

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17H03995

研究課題名(和文)繰返しタイプI型ポリケチド合成酵素の反応制御基盤

研究課題名(英文)Functional and structural analyses of iterative type I polypeptide synthases

研究代表者

藤井 勲(Fujii, Isao)

北里大学・薬学部・客員教授

研究者番号：70181302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：糸状菌に見られる繰返しタイプI型ポリケチド合成酵素(iPKS)について、特異的な炭素骨格が構築される反応制御機構の解明とその生物合成への応用を目的として、本研究ではshimalactone生合成の還元型iPKSであるShmAを中心として、生合成遺伝子クラスターの同定、麹菌や酵母での発現を行い、shimalactoneの生合成では特異的な2つのピシクロ環形成反応が前駆体から非酵素的に進行することを明らかにした。また、麹菌発現株からのShmAタンパク質精製を行い、iPKS三次元立体構造解析への基盤作りを行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糸状菌は様々なポリケチド化合物を生産し、重要な医薬供給源となっている。本研究では、神経突起生成活性を有し特異なピシクロ環構造をもつシマラクトンについて、ポリケチド合成酵素ShmAを含むシマラクトン生合成遺伝子クラスターを同定するとともにShmAタンパク質の異種発現、精製法を確立した。これは今後のポリケチド合成酵素を利用した生物合成系開発への足掛かりとなるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：As a part of studies on fungal iterative type I polyketide synthases (iPKSs) to elucidate their reaction control mechanisms, the biosynthetic gene cluster of shimalactone was cloned from *Emericella variecolor* GF10 and analyzed. Although it was difficult to express ShmA protein in yeast, ShmA protein with His-tag was well expressed in *Aspergillus oryzae* and successfully purified using Ni-affinity chromatography. Thus obtained homogeneous ShmA iPKS protein paves the way to further studies on its three dimensional structural elucidation as an example of fungal iPKS.

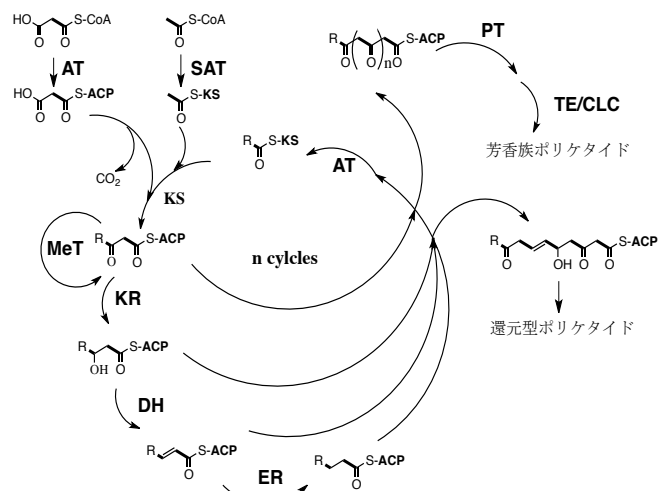
研究分野：天然物化学

キーワード：ポリケチド ポリケチド合成酵素 生合成

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炭素骨格を構築する生体反応は様々あるが、なかでもポリケタイド合成反応は、酢酸単位の縮合の繰返しによる炭素鎖伸長と、還元、メチル基の導入、環化による炭素骨格構築、その後の修飾反応、さらにはアミノ酸やテルペンとの融合などにより極めて多様な化学構造を生み出す生体触媒系である。その中心は、アシル基とマロニル基の Claisen 縮合により化合物の炭素骨格を構築するポリケタイド合成酵素 (PKS) である。右図にその反応スキームを示す。



我々は、従来より、糸状菌に見られる繰返しタイプ I 型ポリケタイド合成酵素 (iterative type I polyketide

synthase、以下 iPKS) について、基本的に 1 セットのマルチ触媒ドメインからなる多機能酵素である iPKS が繰返して働き、各酵素に特異的な炭素骨格が構築される反応制御機構の解明とその生物合成への応用を目的として、遺伝子のクローニング、異種発現系の構築、生成物の同定による機能解析などの研究を進めてきた。次世代シーケンズ技術の発展により iPKS についてもドラフトゲノムデータから極めて多くの遺伝子情報がデータベース上に蓄積されるようになったものの、どのような化合物を生合成する iPKS であるか、その機能はほとんどが不明であった。また、iPKS はマルチドメインの巨大タンパクであるため、タンパク全体の三次元構造の報告はなかった。そこで、これまでに手がけてきた糸状菌の各種 iPKS について、X 線結晶構造解析もしくは結晶化を要せずに構造解析が可能であるクライオ電子顕微鏡などを用いることにより三次元構造を明らかにできれば、タンパク構造と生成ポリケタイドの化学構造と関連づけて iPKS 内でのポリケタイド炭素鎖の伸長、構築過程を可視化するための基礎となるものと考えられた。

