

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

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：22108004

研究課題名（和文）メロテルペノイド生合成アセンブリーラインの解明と制御

研究課題名（英文）Studies on biosynthetic assembly line of meroterpenoids

## 研究代表者

阿部 郁朗（ABE, IKURO）

東京大学・薬学研究科（研究院）・教授

研究者番号：40305496

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 42,800,000円

研究成果の概要（和文）：医薬資源として重要なメロテルペノイドは、テルペノイドとポリケタイドの構造を併せ持つ、ハイブリッド型化合物である。我々はピリピロペンA、テレットニン、アンジトミン、アンドラスチンなど、数種の糸状菌由来生物活性メロテルペノイドの生合成遺伝子クラスターを同定し、麹菌を宿主として、遺伝子異種発現・物質生産系を構築した。また、これら生合成アセンブリーラインに、メロテルペノイドの構造多様性を生み出す、新規膜結合性環化酵素や多機能型酸化酵素など、興味深い化学反応を触媒する一連のユニークな酵素群を見出し、その反応機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Meroterpenoids are hybrid natural products of both terpenoid and polyketide origin. We identified several biosynthetic gene clusters of pharmaceutically important fungal meroterpenoids, which includes that is responsible for the production of pyripyropene A, terretonin, anditomin, and andrastin, through reconstituted biosynthesis in a heterologous fungal expression system. Interestingly, the biosynthetic assembly lines are rich sources for interesting enzymes and chemistry, such as previously unknown membrane-bound terpene cyclases and multifunctional oxygenases, for the generation of structurally divergent complex fungal meroterpenoids.

研究分野：天然物化学、生物有機化学

キーワード：メロテルペノイド 生合成 遺伝子クラスター 多様性創出 機能制御 二次代謝酵素

## 1. 研究開始当初の背景

今後の医薬資源の開発について考えた場合、多様性に富む化合物群をいかに効率良く生産し、創薬シードとして提供できるか、が鍵になる。医薬資源として重要な天然物の基本骨格を構築する二次代謝酵素の中には、活性部位の微妙な構造の違いで基質特異性や反応様式が大きく変化するものがあり、これが天然物の分子多様性を生み出す大きな要因の一つとなっている。一方、二次代謝酵素が示す寛容な基質特異性と潜在的触媒能力を活用することにより、有用物質生産系の構築が可能になる。また、酵素タンパクの立体構造情報に基づく合理的な触媒機能の改変により、さらなる分子多様性と新規骨格の創出が期待される。

本研究では、人為的な酵素機能の制御と分子多様性創出の格好のモデルともいえる、糸状菌由来メロテルペノイド生合成酵素群をとりあげる。テルペノイドとポリケタイドの部分構造を併せ持つメロテルペノイドは、それぞれの多様性を相乗した分子構造多様性を有する可能性を秘めている。本研究では、有機化学を基盤として、分子生物学や構造生物学、タンパク工学の技術などを駆使することにより、新たな酵素触媒機能の開拓と新規有用物質生産系の構築をめざす。各生合成酵素の精密機能解析を基盤として、酵素機能の改変や、非天然型基質と反応させることなどにより、メロテルペノイド構造多様性の拡大を図り、創薬シードとなりうる新規ハイブリッド型有用天然物の創製を試みる。

我々は、これまで一貫して天然物の生合成と生理活性に関する研究を中心課題として取り上げ、天然物の生合成工学に関する研究を精力的に進めている。多様な構造と生理活性を示す二次代謝産物の基本骨格構築を担う生合成鍵酵素の研究が、天然物を基盤とする将来の創薬化学に貢献をすることを予見し、酵素機能の改変による非天然型新規化合物の創出を実現し、セレンディピティに頼らない合理的な方法論を展開している。糸状菌由来のメロテルペノイドには、顕著なコレステロール低下作用を有するピリピロペン類や、タンパクのファルネシル化阻害作用を有し抗癌剤として期待されるアンドラスチン類など、顕著な生理活性を示し、創薬シードとして期待される化合物が数多くあるが、その生合成に関しては今後の研究が待たれているのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究では、まず、既にそのクローニングと機能解析が進行中の *Aspergillus fumigatus* 由来ピリピロペンをはじめとして、一連の糸状菌由来メロテルペノイドの生合成遺伝子クラスターを対象とする。酵素遺伝子のクローニングを行い、得られた生合成酵素群の精密機能解析によりメロテルペノイド生合成の構築原理を解明する。また、その生合成マ

