

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22108002

研究課題名（和文）抗ガン剤生合成マシナリーの再構築および多様性創出機構の解明

研究課題名（英文）Reconstitution of anticancer agent-biosynthetic machinery and elucidation of its mechanism on molecular diversification

研究代表者

及川 英秋 (Oikawa, Hideaki)

北海道大学・理学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：00185175

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 71,800,000円

研究成果の概要（和文）：東北大五味教授との共同研究として5種のベクターが使用可能な栄養要求性麹菌変異株を用いた異種遺伝子発現系を活用した糸状菌由来の生物活性物質の全合成を検討した。その過程で、遺伝子導入を短縮し、かつ限られたベクター数の効率の良い使用が問題となったが、一挙に4個の遺伝子を導入する（Tandem法）を考案し、化合物種に関係なく遺伝子数4-17個を使って、構造の複雑な天然物が自在に合成できるシステムを開発した。このほか抗腫瘍性物質や抗生物質を含む放線菌由来の骨格構築酵素の機能解析や構造多様化に向けたハイブリッド酵素系の開発を検討した。その結果、生合成酵素の複合体の精妙な制御系を見出した。

研究成果の概要（英文）：“Total biosynthesis” is a novel approach to provide natural products. To achieve total biosynthesis of fungal metabolites, *Aspergillus oryzae* expression system is one of a promising tool due to highly reliable expression of biosynthetic enzyme genes. Complete stepwise reconstitution of biosynthetic machinery is a key issue of total biosynthesis. This provides not only information of complete reaction sequence but target natural product together with all reaction intermediates which allow us to study enzymatic mechanism of a specific step. We have achieved genome mining, total biosynthesis of structurally unique metabolites and elucidation of complex reaction mechanism of modification enzymes.

研究分野：生物有機化学、ケミカルバイオロジー

キーワード：生合成 麹菌 ペプチド合成酵素 全合成 抗腫瘍性物質

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、これまで異種生物由来の遺伝子を大腸菌で発現する一般的な手法(発現カセット法)を用い、複数遺伝子の導入が可能で各遺伝子が安定に発現するベクターを構築した。本手法を用いて抗腫瘍性物質エキノマイシンの生合成に必要な全長約 35kb の 16 個の遺伝子からなるクラスターを、3 個のベクターに分けて大腸菌に導入して生合成マシナリーを再構築し、エキノマイシンを生産することに成功した(H. Oikawa *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, **2006**, 2, 423)。生合成に必要な全遺伝子が大腸菌で発現させたのは我々が最初であり、遺伝子操作法および培養法が確立している汎用宿主を用いるメリットは大きい。今回我々が創案した手法は一般性があり、今後様々な天然物の異種生産が可能になることが期待される。またこのマシナリーを用いて多様性創出にも成功している(H. Oikawa *et al.*, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**; *ChemBioChem*, **2009**; *JACS*, **2009**; *Chem. Biol.*, **2008**)。残念ながら上述の手法による薬剤生産はまだ一例のみであり、多様な汎用宿主を用いた系で有用性を確立するためには他の物質の生産に適用可能であることを示す必要がある。

2. 研究の目的

最近容易に入手可能になった二次代謝産物生合成遺伝子情報を駆使して、我々が開発した大腸菌クラスター発現系あるいは本プロジェクトで開発する発現系を用い、物質生産を行うシステム(生合成マシナリー)を構築し、臨床用抗ガン剤エクチナサイジン(ET)の酵素合成法に適用し、効率に問題がある現在の供給法を改善すべく効率的合成法の検討を行う。さらに類似の骨格を有する抗腫瘍性物質の生合成マシナリーを構築し、多様性創出機構を解析する。得られた知見の一般性を検討すべく、機能解析の済んだ糸状菌代謝産物の単純な生合成マシナリーを構築し、多様性創出に関する詳細な実験を行い、このアプローチの可能性と限界を検証する。本領域研究での共同研究を通し、化合物種によらない二次代謝産物の生合成酵素による新たな物質生産法を提案する。