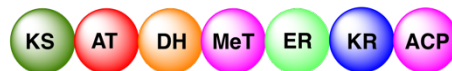
2. 研究の目的

糸状菌に特徴的な iPKS は、一本の大きなポリペプチド上にポリケタイド生成反応に関わる機能ドメインである縮合酵素 KS、アシル基転移酵素 AT、アシルキャリアープロテイン ACP の基本ドメインの他、還元、脱水、メチル化、閉環などの修飾ドメインが存在し、これらが機能的に協調し、見掛け上、繰返して反応に関与し、最終的に各 PKS に特異的な炭素骨格が構築される。iPKS はそのドメイン構成と機能から大きく二つに分けられる。1 つは、主に芳香族化合物を生合成する非還元型 NR-PKS であり、もう 1 つは、還元型化合物を生合成する HR-PKS である。その典型的なドメイン構成を下記に示すが、基本的に同一の architecture をもつ iPKS により生み出される化合物は、多環性芳香族化合物から高度に官能基化を受けた脂肪族化合物に至るまで、炭素鎖長、閉環様式など非常に多様性に富み、これが糸状菌 iPKS の特徴となっている。

NR-PKS



HR-PKS



SAT: starter acyltransferase, KS: ketosynthase, AT: acyltransferase, PT: product template domain, DH: dehydratase, MeT: methyltransferase, ER: enoyl reductase, KR: keto reductase, ACP: acyl carrier protein, TE/CLC: thioesterase/Claisen cyclase

しかしながら、iPKS における炭素鎖長、還元、閉環などの反応制御機構に関しては不明な点が多く本研究においては、芳香族化合物を生合成する非還元型 NR-PKS、及び脂肪族化合物を生合成する還元型 HR-PKS について、糸状菌や酵母などを宿主とする iPKS タンパク高発現系の構築とその精製を試みるとともに、三次元立体構造の解明を目指すことを目的とした。iPKS 上でのポリケタイド中間体炭素鎖の伸長、還元、閉環などの骨格構築過程を明らかにできれば、望みの化合物を生合成する生物合成システム開発の基盤となるものと考えられた。

3. 研究の方法

我々は、従来より糸状菌の iPKS を中心としてその機能解析を進めてきたが、これまでの研究において専ら開発、利用してきた麹菌 *Aspergillus oryzae* を宿主とする発現系は、PKS の生成する化合物の同定に大きな役割を果たし、他の糸状菌二次代謝系の解析にも応用されるようになってきた。しかしながら、発現タンパクの精製という点では、発現量などの問題があり、酵素

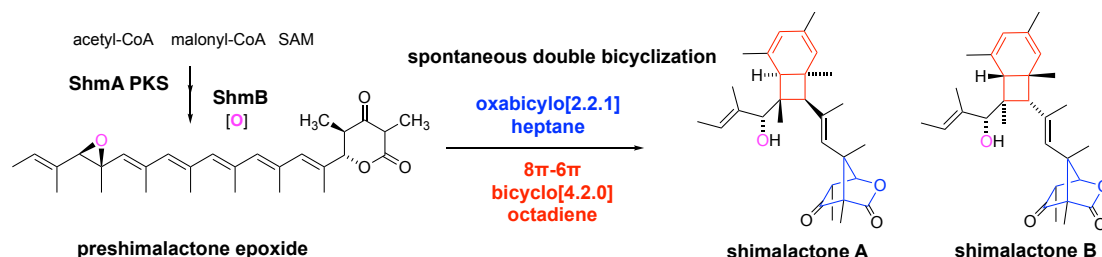
レベルでの解析は進んでいなかった。そのため、本研究においては、*A. oryzae* 以外の宿主として酵母を用いる発現系を中心とし、大腸菌での発現についても検討することとした。ただし、酵母や大腸菌での iPKS の発現では、iPKS を活性型とするためホスホパンテテイル基転移酵素を共発現させる必要がある。そこで、*A. nidulans* の *npgA* や *Bacillus* の *sfp* を組み込んだ発現用宿主を用いた。また、iPKS の C 末に各種 tag を付加して発現させ、アフィニティー精製など、効率的な精製方法の確立を検討した。酵母や大腸菌の発現系ではうまくいかない場合には、*A. oryzae* 発現系に戻り、プロモーター、宿主菌株、誘導培養条件などを検討した。対象とした iPKS としては、shimalactone 生合成の preshimalactone 合成酵素 ShmA、triacetic acid lactone (TAL) 合成酵素 TALS や、6-methylsalicylic acid 合成酵素 ATX を中心として検討した。