シナリーを再構築し、合理的な酵素機能の改変や、非天然型基質をプローブとした潜在的触媒能力の開拓により、非天然型新規メロテルペノイドのコンビナトリアル生合成を実現する。さらに、物質生産、生合成工学への展開をはかる。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子異種発現系の構築と機能解析

まず、糸状菌 *A. fumigatus* 由来ピリピロペンの生合成遺伝子クラスターを構成する各遺伝子の異種発現系を構築する。メロテルペノイド生合成において分子骨格構築の鍵となるのはポリケタイド部分の生合成を担うポリケタイド合成酵素 (PKS)、テルペノイド部分を縮合するプレニル基転移酵素 (PT)、末端二重結合に対するエポキシ化を触媒するフラビン要求性の酸化酵素 (FMO)、そして閉環反応を担う環化酵素 (CYC) である。これら4種の酵素が構造多様性を産み出す基盤となる。具体的には、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* あるいは麹菌 *A. oryzae* を宿主として、PKS、PT、FMO、CYC の4遺伝子を同時に導入した異種発現系、即ち、メロテルペノイド生合成アセンブリーラインを再構築する。また、同時に、酵母や大腸菌を用いてこれら4酵素を単独で異種発現させた組み替え酵素を用いて酵素の精密機能解析に着手する。*in vitro* で各々基質類縁体を反応させ基質および生成物特異性を検討する。非天然型基質として、種々の芳香族や脂肪族の CoA 体を開始基質とし、テルペノイド部分に関してはプレニル鎖長の異なるもの等を用いる。同時に、*in vivo* においてもこれら人工基質を投与し、非天然型新規メロテルペノイドの生産を検討する。

### (2) 酵素の精密機能解析と反応機構の解明

生合成クラスターを構成する各酵素について、他のホモログ酵素との配列比較、または、ホモロジーモデルなどに基づく、部位特異的変異の導入などにより酵素の構造機能相関を検討し、酵素反応機構の解明と分子多様性創出をめざす。また、上述した4酵素のうち、PKS と CYC はメロテルペノイドの基本炭素骨格構築の鍵となる。とりわけ、PKS はニコチン酸 CoA 体を開始基質とするこれまでに例のないものであり、また、分子進化の過程で、アミノ酸残基の置換などにより、複数のドメインが機能を喪失したことが予想される。そこでこれら残基に変異を導入し、機能を回復させてやれば、さらに複雑で新たな骨格をもったメロテルペノイドの生産も期待される。一方、テルペノイド部分の環化を担う CYC は既知のテルペン環化酵素とは相同性を示さない7回膜貫通型の全く新規な酵素である。部位特異的変異などにより活性中心触媒残基の同定など、酵素の構造機能相関を検討する。

(3) 基質特異性と潜在的触媒能力を利用したコンビナトリアル生合成

二次代謝酵素が示す最大の特徴の一つに、その寛容な基質特異性と潜在的触媒能力が挙げられる。従って、こうした寛容な基質特異性の甘さを利用して、一連の人工基質を酵素に作用させることにより、非天然型新規化合物ライブラリーの構築が可能になる。天然型基質の場合と同様な酵素反応の進行が予想される一方で、基質の構造に対応して、活性部位におけるフォールディング・コンフォメーションが微妙に影響を受け、在来見られない骨格を生成する可能性も期待される。

#### (4) 有用物質生産系の構築

物質生産への展開を考えた場合、今後クリアすべき問題の一つに生産効率の向上が挙げられる。本研究では酵母や麹菌などを生産工場としたコンビナトリアルな物質生産系を構築する。一方、こうした発現系は、物質生産のみにとどまらず、将来的には、進化分子工学の手法を用いた網羅的な変異酵素の作成など、コンビバイオによる迅速な酵素触媒機能の改変にも道を拓く。

#### 4. 研究成果

以下に主な研究成果について簡潔に記述する。詳細については、印刷公表した以下の論文を参照されたい。

(1) まず、遺伝子異種発現系の構築と機能解析に着手した。糸状菌 *A. fumigatus* 由来ピリピロペンの生合成遺伝子クラスターを構成する各遺伝子の異種発現系を構築した。具体的には、麹菌 *A. oryzae* NSAR1 株を宿主として、PKS、PT、FMO、CYC の4遺伝子などを同時に導入した異種発現系、即ち、メロテルペノイド生合成アセンブリーラインを再構築した。また、同時に、酵母や大腸菌を用いてこれら4酵素を単独で異種発現させた組み替え酵素を用いて酵素の精密機能解析を行った。