3. 研究の方法

最近我々はサフラマイシンの生合成酵素 SfmC が 7 段階の反応を触媒し、一挙に 5 環性の分子骨格を合成することを見出した(*Nat. Chem. Biol.*, **2010**)。この結果よりサフラマイシンと構造が近縁の抗腫瘍性物質数種の生合成遺伝子クラスターを A03 班と共同で同定し、大量発現させた SfmC に相当する各骨格合成酵素の機能を様々な合成基

質アナログを使って、*in vitro* にて構造多様性創出の仕組みを解明する。この知見を基に、工程数が長く供給量に問題のある臨床用抗ガン剤エクチナサイジンの生産に使われている重要中間体の合成法を確立する。次いでペプチド部分の生合成酵素、原料となる異常アミノ酸合成用酵素と修飾酵素の各遺伝子から生合成マシナリーを構築し物質生産を検討する。

このほか、A02 班が開発した実用化間近い糸状菌効率的遺伝子導入法を用いて、遺伝子既知で各酵素反応が解析済みの糸状菌由来生物活性物質数種の *in vivo* 生産系を確立して、上述と同様の手法で構造多様性創出の仕組みを検討する。さらに生合成マシナリーの有用性を確認すべく、A03 班の遺伝子クラスターの機能推定に基づき、微生物ゲノム上に眠る機能未知生合成遺伝子群の発現による新規物質生産を行う。こうした共同研究を通して、生合成マシナリーを用いた天然物合成の一般法を開発する。

4. 研究成果

既に機能解析に成功した抗腫瘍性物質 saframycin と構造的に近縁な cyanocycline (CYA) quinocarcin (QCN) 生合成遺伝子の機能解析を行ない、以下の結果を得た。1) 酸化酵素 Cya16, Qcn18 を大量発現およびそれを用いた *in vitro* の解析から、これまで未同定であった 4 番目の構成単位となる非タンパク性アミノ酸を L-dehydroarginine と決定した; 2) 骨格を構築するペプチド合成酵素が、補助タンパク Qcn16 の存在下でのみ、良好に発現可溶化することを突き止めた; 3) Qcn16 は、2 種の非リボソーム依存ペプチド合成酵素 (NRPS), Qcn17/Qcn19 と複合体を形成し機能する; 4) 2 種の NRPS のアミノ酸の活性化能を調べ、三者複合体は、dehydroarginine に比べ、芳香族アミノ酸 3-hydroxytyrosine や修飾チロシン誘導体を優先的に (5~10 倍) 活性化することから、基質のサイズに対応して、鎖状アルデヒドと二環性アルデヒドの二種の基質を使い分けるなど複雑な機構で多環性骨格を構築することを突き止めた。以上の結果から、5 種の NRPS のモジュールのうち、4 種の基質を特定し、dehydroarginine、芳香族アミノ酸と鎖状の合成基質を用いて標的化合物の骨格を *in vitro* で合成可能になった。次いで cyanocycline NRPS の機能解析を行い、QCN の場合と同様、補助タンパク Cya16 は、2 種の NRPS, Cya17/Cya19 と複合体を形成して活性を示すことがわかった。機能解析が終了したことから、宿主で生合成マシナリーの再構築を試みているが、最終産物の毒性のためか、現在までのところ成功していない。

A02 班の東北大五味教授との共同研究として 5 種のベクターが使用可能な栄養要求性麹菌変異株を用いた異種遺伝子発現系を活用

し、DNA ポリメラーゼ 特異的阻害剤 aphidicolin の効率的生産 (130mg/L 相当) を達成した。max-K イオンチャネルの特異的阻害剤 paxilline の酵素合成を達成するとともに、インドール骨格へのゲラニルゲラニル基の導入、エポキシ化-環化を繰り返して行なう変換等、新規変換反応を見出しながら、6 個の生合成酵素の機能をすべて解明することに成功した。インドールジテルペン aflatrem の全生合成には、7 個の遺伝子が必要と予想されたが、遺伝子導入を短縮し、かつ限られたベクター数を効率良く使用するため、一つに 2 個ずつ遺伝子を組み込んだ同種のベクター 2 個を用いて、一度の形質転換で合計 4 個の遺伝子を導入する手法を開発した。最初の 4 個の導入で paspaline の生産した後、さらに修飾酵素 3 個を導入することで、一挙に aflatrem の全生合成に成功した。