4. 研究成果

(1) HR-PKS ShmA の発現、機能解析と精製

糸状菌の還元型化合物を生成する HR-PKS として、本研究では、shimalactone 生合成の HR-PKS である ShmA を中心に検討した。

Emericella varicolor GF10 株の生産する shimalactone は、特異な 2 つのビシクロ環系を持つ化合物で、その生合成には $8\pi-6\pi$ 電子環状反応が関与する大変興味深い化合物である。



我々は、本菌のドラフトゲノム解析を行い、見出した候補生合成遺伝子クラスター中の HR-PKS 遺伝子を麹菌発現系で発現させることにより、shimalactone の生合成前駆体である preshimalactone が生成する HR-PKS 遺伝子 *shmA* を含む *shm* 生合成遺伝子クラスターをまず同定した。また、ShmA と本遺伝子クラスター中の酸化酵素 ShmB を麹菌で共発現させることにより、一気に shimalactone が生成することを明らかにした。これは、ShmB により preshimalactone の penultimate 二重結合がエポキシ化された preshimalactone epoxide が非酵素的に $8\pi-6\pi$ 電子環状反応を含む 2 つのビシクロ環形成反応が spontaneous に進行して shimalactone を生成したものと考えられた。ただし、*shm* 生合成遺伝子クラスターには、宿主麹菌の遺伝子と相同性の高い遺伝子も含まれていることから、ビシクロ環形成反応に宿主遺伝子の関与がないことを示すため、宿主を出芽酵母として ShmA HR-PKS および ShmB 酸化酵素の発現を検討することとした。

shmA PKS 遺伝子を酵母で発現させるため、まず、ShmA 発現麹菌より *shmA* cDNA を調製した。これを酵母発現ベクターに組み込んで、発現誘導による preshimalactone の酵母生産を検討した。最初に NR-PKS の発現が確認されている GAL1 promoter を用いて検討したが、preshimalactone の生産を確認することはできなかった。次いで、ADH2 promoter を用いる系を検討したところ、誘導発現酵母菌体中に preshimalactone の生産を確認することができた。さらに ShmB を ADH2 promoter 下に ShmA と共発現させることにより、shimalactone の生成も確認することができた。この preshimalactone から shimalactone への変換反応は、ShmB 発現酵母から調製した ShmB 粗酵素液を用いた *in vitro* の系でも確認され、ShmB により生成した preshimalactone のエポキシ体から非酵素的に 2 つのビシクロ環化反応が spontaneous に進行することを明らかにすることができた。このような非酵素的多段階ビシクロ環化連続反応は我々が知る限り、これが初めての例である。

出芽酵母での ShmA PKS の発現に成功したことから、これをベースとして、タンパクレベルでの発現確認と精製について検討した。精製用 tag として汎用される His-tag、PA-tag や HaloTag 付加体などについて検討したが、タンパクとしての発現は確認できなかった。酵母を宿主とした場合、PKS の機能的発現により生産化合物が微量であっても HPLC などで確認はできるものの、タンパクとしての発現量としては少ないことが原因と考えられた。そこで、タンパクの高発現系である *A. oryzae* の系に立ち返り、効率的 5' UTR と改良プロモーターを用いる大関株式会社 の麹菌発現系について検討することとした。5' UTR 直後に *shmA* cDNA を挿入し、C 末に linker を介して His-tag を付加するようデザインした発現プラスミドを構築した。これを *A. oryzae* NS4 株にプロトプラスト-PEG 法で形質転換・導入し、得られた形質転換株について、発現カセット遺伝子の増幅確認、抽出タンパクの SDS-PAGE とウェスタン解析による発現株選抜後、単孢子分離により高発現株を純化した。最終的に選抜した *A. oryzae/shmA-cHis* 形質転換株は 2 コピーの発現カセットがゲノムに挿入されていた。この形質転換株を 24 時間振盪培養した菌体より、20% glycerol を含む抽出バッファーで抽出して粗酵素液を調製し、C 末に付加した His-tag を利用した精製について検討したところ、Ni-NTA resin により精製できること