(2) 次に *Aspergillus terreus* 由来テレットニン生合成経路の解明に着手した。数多くのテレットニン類縁体が天然から単離されており、その中には医薬品資源として期待されるものも含まれる。*A. terreus* のゲノム情報をもとにテレットニン合成遺伝子クラスターを同定し、ポリケタイド合成酵素(Trt4)、プレニル基転移酵素(Trt2)によって、farnesyl-DMOA が合成されることを示した。また、Trt4、Trt2 に加えて、フラビン依存型酸化酵素(Trt8)、環化酵素(Trt1)を *A. oryzae* を宿主とした異種発現に成功した。その結果、Trt8 により farnesyl-DMOA が酸化され、epoxyfarnesyl-DMOA が生成した。一方、環化前にカルボキシル基がメチル化される可能性を考え、メチル化酵素(Trt5)を、Trt1,2,4,8 発現系に加えて発現した。その結果、プレレットニンの生成を確認し、Trt5 による

カルボキシル基のメチルエステル化が、環化反応に必須であることを明らかにした。テレットニンの後期生合成段階の解明にも成功し、*A. oryzae* における異種発現系を構築し、その生物的全合成を達成した。

(3) 3,5-ジメチルオルセリン酸を共通の生合成中間体とするメロテルペノイドには、テレットニン以外にもオースチノール、アンドラスチンなど、多様な骨格が知られており、テルペノイド部位の環化様式や環化後の種々の修飾反応の多様性により、これら化合物群の構造多様性が生み出される。オースチノールとアンドラスチンについても、麹菌を宿主として、遺伝子異種発現・物質生産系を構築し、メロテルペノイドの構造多様性を生み出す、閉環様式を異にする環化酵素や、閉環後の修飾反応に関わる酵素群の探索ならびに機能解析を行った。なかでもオースチノール生合成においては、スピロ環形成と多段階の酸化反応を触媒する特異な新規多機能型ジオキシゲナーゼを見出し、その精密機能解析に成功した。さらに、アンドラスチン生合成に関しては、*A. oryzae* における異種発現系を構築し、その生物的全合成を達成した。

(4) *Aspergillus varicolor* が産生するアンジトミンの生合成マシナリーの全容を解明した。単離・構造決定より三十余年を経て初めて、その生合成分子基盤を明らかにするとともに、自然界の巧みな合成戦略の一端を見出すことに成功した。当初生合成への関与が予想された Diels-Alder 反応は、実際にはアンジトミン生合成に関与しないことが判明したが、一方でジオキシゲナーゼ AndA が特異な分子内架橋構造の形成を担うことを解明した。さらに、生合成の最終段階においても、異なるジオキシゲナーゼ AndF が酸化的転位反応を触媒しアンジトミンを与えることを見出した。これら特異な反応を触媒する一連のジオキシゲナーゼの機能をより詳細に明らかにすべく、X線結晶構造解析にも着手した。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計68件) 全て査読あり

1. Matsuda, Y., Iwabuchi, T., Wakimoto, T., Awakawa, T., Abe, I.: Uncovering the unusual D-ring construction in terretonin 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
2. Mori, T., Yang, D., Matsui, T, Hashimoto, M., Morita, H., Fujii, I., Abe, I.: Structural basis for the formation of acylalkylpyrones from two  $\beta$ -ketoacyl units by the fungal type III polyketide synthase CsyB. *J. Biol. Chem.*, 290, 5214-5225 (2015).