本手法を適用し、さらに複雑な天然物である penitrem (生合成酵素遺伝子数 17 個) を全生合成することにした。まず上記 paspaline 生産株に、修飾酵素遺伝子 2 個を導入して、paxilline の生産を確認した。次に野生株に遺伝子 4 種の導入を種々試したところ、paxilline の投与により、還元; プレニル化; 脱水が進行した化合物が単離された。残る 7 種の酸化酵素とプレニル化酵素遺伝子を種々の組み合わせで試して、最終的に生合成経路を確定すると同時に penitrem A の生合成を達成した。これまでに報告された糸状菌天然物に關する最大の生合成酵素遺伝子数は、aflatoxin の 17 個であり、それと同数が必要な penitrem を全生合成に成功したことより、理論上あらゆる糸状菌由来の代謝産物が、麹菌異種発現法で合成できることになった。

成功例の少ない糸状菌由来ポリケタイド合成酵素 (PKS) -NRPS のハイブリッド酵素遺伝子の発現に挑戦し、アクチン重合阻害剤サイトチャラシンの骨格合成に成功した。さらにポリケタイド系植物毒素である betaenone のゲノム解析データから推定した遺伝子クラスターに存在する PKS、エノイル還元酵素、P450 水酸化酵素の各遺伝子を導入したところ、鎖状中間体が環化し、さらに一挙に 3 段階の酸化が進行した betaenone B の全合成に成功した。これにより 10 個程度と予想される糸状菌由来天然物の生合成遺伝子を用いた、汎用的な物質生産法の開発がより現実的になった。これとは別にゲノム公開株から、機能未知テルペン環化酵素を選択し、世界で初めて C25 の基質を利用する多機能性テルペン合成酵素が、オフィオポリン F を与えることを見出した。以上のように、麹菌異種発現法は、生合成経路の解明および物質生産、さらには新規物質の探索としてのゲノムマイニングに有用であることを実証した。

このほか天然物にはポリエーテルと呼ばれる化合物群があるが、その代表的化合物ラサロシドの骨格合成を担う鍵酵素であるエ

ポキシド加水分解酵素 Lsd19 (二種の独立した触媒ドメイン) とその不安定な基質との複合体の X 線結晶構造解析に成功した。これにより 2 組の酸性アミノ酸残基が関与する詳細な触媒機構が明らかにされた。このほか関連するポリエーテル系抗生物質モネンシンの生合成において、その特徴的な環状ポリエーテル環の骨格構築には MonBI、BII の二種の酵素が必須である。本酵素は 4 回の環化を触媒するが、一段階目、二段階目のエーテル環構築が両酵素の存在下でのみ進行する理由を、native MS や表面プラズモン共鳴、さらには X 線結晶構造解析を使って調べたところ、両酵素が弱いながらヘテロ二量体を形成することを証明した。これにより未解明だった多環性ポリエーテルの構築機構に有力な説を提唱できた。

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 8 件)

C. W. Liu, K. Tagami, A. Minami, T. Matsumoto, J. C. Frisvad, H. Suzuki, J. Ishikawa, K. Gomi, and H. Oikawa, Reconstitution of biosynthetic machinery for highly elaborated indole diterpene penitrem. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 5748-5752 (2015). 査読有

Heterologous Expression of Highly Reducing Polyketide Synthase Involved in Betaenone Biosynthesis. T. Ugai, A. Minami, R. Fujii, M. Tanaka, H. Oguri, K. Gomi, and H. Oikawa, *Chem Commun*, **51**, 1878-1881 (2015). 査読有 Minami, A., Ose, T., Sato, K., Oikawa, A., Kuroki, K., Maenaka, K., Oguri, H. and Oikawa, H., Allosteric Regulation of Epoxide Opening Cascades by a Pair of Epoxide Hydrolases in Monensin Biosynthesis. *ACS Chem Biol*, **9**, 562-569 (2014). 査読有

Hiratsuka, T., Suzuki, H., Kariya, R., Seo, T., Minami, A. and Oikawa, H., Biosynthesis of the Structurally Unique Polycyclopropanated Polyketide-Nucleoside Hybrid Jawsamycin (FR-900848). *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53**, 5423-5426 (2014). 査読有

