

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32621

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01807

研究課題名(和文) 新規ハイブリッド型ポリケタイド合成酵素Steelyの産物多様性創出機構の解明

研究課題名(英文) Biochemical analysis of Hybrid type polyketide synthase Steely that produce multi-products

研究代表者

齊藤 玉緒 (SAITO, Tamao)

上智大学・理工学部・教授

研究者番号：30281843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞性粘菌のポリケタイド合成酵素SteelyはI型酵素とIII型酵素が融合した特徴的な構造を持つ。この酵素は細胞性粘菌の発生中期に柄細胞分化誘導分子のDIF-1を合成する。しかし、産物はDIF-1だけではない。本研究においてSteelyB酵素の第2の産物として塩素化されたジベンゾフランLCC-1を同定し、その詳細な構造決定した。この化合物の生合成経路を、放射性同位体³⁶Clラベルや、Feeding実験により検証した。その結果DIF-1生合成の最初の2つの酵素はLCC-1合成にも共通して使われていて、発現場所を変えることによって、LCC-1生合成システムへとスイッチしていることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Polyketide synthase “Steely” has a distinct structure that is a fusion of a type I and III polyketide synthases. One of them, SteelyB was identified to be responsible for the production of DIF-1 that induces (pre)stalk cells differentiation in the slug stage of *D. discoideum* development. We identified LCC-1, chlorinated benzofuran that accumulated in the stalk region of fruiting bodies as second product of SteelyB enzyme. NMR and Crystal structural analysis revealed the detailed structure of LCC-1. The result of chlorine labelling experiment showed that ChIA, a chlorinating enzyme that regulated DIF-1 production was also involved in biosynthetic pathway of LCC-1. The feeding experiment indicated that THPH, a DIF-1 polyketide backbone rescued the production of LCC-1 in *stlB* null mutant. From these results, we hypothesized that SteelyB and ChIA are also involved in the LCC-1 biosynthesis. These two enzymes change their localization and thus change the modifying enzymes to produce LCC-1

研究分野：生物分子化学

キーワード：ポリケタイド 生合成 微生物

1. 研究開始当初の背景

(1) 原生生物のポリケタイド生合成研究の現状と本研究の位置づけ:新たな研究分野の開拓

細胞性粘菌をはじめとする原生生物のポリケタイド生合成に関する研究は歴史が浅く、申請者の研究はこの分野の先駆けとして位置づけられる。2005年のゲノム解析終了により、細胞性粘菌はほかのどの微生物よりも多くの pks 遺伝子を持ち、独特の進化を遂げてきたことが推察され、PKS 研究の優れたモデル生物になる可能性が示された。申請者は細胞性粘菌において初めて同定された新規ハイブリッド型 PKS である Steely に関する研究を継続的に行っており、他の追従を許さない状況にある。(Eichinger et al., 2005 *Nature* Austin, Saito et al., 2006 *Nat.Chem Biol.* Narita et al., 2014 *Plos One*)。

(2) 細胞性粘菌のポリケタイド研究の現状:有用化合物資源としての細胞性粘菌

ポリケタイドはその多様な構造から幅広い生理活性を有する。特に微生物は有用な化合物を生産する生物群の一つであり、その重要度は群を抜いた存在である。そのため国内外を問わず、長年研究が進められてきた。現在では、新たな物質資源、生合成遺伝子資源の開発が解決を迫られる重要な課題となっている。そのなかにあって、細胞性粘菌が生産する低分子有機化合物は、その生活環の制御に関わる化合物が知られているにすぎない。一方で細胞性粘菌は、従来の天然物化学でよく利用されてきた生物種とは進化的にも大きく異なっているため、様々な新規化合物を生産していることが期待される。これまで報告されている化合物のいくつかは抗菌物質や神経突起伸長作用を持つことが示されている。(Sawada et al., 2000 *J. Antibiot.*, Nes et al. 1990 *PNAS*)

(3) これまでの研究から着想に至った経緯

研究代表者は細胞性粘菌の細胞分化を制御する芳香族ポリケタイドである DIF-1 の生合成経路をゲノム情報をもちいて解明することを試み、新規ハイブリッド型 PKS である SteelyB 酵素がそのポリケタイド骨格を作ること示した。Steely 酵素はこれまで別個の酵素と考えられてきた I 型 PKS の C 末端に III 型 PKS が融合するという特異な構造を持つ。一般に III 型 PKS は緩やかな基質特異性を持ち複数の産物を与えることが知られている。そこで、SteelyB 酵素の産物が DIF-1 以外に存在するかを調べたところ、DIF-1 がなくなる発生後期に柄細胞に蓄積する塩素

