

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13084

研究課題名(和文)放線菌由来ポリケチド・ペプチド合成酵素のリプログラミング

研究課題名(英文)Reprogramming of the polyketide synthase/peptide synthetase from Streptomyces

研究代表者

阿部 郁朗(Abe, Ikuro)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・教授

研究者番号：40305496

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文): NRPS / PKSモジュール酵素のリプログラミングは、新規生物活性分子創出のための魅力的な方法である。本研究では、環縮小、環拡大、および、アルキル鎖の多様化の3つの操作に成功し、非天然の新規な誘導体ライブラリー構築を実用的収率で達成した。本研究は、NRPS-PKSモジュール酵素を設計するための有用な戦略を提示した。

研究成果の概要(英文): Reprogramming of the NRPS/PKS assembly line is an attractive method for the creation of novel bioactive molecules. In this study, we successfully accomplished three manipulations: i) ring contraction, ii) ring expansion, and iii) alkyl chain diversification, to generate a set of unnatural novel derivatives in practical yields. This study presented a useful strategy for engineering NRPS-PKS module enzymes.

研究分野：生物分子科学

キーワード：合成生物学 生合成 天然物化学 酵素工学

1. 研究開始当初の背景

海洋無脊椎動物の中でもとりわけ海綿動物は天然生物活性物質の宝庫として知られている。海綿動物は付着性で大量の海水をろ過することで、有機物を摂取して生きており、この際に一過性に取り込む微生物とともに、多種多様な微生物が共生している。海綿動物が保有する多様な生物活性物質の多くは共生微生物によって生産されており、化学防御物質として機能すると考えられている。それらの中には医薬品のリード化合物として有望視されるものが複数存在する。中でも、ハリコンドリリン B は海綿由来の生物活性物質が抗がん剤開発に成功した例として記憶に新しい。

2. 研究の目的

我々は先行研究によって、伊豆半島産の海綿 *Discodermia calyx* に含まれる、抗ガン剤としての応用が期待される細胞毒性物質、カリクリン A の生合成遺伝子クラスターを同定し、その生産菌を明らかにしてきた。興味深いことに、太平洋海域に生息する全く異なる種々の海綿からカリクリン A と同一の骨格を有する代謝産物が単離、報告されている。そこで、これら太平洋域の海綿を採集調査し、生合成遺伝子を単離、比較検討することにより、その生合成機構を解明し、天然物の構造多様性の起原を探る。また同時に、これら海綿に共通の生産菌が存在する可能性について検証し、物質生産に秀でた共生菌の分布の普遍性を調査する。

3. 研究の方法

このような背景のもと、我々は先行研究において、Theonellidae 科に属する海綿 *Theonella swinhoei* 及び *Discodermia calyx* の 2 種において二次代謝産物生合成遺伝子の解析を進め、遺伝子をコードする共生細菌の同定に成功した。同定した生産菌は新門 Tectomicrobia 門に属する *Entotheonella* 属難培養性細菌であり、ポリケタイドからペプチドなど多様かつ複雑な生物活性物質の生産を担う、物質生産に極めて秀でたバクテリアであった。従来、海綿動物からの二次代謝産物生合成遺伝子の取得は非常に困難とされてきたが、我々の研究によって海綿メタゲノムに基づく解析が実現可能であることを示すことができた。ひとたび生合成遺伝子が取得できれば、生産菌の特定のほか、詳細な生合成経路の解析やメタゲノムマイニングによる新規代謝産物の探索にも有用な情報が得られる。特にメタゲノムマイニングにおいては生合成産物が未同定な生合成遺伝子クラスターも同時に得られることが多く、新たな天然物の探索の重要な指標となる。そこで、本研究ではメタゲノムマイニングによって海綿由来二次代謝産物の生合成遺伝子の取得を試みるとともに、遺伝子情報に基づく新たな代謝産物の特定を試みた。