Hiratsuka, T., Koketsu, K., Minami, A., Kaneko, S., Yamazaki, C., Watanabe, K., Oguri, H. and Oikawa, H., Core Assembly Mechanism of Quinocarcin/SF-1739: Bimodular Complex Nonribosomal Peptide Synthetases for Sequential

Mannich-type Reactions. *Chem. Biol.*, **20**, 1523-1535 (2013). 査読有
Tagami, K., Liu, C. W., Minami, A., Noike, M., Isaka, T., Fueki, S., Shichijo, Y., Toshima, H., Gomi, K., Dairi, T. and Oikawa, H., Reconstitution of Biosynthetic Machinery for Indole-Diterpene Paxilline in *Aspergillus oryzae*. *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 1260-1263 (2013). 査読有
Minami, A., Shimaya, M., Suzuki, G., Migita, A., Shinde, S.S., Sato, K., Watanabe, K., Tamura, T., Oguri, H., and Oikawa, H., Sequential enzymatic epoxidation involved in polyether lasalocid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 7246-7249 (2012). 査読有
Hotta, K., Chen, X., Paton, R.S., Minami, A., Li, H., Swaminathan, K., Mathews, I.I., Watanabe, K., Oikawa, H., Houk, K.N., and Kim, C.Y., Enzymatic catalysis of anti-Baldwin ring closure in polyether biosynthesis. *Nature*, **483**, 355-359 (2012) 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

H. Oikawa, Total Biosynthesis of Fungal Bioactive Natural Products, *Directing Biosynthesis IV*, Mar. 25-27, 2015, John Innes Centre, Norwich, UK
H. Oikawa, Total Biosynthesis of Fungal Indole Diterpenes, *International Symposium on Natural Products Chemistry and Chemical Biology 2014 & Asian Chemical Biology Initiative 2014 Hangzhou Meeting*, Nov. 22-25, 2014, Hangzhou, China
H. Oikawa, Total Biosynthesis of Bioactive Fungal Metabolites, *24th French-Japanese Symposium on Medicinal and Fine Chemistry*, Sep. 14-17, 2014, Lyon, France
及川英秋, ゲノム情報に基づいた新規生合成経路の発見, 化学会年会 2014 特別企画シンポジウム「バイオインフォマティクスを駆使した生物活性天然物の供給への挑戦」, 2014.3.30, 名古屋大学 東山キャンパス, 名古屋
H. Oikawa, Genomic Data-Based Synthesis of Fungal Natural Products, *International Symposium on Natural Products Chemistry and Chemical Biology 2013*, 2013.11.24-26, ホテルルプラ王山名古屋, Nagoya, Japan.
及川英秋, Recent Progress on Biosynthesis of Fungal and Bacterial Metabolites, *9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference (APMBC2012)*,

July 13-16 2012, 高知市文化プラザ かるぼーと, Kochi, Japan.

及川英秋, 生合成マシナリーを用いた天然物合成, 第22回万有仙台シンポジウム, Dec. 19, 2011, 仙台国際センター, 仙台

H. Oikawa, Elucidation of the Catalytic Mechanism on Non-ribosomal Peptide Synthetase Involving Biosynthesis of Saframycin-Type Antitumor Agents, *6th Korea-Japan Young Scientists Meeting on Bioorganic and Natural Products Chemistry*, June. 23-24, 2011, Seoul University, Seoul, Korea

H. Oikawa, Detailed Mechanism on the Enzymatic Polyether Formation, *Pacificchem 2010 Symposium on Biosynthesis of Natural Products*, 2010. 12.15-20, Honolulu, Hawaii, USA.

〔図書〕(計 1 件)

Minami, A. and Oikawa, H., The Diels-Alderase never ending story. *Biomimetic Organic Synthesis*, Vol. 2, pp.751-786, Wiley-VCH, New York (2011).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
<http://wwwchem.sci.hokudai.ac.jp/~yuhan/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

及川英秋 (OIKAWA, Hideaki)
北海道大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号：00185175

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

南 篤志 (MINAMI, Atsushi)

北海道大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号：40507191

大栗 博毅 (OGURI, Hiroki)

北海道大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：80311546