化合物 LCC を合成していることを明らかにした。更に *stlB* 遺伝子にタグをノックインし *in vivo* での SteelyB 酵素の挙動を解析した。その結果、SteelyB 酵素は発生中期 (slug 期) には予定胞子細胞で I 型と III 型 PKS が融合した形で発現し、芳香族ポリケタイド DIF-1 を合成すること、しかし、発生後期 (子実体期) になると発現場所・酵素構造を変えて、柄細胞で III 型 PKS のみが発現し、塩素含有ポリケタイド化合物 LCC を合成することを見つけた。この結果は Steely 酵素の III 型 PKS とアシルキャリアプロテイン (ACP) +III 型 PKS をそれぞれ大腸菌で発現させた場合 *in vitro* で異なる産物を与えるという Ghosh らの結果 (*J.Biol. Chem* 2008) を説明しようと考え、一つの仮説を導き出した。

つまり、Steely 酵素が発生後期に III 型 PKS を切り離し、ACP からはなれることによりその構造を変化させ、ひいては産物を変えていると考えてこれをプロダクトスイッチ仮説とした。この仮説を検証するために、一つの酵素が発生段階で産物を変えるのは、どのような機構によるのかという問題に着目し、SteelyB 酵素をモデルとして産物多様性創出の機構を解明するという課題の発想に至った。

2. 研究の目的

細胞性粘菌の Steely 酵素は、これまで別個の酵素と考えられてきた I 型ポリケタイド合成酵素 (PKS) と III 型 PKS が融合するという特異な構造を持つ。III 型 PKS は芳香族ポリケタイドを合成し、緩やかな基質特異性から複数の産物を与えることが知られているが、Steely 酵素の場合は発生段階に応じて、酵素の発現場所や構造を変化させ異なる産物を与えることが研究代表者のこれまでの研究結果から推定された。本研究では SteelyB 酵素をモデルとして複数の異なる産物を与える産物多様性創出の機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

全体の実験計画の概要は以下の 2 点にまとめられる。

(1) 物質生産の多様性創出機構の仮説 (プロダクトスイッチ仮説) の検証

I 型と III 型の PKS が融合した Steely 酵素が発生過程 (発生後期) で分離して、III 型酵素が単独で働き、他の修飾酵素と協調して DIF-1 以外の新たな化合物 (LCC) を作ると

いう仮説（プロダクトスイッチ仮説）を検証する。

具体的には Steely によって作り出される第二の化合物 LCC の構造の最終決定 Steely 酵素の構造変化に関する仮説の検証を行う。また、産物の構造が決定に伴って予想される生物学的な機能の検証も行う。

(2) 多段階稼働システムについての仮説の提唱とその検証

LCC の基本骨格の形成とその修飾酵素群がどのように協調的に機能しているのか、多段階酵素反応をマシナリーとして捉えた生合成制御に関する仮説を導き検証する。生合成酵素群（Steely B, ChlA halogenase, biaryl bond 形成酵素、メチル化酵素）の遺伝子発現解析、及び酵素タンパク質の進化的解析から、協調的な制御機構、つまりマシナリーとしての制御機構を解き明かす鍵となる部分がどこか、どのような機構かを解析する。

4. 研究成果

(1) 物質生産の多様性創出機構の仮説（プロダクトスイッチ仮説）の検証

Steely 酵素の第二の産物 LCC の構造

Steely 酵素の第二の産物と呼んでいる一群の化合物は、細胞性粘菌の子実体の形成後に柄細胞に蓄積する塩素を含む化合物であることがわかっている。そこで、野生型株の柄細胞にあって、stlB 遺伝子破壊株の柄細胞には蓄積しない化合物を精製し、その中で塩素を持つものをターゲットとして精製した。塩素が含まれているかについては MS スペクトルによって検証した。構造解析については¹H-NMR、¹³C-NMR、さらに X 線結晶解析によって行った。その結果、以下の図 1 に示すような化合物を第二の産物として同定し LCC-1 とした。この化合物はジベンゾフラン骨格に塩素が 3 分子結合した構造を持っており、右半分の構造は DIF-1 とよく似た構造を持っている。分子量は 446 であった。

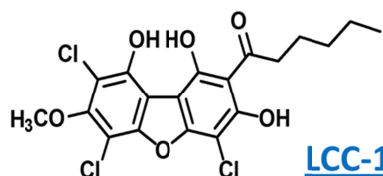


図 1 SteelyB の第二の産物 LCC-1 の構造

なお、LCC は類似の構造を持つことが推定され、塩素を持つことを特徴とする一群の化合

物である。LCC-1 はその中で最も含量が多いものであり、その他にもいくつかの微量な LCC 化合物が存在する。そこで、これらのマイナーな成分についても精製し、構造解析を試みた。そのうちの一つは分子量 822 で、同位体イオンピークから 3 分子の塩素を含む化合物であることが推定された。その他に分子量 1004, 1032 の化合物を得たが、いずれも微量であるため、詳細な構造解析には至らなかった。

