研究の目的

II 型 PKS により生合成される化合物である、yoropyrazone や高還元型 II 型 PKS に着目し、(i) ポリケタイド生合成の核となるミニマル PKS (ケト合成酵素: KS, 鎖長決定因子: CLF, アシルキャリアータンパク質: ACP のセット) の機能、(ii) それに伴うポリケタイド鎖修飾酵素群、(iii) そしてポリケタイド骨格形成後の修飾酵素群 (ポスト PKS 修飾酵素群) の機能を理解することである。

3. 研究の方法

高還元型 II 型 PKS である ishigamide の生合成酵素群と脂肪酸合成酵素、他のポリケタイド合成酵素との機能比較を通して II 型 PKS の生産物制御機構やタンパク質タンパク質間相互作用のメカニズムの理解を深める。また、主に yoropyrazone の生合成に着目し、ポリケタイドの持つ特殊な骨格の生合成メカニズムを理解する。

4. 研究成果

(1) Ishigamide の生合成機構の解析

Ishigamide の生合成を担う II 型 PKS はポリエンの生合成を触媒する高還元型 II 型 PKS である。この高還元型が既にある程度研究が進捗している芳香族ポリケタイドの生合成を担う II 型 PKS と比較し、どのような機構で生成物が制御されているか明らかにすることを目指した。S のため、ishigamide 生合成の鍵酵素であるケト合成酵素と鎖長決定因子の複合体、Iga11-Iga12 の X 線結晶構造解析に取り組んだ。その結果、Iga11-Iga12 の構造を再高分解能 1.75 Å で解くことに成功した。この結果、Iga11-Iga12 が確かにヘテロダイマーを形成していることがわかった。また、Iga11-Iga12 の持つ活性中心構造が明らかとなった。ついで、Iga11-Iga12 に hexanoyl-CoA をソーキングし、共結晶の構造解析を行い、hexanoyl 基が活性中心の Cys に結合した Iga11-Iga12 の構造を再高分解能 1.81 Å で解くことに成功した。この構造の活性中心の構造は apo 型の Iga11-Iga12 の構造とほとんど変化しおらず、Iga11-Iga12 の活性中心の構造は動きが小さいことがわかった。また、hexanoyl 基の半分は動きが大きいと予想され、観察することができなかった。次に活性中心の構造から、Iga11-Iga12 の活性に特に重要なアミノ酸残基を予測し、部位特異的変異導入を行い、Iga11-Iga12 の触媒活性に与える影響を調べた。まず、Iga11-Iga12 の Asp113 を Ala に置換したところ、野生型の Iga11-Iga12 が触媒しない、二回の連続したポリケタイド伸長反応が触媒され、トリケタイドピロンの生産が確認された。このことから、Asp113 の持つカルボン酸の負電荷が連続したポリケタイド鎖の伸長を抑制しており、これによりポリエンの生合成が可能になることが明らかとなった。また、Iga12 の Leu125 をより小さい Ala に置換したところ、より鎖長の長いポリエンが生産されるようになり、最終産物の鎖長は鎖長決定因子 (CLF) である Iga12 の作る壁の位置により制御されていることが示された。

ついで、Iga11-Iga12 とアシルキャリアータンパク質である Iga10 の複合体の構造解析を試みた。その結果、反応機構利用型架橋剤を利用して、複合体の構造を再高分解能 1.98 Å で解くことに成功した。これにより、Iga10 と Iga11-Iga12 間の相互作用に重要なアミノ酸残基が明らかとなった。これらの残基に変異を導入し、相互作用の強さを比較したところ、特に Iga11 の Arg210 が Iga10 との相互作用に重要であることがわかった。