が確認された。また、この精製 ShmA を用いて *in vitro* 反応で preshimalactone が生成することを確認した。現在、この精製 ShmA を濃縮後、Crystal Screen I および JCSG-plus を用いた結晶化条件のスクリーニングを実施しているが、今のところ結晶は得られていない。今後、結晶化条件が確立できれば結晶構造解析へと進める予定である。また、結晶化が困難な場合は、クライオ電子顕微鏡による解析へと進めていきたいと考えている。

(2) NR-PKS および最小 iPKS の構築と発現の試み

我々は、shimalactone 生産菌 *Emericella varicolor* GF10 株のドラフトゲノムの解析において、contig-54 に非還元型 NR-PKS 遺伝子とそのクラスターを見出した。コードされる NR-PKS は、全長 1,514 aa と iPKS としてはこれまでのところ最小であり、その解析から SAT-KS-AT-2ACP のドメイン構成を持つことを確認した。NR-PKS としては、ポリケトメチレン鎖中間体のアルドール型の閉環反応により環化・芳香化に関わるとされる product template domain (PT) を持たない大変興味深いものであった。そこで、麹菌を宿主として発現させたところ、その生産化合物が triacetic acid lactone (TAL) であることを確認し、本 iPKS が TAL 合成酵素 TALS であることを明らかにした。この TALS を最小 iPKS を構築するベースとするため、出芽酵母 *S. cerevisiae* での発現について検討したところ、ADH2 プロモーター下に TALS cDNA を組み込んだ発現プラスミドを構築し、*ngpA* を組み込んだ発現用宿主 *S. cerevisiae* BJ5464-*ngpA* に導入して誘導培養を行ったところ、TAL の生産を確認することができた。

TALS



我々が以前にクローニングした NR-PKS 遺伝子である *atX* は、麹菌、酵母での異種発現により 6-methylsalicylic acid 合成酵素をコードすることを明らかにしているが、そのドメイン構成は、KS-AT-TH-KR-ACP となっている。ATX は、starter acyl transferase (SAT) ドメインを持たないが、acetyl 基をロードして反応を開始できることから、ATX の KS^{MS} ドメインを TALS の SAT-KS ドメインと入れ換えて、その機能確認を試みた。現在のところ、KS^{MS}-AT-2ACP ドメイン構成のキメラ体を構築し、酵母での発現について検討したが、生産物として予想した TAL の生産を確認することはできていない。このキメラ体が PKS として機能しないか、あるいは機能しても TAL 生産量が少ないかは検討中である。

ATX



また、ATX や TALS については、シャペロンプラスミド共存下での大腸菌での発現を検討し、特に ATX については、高い発現と Ni-NTA カラムを用いた精製条件を確立することができた。今後、これら NR-PKS についてもタンパク精製と三次元構造解析への展開を考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件(うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件)