Steely 酵素の構造変化に関する仮説の検証

決定した LCC-1 の構造と ³⁶Cl 放射性同位体ラベルした細胞性粘菌の抽出物を用いた薄層クロマトグラフィーの結果から、当初は第 1 の産物である DIF-1 の代謝産物と、新たに合成されたフロログルシノールがカップリングすることによって LCC-1 の骨格を作り出すと考えていた(図 2)。また、子実体期には III 型 PKS が単独で働くことが推定されていたのでフロログルシノールを作り出すのは III 型 PKS の部分であろうと想定していた。

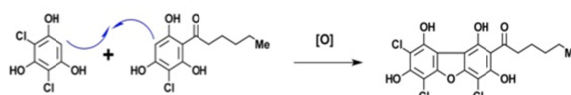


図 2 想定していた LCC 骨格の合成経路

そこで、stlB 遺伝子破壊株に柄細胞で特異的に発現するプロモーターで III 型 PKS を発現させ、外から DIF-1 を与えて LCC-1 の合成が回復するかを検証したが、予想に反して LCC-1 の合成は見られなかった。

この結果から、LCC-1 の生合成経路は、想定していたものとは異なることが分かった。

また、III 型 PKS 部分の切断については、切断部位の大きかな位置が、精製した III 型 PKS のマススペクトル解析によってわかり、予想通り III 型 PKS とアシルキャリアプロテイン領域の間であることが分かった。この切断は、StlB 遺伝子の 5'側と 3'側のそれぞれの発現解析の結果が一致していることから、オルタナティブスプライシングによるものではなくタンパク質レベルでの切断であると考えている。

この生合成経路の問題を解決するために、もう一つの Steely 酵素である、SteelyA 酵素の産物多様性についても検証した。その結果 SteelyA 酵素自体は変化することなく、産物のポリケタイド骨格は同じもので、修飾酵素が変わることによって複数の産物を作り出していることが分かった。

したがって、このような酵素自体が変化して、新しい産物を与えるというのは細胞性粘菌のゲノム中に2つ存在する Steely 酵素のうち SteelyB 酵素に特異的なものと考えられる。

(2) 多段階稼働システムについての仮説の提唱とその検証

生合成経路の仮説と検証

LCC-1 のポリケタイド骨格がどのようにして作られているのかについて、予想していた生合成経路とは違うことが分かったので、³⁶Cl 放射性同位体ラベルした細胞性粘菌の抽出物を用いた薄層クロマトグラフィーを用いて再度前駆物質の検証を行った。その結果、不安定ながら DIF-1 の前駆物質である 1-(2,4,6-Trihydroxyphenyl)hexan-1-one (THPH) を stIB 遺伝子破壊株に与えた場合に LCC-1 の合成が回復することが示された。そこで ³⁶Cl 放射性同位体を使わずに、培地中に THPH を加えて、stIB 遺伝子破壊株に与えて LCC-1 の合成が回復するかを確認する Feeding 実験を行った。Feeding 実験で得られた細胞抽出物からシリカゲルカラムクロマトグラフィーや HPLC によって、粗精製を行い、LCC-1 の存在を確認した。この LCC 画分を分取して、マスペクトル解析を行った。その結果 LCC-1 の合成が回復していることを確認した。

以上の実験により、THPH が LCC-1 の前駆物質であることを再現的に確認した。このことは SteelyB が DIF-1 の前駆物質として作っている THPH を合成し、これがカップリングすることによって、LCC-1 のジベンゾフラン環の骨格を作っていることを示している。一方で、数多く存在する LCC の中には THPH を与えただけでは合成が回復しないものも存在している。

SteelyB 酵素が発生の最終段階で切断されているというデータから考えると、これらの LCC は切断された III 型 PKS によって作られていると考えている。図 3 に、現在想定している生合成経路を示す。

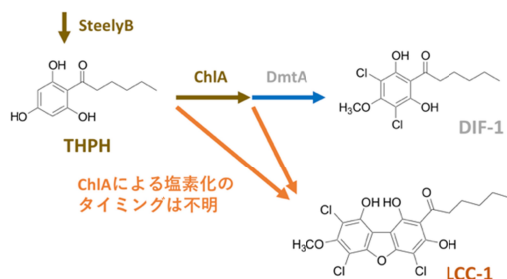


図 3 DIF-1 と LCC-1 の生合成経路

以上の結果は、生合成経路の各段階を制御する酵素の空間的な分布の違いと合致する。つまり、各酵素は発現する場所を変えることによって、その組み合わせを変え産物を変えていることが示された。