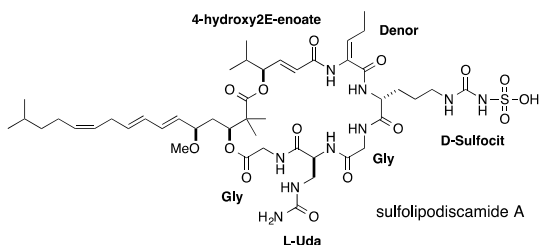
4. 研究成果

伊豆半島や紀伊半島に生息する *Discodermia kiiensis* には環状デプシペプチドである discodermin 類が主要な二次代謝産物として含まれていることが知られている。また、よりマイナーな成分として紀伊半島産 *D. kiiensis* より discokiolide 類が報告されている。我々は 2014 年に伊豆半島産 *D. kiiensis* より新規リポペプチド lipodiscamide 類を単離、構造決定した。環状構造内に 2 つのエステル結合を有し、シトルリン、ウレイドアラニン、デヒドロノルバリンなどの異常アミノ酸を含む特異な環状デプシペプチドであった。

日本産 *D. kiiensis* からは上記 3 つの特異な環状デプシペプチドが見出されている。しかし、それらの生合成遺伝子や生産菌の報告例はこれまで皆無であった。そこで、これら代謝産物の生合成遺伝子を取得し、その生産を担う共生微生物の同定を試みた。*D. kiiensis* の組織を人工海水に懸濁し、光学顕微鏡によって観察した結果、フィラメント状の特徴的な形態を有するバクテリア細胞が多数認められた。この形態は海綿共生細菌 *Entotheonella* 属の特徴でもあることから、それらを密度勾配遠心法によって分画し、エンリッチした画分からゲノムを抽出し、次世代シーケンサーによって解析した。その結果、discodermin 及び lipodiscamide の生合成遺伝子クラスターの取得に成功した。Discodermin に関しては NRPS の A domain の基質特異性を検討した結果、構成アミノ酸と良い一致を示した。Lipodiscamide に関してはクラスター内に予想外の硫酸基転移酵素がコードされていたため、硫酸化 lipodiscamide の存在が示唆された。そこで実際に海綿抽出液中の探索を行った。硫酸化体は比較的極性が高いこと予想されたため、海綿抽出液を液液分配して得られたブタノール層を Spheadex LH-20 カラムクロマトグラフィーによって分画し、網羅的な解析を進めた。その結果、lipodiscamide よりも分子量 80 大きい化合物を検出した。80 マスユニットは硫酸基 1 個分に相当する。

Lipodiscamide の構造には水酸基は一つもないことから、硫酸化される部位として考えられる官能基は分子内に 2 つ存在するウレア残基のみであった。しかし、これまでに硫酸化ウレア構造を持つ天然物の報告例は皆無であったため、実際にそのような官能基が天然物として存在するかどうかは不明であった。そこで、各種 2 次元 NMR スペクトルの詳細な解析を行い、sulfolipodiscamide のシトルリン残基のケミカルシフトが lipodiscamide と大きく異なっていることが判明した。したがって硫酸基はシトルリンのウレア基に結合していることが分かった。マウス白血病細胞 P388 に対する細胞毒性試験の結果、新規化合物 sulfolipodiscamide の IC₅₀ 値は lipodiscamide より約 2 倍程度低濃度であ

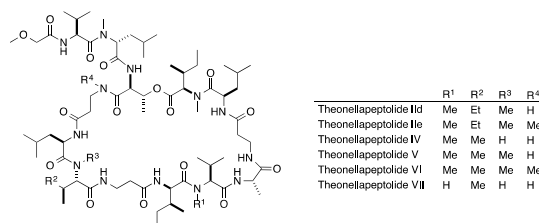
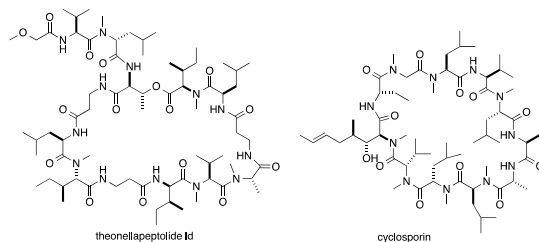
った。以上の結果より *D. kiiensis* 由来の discodermin 類、lipodiscamide 類はいずれも海綿共生微生物 *Entotheonella* によって生産されていることが明らかになった。