- DOI: 10.1074/jbc.M114.626416
- Matsuda, Y., Wakimoto, T., Mori, T., Awakawa, T., Abe, I.: Complete biosynthetic pathway of anditomin: nature's sophisticated synthetic route to a complex fungal meroterpenoid. *J. Am. Chem. Soc.*, *136*, 15326-15336 (2014). DOI: 10.1021/ja508127q
  - Wakimoto, T., Egami, Y., Nakashima, Y., Wakimoto, Y., Mori, T., Awakawa, T., Ito, T., Kenmoku, H., Asakawa, Y., Piel, J., Abe, I.: Calyculin biogenesis from a pyrophosphate protoxin produced by a sponge symbiont. *Nature Chemical Biology*, *10*, 648-655 (2014). DOI: 10.1038/nchembio.1573
  - Awakawa, T., Zhang, L., Wakimoto, T., Hoshino, S., Mori, T., Ito, T., Ishikawa, J., Tanner, M. E., Abe, I.: A methyltransferase initiates terpene cyclization in teleocidin B biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, *136*, 9910-9913 (2014). DOI: 10.1021/ja505224r
  - Wilson, M. C., Mori, T., Rückert, C., Uria, A. R., Helf, M. J., Takada, K., Gernert, C., Steffens, U. A. E., Heycke, N., Schmitt, S., Rinke, C., Helfrich, E. J. N., Brachmann, A. O., Gurgui, C., Wakimoto, T., Kracht, M., Crüsemann, M., Hentschel, U., Abe, I., Matsunaga, S., Kalinowski, J., Takeyama, H., Piel, J.: An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. *Nature*, *506*, 58-62 (2014). DOI: 10.1038/nature12959
  - Matsuda, Y., Awakawa, T., Wakimoto, T., Abe, I.: Spiro-ring formation is catalyzed by a multifunctional dioxygenase in austinol biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, *135*, 10962-10965 (2013). DOI: 10.1021/ja405518u
  - Yan Y., Chen, J., Zhang, L., Zheng, Q., Han, Y., Zhang, H., Awakawa, T., Abe, I., Liu, W.: Multiplexing of combinatorial chemistry in antimycin biosynthesis expands the molecular diversity and utility. *Angew. Chem. Int. Ed.*, *52*, 12308-12312 (2013). DOI: 10.1002/anie.201305569
  - Mori, T., Shimokawa, Y., Matsui, T., Kinjo, K., Kato, R., Noguchi, H., Sugio, S., Morita, H., Abe, I.: Cloning and structure-function analyses of quinolone- and acridone-producing novel type III polyketide synthases from *Citrus microcarpa*. *J. Biol. Chem.*, *288*, 28845-28858 (2013). DOI: 10.1074/jbc.M113.493155
  - Abe, I.: Novel applications of plant polyketide synthases. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, *16*, 179-185 (2012). DOI: 10.1016/j.cbpa.2011.12.016
  - Abe, I.: Biosynthesis: an HR-PKS stereo surprise. *Nature Chemical Biology*, *8*, 322-323 (2012). DOI: 10.1038/nchembio.924
  - Morita, H., Yamashita, M., Shi, S.-P., Wakimoto, T., Kondo, S., Kato, R., Sugio, S., Kohno, T., Abe, I.: Synthesis of unnatural alkaloid scaffolds by exploiting plant polyketide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *108*, 13504-13509 (2011). DOI: 10.1073/pnas.1107782108
  - Wakimoto, T., Mori, T., Morita, H., Abe, I.: Cytotoxic tetramic acid derivative produced by a plant type III polyketide synthase. *J. Am. Chem. Soc.*, *133*, 4746-4749 (2011). DOI: 10.1021/ja2006737
  - Wakimoto, T., Kondo, H., Nii, H., Kimura, K., Egami, Y., Oka, Y., Yoshida, M., Kida, E., Ye, Y.-p., Akahoshi, S., Asakawa, T., Matsumura, K., Ishida, H., Nukaya, H., Tsuji, K., Kan, T., Abe, I.: Furan fatty acid as an anti-inflammatory component from green-lipped mussel *Perna canaliculus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *108*, 17533-17537 (2011). DOI: 10.1073/pnas.1110577108
  - Morita, H., Shimokawa, Y., Tanio, M., Kato, R., Noguchi, H., Sugio, S., Kohno, T., Abe, I.: A structure-based mechanism for benzalacetone synthase from *Rheum palmatum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *107*, 669-673 (2010). DOI: 10.1073/pnas.0909982107
  - Morita, H., Wanibuchi, K., Nii, H., Kato, R., Sugio, S., Abe, I.: Structural basis for the one-pot formation of the diarylheptanoid scaffold by curcuminoid synthase from *Oryza sativa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *107*, 19778-19783 (2010). DOI: 10.1073/pnas.1011499107
  - Itoh, T., Tokunaga, K., Matsuda, Y., Fujii, I., Abe, I., Ebizuka, Y., Kushiro, T.: Reconstitution of a fungal meroterpenoid biosynthesis reveals the involvement of a novel family of terpene cyclases. *Nature Chemistry*, *2*, 858-864 (2010). DOI: 10.1038/nchem.764