発生の中期に DIF-1 を合成している時には SteelyB、塩素化酵素 ChIA、メチル基転移酵素 dmtA はすべて予定胞子細胞領域で発現しており、この時には3つの酵素が協力して DIF-1 を合成する。

しかし、子実体期では SteelyB と ChIA は発現場所を柄細胞に変え、dmtA は胞子細胞で発現することにより DIF-1 の合成が行われず、その代わりに LCC-1 を合成していると考えられる。

以上の結果を踏まえ、新たに見えてきた問題点として、SteelyB がなせI型とIII型のPKSを融合させた形をとっているのか、その意義はどこにあるのかという謎を理解したいと考えている。その上で、多段階酵素反応をマシナリーとして捉えた生合成制御に関する仮説を導き出したいと考えている。

LCC-1 の生化学

LCC-1 が生物学的にどのような機能を担っているのかの検証を行った。これまでに報告されている、構造の似た化合物として種のことなる細胞性粘菌が作り出す AB0022A という化合物が存在する。両者の違いは以下の図 4 に示しように3位のヒドロキシ基とメトキシ基の違いである。

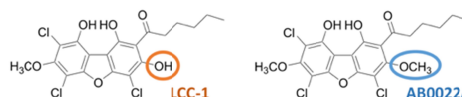


図 4 LCC-1 と AB0022A

AB0022A は抗菌活性があることが報告されていたので、LCC-1 についても抗菌活性の測定を行った。

その結果、枯草菌に対して非常に強い抗菌活性を有していることが明らかとなった。細胞性粘菌はグラム陰性菌を好んで捕食しているようで、枯草菌はあまり好まないことから、子実体を使った生き残り戦略に関係があるのではないかと考えている。

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 1 件)

Yukie G. Sato, Teresa Suarez & Tamao Saito

Stalk cell differentiation without polyketides in the cellular slime mold. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, published on line 24 Mar. 2016
DOI:10.1080/09168451.2016.1162087 (査読あり)

〔学会発表〕(計 7 件)

細胞性粘菌が生産するハロゲン化有機化合物の機能と生合成機構の解析
飯島知之、品川知則、臼杵豊展、鈴木教之、Kay RR、齊藤玉緒
日本農芸化学会 2018 年度大会 (2018 年 3 月 16 日から 3 月 18 日)名城大学 愛知県名古屋市

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の細胞集合と孢子成熟の機能経路に関する研究
近藤杏奈、成田隆明、村田ちひろ、臼杵豊展、齊藤玉緒
日本農芸化学会 2017 年度大会(2017 年 3 月 17 日から 3 月 20 日)京都女子大 京都府京都市

ハイブリッド型ポリケタイド合成酵素 SteelyB の産物多様性機構の解析
飯島知之、品川知則、深澤汐香、臼杵豊展、鈴木教之、齊藤玉緒
第 29 回日本植物脂質シンポジウム (2016 年 11 月 25 日から 11 月 26 日)大阪大学 大阪府豊中市

4-methyl-5-pentylbenzene-1,3-diol(MPBD) の構造活性相関
近藤杏奈、成田隆明、村田ちひろ、小倉徹大、臼杵豊展、齊藤玉緒
第 6 回日本日本細胞性粘菌学会例会 2016 年 10 月 15 日から 10 月 16 日)上智大学 東京都千代田区

ハイブリッド型ポリケタイド合成酵素 SteelyB の産物多様性機構の解析

飯島知之、臼杵豊展、鈴木教之、齊藤玉緒
第 6 回日本日本細胞性粘菌学会例会 2016 年 10 月 15 日から 10 月 16 日)上智大学 東京都千代田区

ハイブリッド型ポリケタイド合成酵素 SteelyB の産物多様性の解析
飯島知之、齊藤玉緒
日本農芸化学会 2016 年度大会 (2016 年 3 月 28 日から 30 日)札幌

Kondo A., Iwasaki N., Narita T., Murata C., Ogura T., TUsuki T., Saito T.
Structure activity correlation of 4-methyl-5-pentylbenzene-1, 3-diol (MPBD), a differentiation-inducing factor of *Dictyostelium discoideum*. Annual International Dictyostelium Meeting (2015 年 8 月 9 日から 2015 年 8 月 13 日) London UK

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 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 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://rscdb.cc.sophia.ac.jp/Profiles/69/0006815/profile.html>

6. 研究組織
(1)研究代表者
齊藤 玉緒 (SAITO Tamao)
上智大学・理工学部・教授
研究者番号：30281843

(2)研究分担者

森田 直樹 (MORITA Naoki)

国立研究開発法人 産業技術総合研究所

・生命工学領域・研究グループ付

研究者番号： 60371085