Discodermia 属の海綿動物に比較して *Theonella* 属海綿は温帯から熱帯に至る世界各地の海に生息している。近年、我々のグループを含む国際共同研究チームによって八丈島産の *Theonella swinhoei* については共生菌 *Entotheonella* や生合成遺伝子の詳細が明らかになってきている。しかし、八丈島以外の海域に生息する *Theonella swinhoei* においても多種多様な生物活性天然物が見出されており、それらの探索や生合成経路の解明が待たれている。特に亜熱帯から熱帯太平洋域に生息する *Theonella swinhoei* においては八丈島産とは異なる代謝産物を有することが知られており、本研究では沖縄以南に生息する *Theonella swinhoei* について代謝物や遺伝子の解析を進めた。

沖縄およびインドネシア産の *T. swinhoei* に特徴的な化合物として theonellapeptolide 類があげられる。Theonellapeptolide 類は、1986年に北川らによって海綿 *Theonella swinhoei* より初めて単離された大環状デプシペプチドである。Theonellapeptolide Id は *N*-メチルアミノ酸や *D* アミノ酸の含有率が高いデプシペプチドであり、ウニ卵割阻害活性、 Na^+ , K^+ イオン輸送活性²⁾、ATPase 阻害活性、骨髄腫細胞に対する細胞毒性などの生物活性を示す。さらに、脂肪族アミノ酸や *N*-メチルアミノ酸に富む大環状構造は免疫抑制剤であるシクロスポリンとも類似しており、実際に混合リンパ球反応において抑制効果が認められている。このように Theonellapeptolide 類は多様な生物活性を示し、新規免疫抑制活性も期待できる化合物であるが、その希少性ゆえに詳細な作用機序は未解明であり、さらに化学合成による構造確認および量的供給の報告例もない。そこで我々は Theonellapeptolide Id の全合成を試み、Fmoc ペプチド固相合成法によって効率的な全合成を達成し、その構造の確認に至った。さらに theonellapeptolide 類には構造未解明な3つの類縁体 theonellapeptolide IV, V, VI の存在が報告されている。インドネシア産 *Theonella swinhoei* よりそれらの単離精製を試み、theonellapeptolide IV, V, VI および新規 theonellapeptolide 類縁体1種を得ることに成功した。これら類縁体の ¹H NMR スペクトル

はシグナルのブロード化が激しく、その上、2つ以上の配座異性体が混在していたため、NMR スペクトルを用いた構造解析は困難であった。そこで、メタノリシスによってエステル部位を開裂し、得られた鎖状ペプチド構造を MS/MS 解析に供することで、平面構造を決定した。現在部分加水分解によってペプチド断片を取得し、構成アミノ酸の立体化学の決定を進めている。Theonellapeptolide 類は多数の類縁体を有し、それらは Val や Ile 等の脂肪族アミノ酸の置換や *N*-メチル基の有無に起因している。非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) によって生合成されることが示唆されるが、その生合成遺伝子は未だ同定されていない。そこで、現在、A ドメインの保存配列をもとに、生合成遺伝子クラスターの探索を進めている。生合成遺伝子が得られれば、*Entotheonella* と予想される生産菌の同定を進める。



カビや放線菌、高等植物などからはこれまでに様々な医薬品資源が発見され、それらの中にはすでに医薬品に臨床応用された化合物も数多い。同様に海洋生物からも数多くの生物活性物質が報告されているが、医薬品として利用されている化合物は数少ない。その理由は海洋生物自体が希少生物資源であるため、有望な化合物が見出されても、応用に向けた開発研究に展開可能な収量を得ることが難しい点が挙げられる。この状況を打開するためには、海綿動物などの海洋生物が生物活性物質を作り上げる機構を明らかにし、その物質生産システムを利用する方策が望まれる。しかし、海綿動物は複雑な共生体であるため、共生微生物が物質生産に関わる事例も数多く指摘されており、難培養共生微生物を含めた解析が未だ容易ではない現状において、海綿由来生物活性物質の生合成機構は大部分が謎のままである。太平洋域の海域には多種多様な海綿動物が生息しており、*Entotheonella* をはじめとする物質生産を担う共生微生物も徐々に明らかになってきている。これらの事実は太平洋域の海洋生物資源