一般的な放線菌は II 型脂肪酸合成酵素 (FAS) によって脂肪酸を生合成する。FAS は進化的に PKS と関係しているため、その生合成機構は類似しており、合成に ACP を用いている。多くの場合放線菌は 2 種の II 型 PKS (芳香族化合物合成型と高還元型) を持ち、FAS とこれらはそれぞれ専用の ACP を持っている。そのため、ACP が適切な触媒ドメイン (FAS や PKS 由来) と相互作用することは細胞内で適切な化合物生合成を行うために重要である。そこで、ishigamide 生産菌を題材として、ACP と触媒ドメインの相互作用機構を理解することを目指した。Iga11-Iga12 複合体と 3 つの ACP、Iga10、脂肪酸由来の ACP である AcpP、オキセノン生合成酵素 (芳香族化合物合成型 PKS 由来) の ACP である OkcACP との相互作用の強さを評価することを試みた。そのためピアコアによる解析を試みた。その結果、two step 結合近似モデルを利用してフィッティングを行なった際に良好なフィッティングが見られた、これらの ACP と Iga11-Iga12 複合体の結合定数を見積もることに成功した。その結果、これらの ACP の結合定数は大きく異なることが示唆された。そのため、相互作用の強さそのものよりも ACP の結合様式が重要であることが示

唆された。

次に、Iga11-Iga12 複合体による鎖伸長反応の測度論解析を試みたが、うまくいかなかった。そこで、反応機構型架橋剤による架橋形成を利用し、架橋反応の効率を比較することで Iga11-Iga12 と FAS のケト合成酵素である FabF の ACP 認識を調べた。その結果、いずれの場合もケト合成酵素は最初のアシル基を受け取る際は ACP 特異性が比較的低く、鎖伸長が起こる縮合反応触媒時には ACP 特異性が高いことが示唆された。別の研究で取得した脂肪酸合成酵素 FabF-AcpP の複合体の解析から、縮合反応時の Iga11-Iga12 複合体と Iga10 の相互作用に helix III が重要であると予測した。この仮説をさらに検証するために分子動力学計算と量子力学的手法 (QM)/分子力学法 (MM) 法による計算により脂肪酸合成酵素 FabF の ACP 認識能の予測を試みた。その結果、仮説の通り、理論的にもアシル基転移反応触媒時には ACP 認識が緩く、縮合反応触媒時には ACP 認識が厳しい可能性が示唆された。

(2) Yoropyrazone の生合成機構の解析

Yoropyrazone は養老溪谷より単離された放線菌 *Streptomyces* sp. IFM11307 の生産する化合物である。この化合物はヒドラゾンを含む環構造やスピロ環という興味深い構造を持つ。これらの構造の形成機構はわかっていないため、yoropyrazone の生合成経路の解析を試みた。まず、CRISPR/cas9 を用いて yoropyrazone の生合成遺伝子の破壊を行い、約 20 遺伝子の破壊に成功した。その結果、11 の遺伝子において yoropyrazone の生産が消失した。さらその中の 8 つ破壊株で副産物または中間体と思われる化合物の蓄積がみられた。これらの化合物のうちいくつかを単離し、NMR により構造解析を行なった。その結果、そのうちの 1 つは deacetylyoropyrazone であり、yoropyrazone のアセチル基を導入する酵素が明らかとなった。また、この化合物からさらに水酸基が欠落するもの、水酸基のうち一つがケトンに変換された化合物が単離され、これにより、yoropyrazone 生合成後期の反応が明らかとなった。

また、別の 4 つの破壊株において yoropyrazone 骨格を持たない化合物を複数蓄積していた。これらの株は同じ化合物を蓄積しているようであった。これらのうちいくつかを単離し、NMR により構造決定したところ、いずれも griseusin 誘導体であることが明らかとなった。このことから、yoropyrazone はなんらかの griseusin 誘導体から生合成されると予想した。しかし、直接の生合成中間体と予想される化合物は不安定なため、単離することができなかった。しかし、得られた分解産物の構造から中間体となる griseusin 誘導体の構造の予測に成功した。

次に、Yoropyrazone の中間体である griseusin 誘導体の *in vitro* 生産系の構築を試みた。Yoropyrazone の生合成を担うケト合成酵素と鎖長決定因子複合体を含む 8 個の生合成酵素の組換えタンパク質の生産に成功した。これらの *in vitro* 解析を行なった結果、griseusin の生合成反応の一部を *in vitro* で再現することに成功した。この過程により、新たなポリケタイド環化酵素の存在が明らかとなった。今後さらに生合成機構を解析することで、スピロ環の形成機構を明らかにすることができると考えられる。