[学会発表] (計 100 件)

以下、すべて発表者：阿部郁朗 (招待講演)

- TERPNET 2015: International Meeting on Biosynthesis, Functions and Synthetic Biology of Isoprenoids, Vancouver, Canada, 2015/6/1-5, "Biosynthesis of fungal meroterpenoids".
- International Conference on Natural Products 2015, Johor Bahru, Malaysia, 2015/3/24-25, "Engineered biosynthesis of medicinal natural products".
- 97th Canadian Chemistry Conference and

- Exhibition, Vancouver, Canada, 2014/6/1-5, "Biosynthesis of fungal meroterpenoids".
4. 9<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography of Natural Products, Lublin, Poland, 2014/5/26-29, "Engineered biosynthesis of medicinal natural products".
  5. International Conference on Medicinal Chemistry and Timmerman Award 2013, Jakarta, Indonesia, 2013/10/29,30, "Engineered biosynthesis of medicinal natural products".
  6. Enzyme Engineering XXII: Emerging topics in Enzyme Engineering, Toyama, Japan, 2013/9/22-26, "Expanding the catalytic repertoires of biosynthetic enzymes".
  7. TERPNET2013: International Meeting on Biosynthesis, Function and Biotechnology of Isoprenoids in Terrestrial and Marine Organisms, Crete, Greece, 2013/6/1-5, "Biosynthesis of fungal meroterpenoids".
  8. Banbury Center Conference on the Evolution of Plant Metabolism, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2013/3/3-6, "Engineered biosynthesis of plant polyphenols".
  9. Directing Biosynthesis III, Nottingham, UK, 2012/9/19-21, "Expanding the catalytic repertoires of biosynthetic enzymes".
  10. 8<sup>th</sup> U.S.-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products, Awajishima, Hyogo, Japan, 2012/6/17-22, "Engineering plant polyketide synthases".
  11. Enzyme Engineering XXI, Veil, Colorado, USA, 2011/9/18-22, "Engineering plant polyketide synthases".
  12. Phytochemical Society of North America 50th Anniversary Symposium, Kohala Coast, Hawaii, USA, 2011/12/10-15, "Engineering plant polyketide synthases".
  13. International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), Symposium on Natural Product Biosynthesis, Honolulu, Hawaii, USA, 2010/12/15, "Engineering of Plant Polyketide Synthases".
  14. 9<sup>th</sup> NRCT-JSPS Joint Seminar, Bangkok, Thailand, 2010/12/9, "Engineering natural products biosynthesis".
  15. 25<sup>th</sup> Symposium on Natural Products, Kaohsiung, Taiwan, 2010/11/6-7, "Engineering natural products biosynthesis".
  16. Directing Biosynthesis 2010: Discovery, Evolution, Function, Durham, United Kingdom, 2010/9/15, "Engineering of Plant Polyketide Synthases".
  17. 50th Anniversary symposium of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, Gyeongju, Korea, 2010/8/25, "Engineering of Plant Polyketide Synthases".

〔図書〕 (計 7 件)

1. Matsuda, Y., Abe, I.: "Chapter 13 Meroterpenoids", In *Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites*; Martín, J.-F., Carlos, G.-E., Susanne, Z., Eds.; Springer, 2014; pp. 289-301.
2. Abe, I. "Chapter 16 The oxidosqualene cyclases: one substrate, diverse products", In *Natural Products: Discourse, Diversity and Design*; Osbourn, A., Goss, R., Carter, G. T., Eds.; Wiley, 2014; pp. 297-316
3. I. Abe, "Chapter 27 Enzymatic Synthesis of Unnatural Cyclic Triterpenes", In *Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms*; T. Bach, M. Rohmer, Eds.; Springer: Oxford, 2012; pp. 393-403.

〔その他〕

ホームページ等

<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：4 0 3 0 5 4 9 6

##### (2) 研究分担者

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：1 0 7 2 0 7 6 6

##### (3) 連携研究者

脇本 敏幸 (WAKIMOTO, Toshiyuki)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授  
研究者番号：7 0 3 6 3 9 0 0

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：8 0 6 0 9 8 3 4

森田 洋行 (MORITA, Hiroyuki)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教  
研究者番号：2 0 4 1 6 6 6 3