の重要性を示すものであり、生育環境の保全と持続可能な利用方法の確立によって、今後の医薬品開発に多大な貢献が期待される。

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 31 件)

以下、すべて査読あり

1. He, F., Nakamura, H., Hoshino, S., Chin, J. S. F., Yang, L., Zhang, H.-P., Hayashi, F., Abe, I., “Hinduchelins A–D, noncytotoxic catechol derivatives from *Streptoalloteichus hindustanus*”, *J. Nat. Prod.*, *81*, in press (2018)
DOI: 10.1021/acs.jnatprod.8b00049
2. Woo, S.-Y., Win, N. N., Wong, C. P., Ito, T., Hoshino, S., Ngwe, H., Aye, A. A., Han, N., Zhang, H., Hayashi, F., Abe, I., Morita, H., “Two new pyrrolo-2-aminoimidazoles, Clathriroles A and B, from marine sponge, *Clathria prolifera* collected in Myanmar”, *J. Nat. Med.*, *72*, 803-807 (2018)
DOI: 10.1007/s11418-018-1205-y
3. T. Kuranaga, A. Enomoto, H. Tan, K. Fujita, T. Wakimoto, “Total synthesis of theonellapeptolide Id”. *Org. Lett.*, *19*, 1366-1369 (2017)
DOI: 10.1021/acs.orglett.7b00249
4. 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*, e0164468/1-e0164468/15 (2016)
DOI: 10.1371/journal.pone.0164468
5. K. C. Tan, T. Wakimoto, I. Abe, “Sulfoureido lipopeptides from the marine sponge *Discodermia kiiensis*”, *J. Nat. Prod.* *79*, 2418-2422 (2016)
DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00586
6. Wakimoto, T., Egami, Y., Abe, I., “Nature's way of making the sponge-derived cytotoxin”, *Nat. Prod. Rep.*, *33*, 751-760 (2016).
DOI: 10.1039/C5NP00123D
7. Y. Takeshige, Y. Egami, T. Wakimoto, I. Abe, “Production of indole antibiotics induced by exogenous gene derived from sponge metagenome”, *Mol. BioSyst.*, *11*, 1290-1294 (2015)
DOI: 10.1039/C5MB00131E
8. 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)
DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.53.497
9. K. C. Tan, T. Wakimoto, I. Abe, “Lipodiscamides A-C, new cytotoxic

lipopeptides from the marine sponge *Discodermia kiiensis*”, *Org. Lett.*, *16*, 3256-3259 (2014).

DOI: 10.1021/ol501271v

10. H. Tajima, T. Wakimoto, K. Takada, Y. Ise, I. Abe, “Revised structure of cyclolithistide A, a cyclic depsipeptide from the marine sponge *Discodermia japonica*”, *J. Nat. Prod.*, *77*, 154-158 (2014)
DOI: 10.1021/np400668k
11. T. Wakimoto, Y. Egami, Y. Nakashima, Y. Wakimoto, T. Mori, T. Awakawa, T. Ito, H. Kenmoku, Y. Asakawa, J. Piel, I. Abe, “Calyculin biogenesis from a pyrophosphate protoxin produced by a sponge symbiont”, *Nat. Chem. Biol.*, *10*, 648-655 (2014)
DOI: 10.1038/nchembio.1573
12. M. C. Wilson, T. Mori, C. Rückert, A. R. Uriá, M. J. Helf, K. Takada, C. Gernert, U. Steffens, N. Heycke, S. Schmitt, C. Rinke, E. J. N. Helfrich, A. O. Brachmann, C. Gurgui, T. Wakimoto, M. Kracht, M. Crüsemann, U. Hentschel, I. Abe, S. Matsunaga, J. Kalinowski, H. Takeyama, J. Piel, An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. *Nature*, *506*, 58-62 (2014)
DOI: 10.1038/nature12959