(3) fogacin 類の生合成機構の解析

Fogacin C は *Actinoplanes missouriensis* から単離された芳香属ポリケタイドである。これは芳香属ポリケタイドでは珍しく、ポリケタイド鎖の beta アルキル化を介して生合成される。このメカニズムは II 型 PKS においては未解明であったため、この経路の *in vitro* 解析を試みた。9 種の fogacin 生合成酵素群を利用して、fogacin C のポリケタイド鎖の伸長反応までの経路を *in vitro* で再構成することに成功した。また、この系を用いてこれらの酵素の基質特異性を詳細に検討することに成功した。

また、この beta アルキル化のプロセスにおいても複雑な ACP を介した反応制御があると予想される。そこで、この経路における、ACP の使い分けを理解すべく、X 線結晶構造解析を試みた。触媒ドメインと反応機構利用型架橋剤を利用し、複数の ACP-酵素ペアの複合体の調製に成功した。これらの結晶化やクライオ電子顕微鏡構造解析を試みたが、まだ構造の解析には成功していない。今後、構造解析を継続することでこれらの ACP 触媒ドメイン相互作用メカニズムの解明を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Danyao Du, Yohei Katsuyama, Masanobu Horiuchi, Shinya Fushinobu, Aochiu Chen, Tony D. Davis, Michael D. Burkart, Yasuo Ohnishi	4. 巻 未定
2. 論文標題 Structural basis for selectivity in a highly reducing type II polyketide synthase.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41589-020-0530-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sato Kei, Katsuyama Yohei, Yokota Kousuke, Awakawa Takayoshi, Tezuka Takeaki, Ohnishi Yasuo	4. 巻 20
2. 論文標題 Involvement of Alkylation Machinery and Two Sets of Ketosynthase Chain Length Factors in the Biosynthesis of Fogacin Polyketides in <i>Actinoplanes missouriensis</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 1039 ~ 1050
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.201800640	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 堀内 真展、杜 丹ヤオ、勝山 陽平、Burkart, Michael D.、大西 康夫
2. 発表標題 2つのII型PKSとFAS間におけるACPのクロストークに関するin vitro解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度 福岡大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 勝山 陽平
2. 発表標題 放線菌の持つ二次代謝経路の探索と機能解析
3. 学会等名 第18回微生物研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杜 丹ヤオ、勝山 陽平、伏信 進矢、Chen Aochiu、Davis Tony D、Burkart Michael、大西 康夫
2. 発表標題 高還元型II型PKS由来KS-CLFヘテロダイマー及びACP-KS-CLF三者複合体のX線結晶構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度 東京大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田 夏澄、勝山 陽平、當銘 一文、石橋 正己、大西 康夫
2. 発表標題 Streptomyces sp. IFM11307 由来芳香族ポリケタイド yoropyrazone 生合成に関する研究
3. 学会等名 第33回(2018年度)日本放線菌学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Danyao Du, Yohei Katsuyama, Kazuo Shin-ya, Yasuo Ohnishi
2. 発表標題 Reconstitution of a Type II Polyketide Synthase Catalyzing Polyene Formation
3. 学会等名 3rd European Conference on Natural Products (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 勝山 陽平
2. 発表標題 放線菌の持つ多様な二次代謝産物の生合成機構
3. 学会等名 第五回天然物化学研究会 東京農業大学世田谷キャンパス(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 勝山 陽平
2. 発表標題 放線菌のもつ多様な二次代謝産物生成機構の解析
3. 学会等名 第3回関東支部例会 東京大学農学部弥生講堂一条ホール日本農芸化学会奨励賞受賞講演（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清藤 鈴奈、勝山 陽平、大西 康夫
2. 発表標題 芳香族ポリケタイドyoropyrazone のスピロ環形成機構のin vitro 解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度 京都大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

醱酵学研究室 http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/hakko/index.php

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------