〔学会発表〕(計 80 件)

以下、すべて発表者：阿部郁朗

1. 2018/03/21 34th International Conference on Natural Products 2018 (ICNP 2018), Penang, Malaysia, “Engineered Biosynthesis of Medicinal Natural Products”
2. 2018/02/28 8th CMDD Symposium on Marine Natural Products, Seoul, Korea, “Engineered Biosynthesis of Medicinal Natural Products”
3. 2018/01/15 2018 Synthetic Biotechnology Training Course, Beijing, China, “Engineered Biosynthesis of Medicinal Natural Products”
4. 2017/11/28 理研シンポジウム、高磁場・高感度 NMR 利活用促進のための天然物分野における日中連携シンポジウム 2017、理化学研究所横浜キャンパス、横浜、「薬用天然物の生合成リデザイン」
5. 2017/05/31 9th US-Japan Seminar on Natural Product Biosynthesis, UCLA Lake Arrowhead Conference Center, California, USA, “Enzymes Involved in the Complex Natural Products Biosynthesis”
6. 2017/03/26 PSJ-AAPS Joint Symposium, Creation of Complex Functional Molecules by Rational Redesign of Biosynthetic Machineries, Sendai, Japan, “Redesigning Complex Natural Products Biosynthesis”
7. 2016/10/16 13th International

- Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms (GIM2016), Wuhan, China, “*Engineered Biosynthesis of Medicinal Natural Products*”
8. 2016/07/26 Cytochrome P450 Biodiversity & Biotechnology, Vancouver, Canada, “*Multifunctional Oxygenases Involved in Complex Natural Products Biosynthesis*”
 9. 2015/11/30 14th Federation of Asian and Oceanian Biochemists and Molecular Biologists (FAOBMB) Congress, Current Excitements in Biochemistry and Molecular Biology for Agriculture and Medicine, Hyderabad, India, “*Engineered Biosynthesis of Medicinal Natural Products*”

以下、すべて発表者：脇本敏幸

10. “Marine sponge-derived metagenomes/ uncultured bacteria - a rich source of novel natural product biosynthetic genes” International Conference on Marine Biodiversity and Biotechnology (Jakarta, Indonesia), Oct 25, 2017
11. “Activated Chemical Defense of Japanese Marine Sponge *Discodermia calyx*” 2017 ISCE/APACE (Kyoto, Japan), Aug 24, 2017
12. “Toward the dark matter of marine natural products” International Symposium on Marine Natural Products (Seoul, Korea), Feb 28, 2017
13. “Marine sponge-derived metagenomes/ uncultured bacteria - a rich source of novel natural product biosynthetic genes” Joint Czech-Japan workshop “Innovative technologies for the discovery of natural products” (Prague, Czech), Nov 9, 2016
14. “Activated Chemical Defense of a Sponge-Microbe Association” Gordon Research Conference Marine Natural Products (Ventura, USA), Mar. 8, 2016.

〔図書〕(計2件)

1. 脇本敏幸、カリクリンの生合成、天然物の化学 - 魅力と展望 - (上村大輔 編) 科学のとびら 60 (東京化学同人), p.61-66 (2016)
2. T. Wakimoto, K. C. Tan, H. Tajima, I. Abe, Cytotoxic cyclic peptides from the marine sponges. *Anticancer Drug from Marine Origin*, Springer, Chapter 6, pp. 113-144 (2015)

〔その他〕

ホームページ：東京大学大学院薬学系研究科天然物化学教室

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~tennen/head.htm>

北海道大学大学院薬学研究院天然物化学教室

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/tennen/index.html>

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

脇本 敏幸 (WAKIMOTO, Toshiyuki)
北海道大学・薬学研究院・教授
研究者番号：7 0 3 6 3 9 0 0