1. 著者名 Ohte Satoshi, Toyoda Masayuki, Kobayashi Keisuke, Fujii Isao, Ohshiro Taichi, Tomoda Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Monapinone Coupling Enzyme Produces Non-Natural Heterodimers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Catalysts	6. 最初と最後の頁 1015 ~ 1015
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/catal11081015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nambu Natsuki, Tsai Huei Fung, Chang Yun C., Kwon Chung K. J., Yoshida Tomoki, Tanaka Nobutada, Tomoda Hiroshi, Ebizuka Yutaka, Fujii Isao	4. 巻 13
2. 論文標題 Novel angular naphthopyrone formation by Arp1p dehydratase involved in <i>Aspergillus fumigatus</i> melanin biosynthesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Microbiology Reports	6. 最初と最後の頁 822 ~ 829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1758-2229.13013	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 Fujii Isao, Hashimoto Makoto, Konishi Kaori, Unezawa Akiko, Sakuraba Haruka, Suzuki Kenta, Tsushima Harue, Iwasaki Miho, Yoshida Satsuki, Kudo Akane, Fujita Rina, Hichiwa Aika, Saito Koharu, Asano Takashi, Uchiyama Masanobu, et al.	4. 巻 59
2. 論文標題 Shimalactone Biosynthesis Involves Spontaneous Double Bicyclo Ring Formation with 8 6 Electrocyclization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 8464 ~ 8470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202001024	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 -
1. 著者名 Hashimoto Makoto, Ichijo Hitomi, Fujiwara Kotaro, Sugawara Hitoshi, Abo Seika, Matsudo Kimihito, Uchiyama Nahoko, Goda Yukihiko, Fujii Isao	4. 巻 29
2. 論文標題 Functional expression of a highly-reducing polyketide synthase of <i>Emericella varicolor</i> IFM42010, an asteltoxin-producing strain, resulted in production of two polyenoic ketolactones with opposite stereochemistry	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 126686 ~ 126686
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.126686	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 -

1. 著者名 Makoto Hashimoto, Hikaru Kato, Ayako Katsuki, Sachiko, Tsukamoto, Isao Fujii	4. 巻 19
2. 論文標題 Identification of the biosynthetic gene cluster for himeic acid A, a ubiquitin-activating enzyme (E1) inhibitor, in <i>Aspergillus japonicus</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 535-539
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201700584	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 Ayako Katsuki, Hikaru Kato, Yuriika Tahara, Makoto Hashimoto, Isao Fujii, Sachiko Tsukamoto	4. 巻 26
2. 論文標題 pH-Dependent production of himeic acid A and its non-enzymatic conversions to himeic acids B and C	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorg. Med. Chem.	6. 最初と最後の頁 1869-1874
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2018.02.034	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 Mio Kawaguchi, Taichi Ohshiro, Masayuki Toyoda, Satoshi Ohte, Junji Inokoshi, Isao Fujii, Hiroshi Tomoda	4. 巻 57
2. 論文標題 Discovery of a Fungal Multicopper Oxidase That Catalyzes the Regioselective Coupling of a Tricyclic Naphthopyranone To Produce Atropisomers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie Int. Edt.	6. 最初と最後の頁 5115-5119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201800415	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

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 齋藤来春、飛知和あいか、小野寺駿太、志賀勇貴、橋元 誠、浅野 孝、藤井 勲
2. 発表標題 シマラクトン生合成遺伝子の酵母異種発現系の構築
3. 学会等名 第58回日本薬学会東北支部大会、仙台
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井 勲
2. 発表標題 糸状菌ポリケタイドの生物合成研究
3. 学会等名 第41回東北薬学セミナー、仙台（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飛知和あいか、齋藤来春、橋元 誠、浅野 孝、藤井 勲
2. 発表標題 シ馬拉クトン生合成遺伝子の酵母異種発現
3. 学会等名 第140年会日本薬学会、京都
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 勝木理子、田原由莉歌、加藤 光、橋元 誠、藤井 勲、塚本佐知子
2. 発表標題 ユビキチン活性化酵素の選択的阻害剤himeic acid AのpH依存的生成とhimeic acids B, Cへの非酵素的変換
3. 学会等名 第60回天然有機化合物討論回
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内藤未早妃、工藤 萌、千葉 環、松川美保、宮 彩子、橋元 誠、林 宏明、藤井 勲
2. 発表標題 <i>Emericella varicolor</i> GF10のメロテルペノイド生合成遺伝子クラスター
3. 学会等名 第138年会日本薬学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋元 誠、安保聖香、松戸公仁、佐藤紀恵、藤井 勲
2. 発表標題 Asteltoxin生産菌 <i>Emicella varicolor</i> IFM42010由来ポリケタイド合成酵素遺伝子の機能解析
3. 学会等名 第56年会日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋元 誠、佐藤紀恵、藤井 勲
2. 発表標題 糸状菌 <i>Emicella varicolor</i> IFM4210のasteltoxin生合成遺伝子
3. 学会等名 第17回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤優哉、南 篤志、熊倉直祐、Gan Pamela、尾崎太郎、劉 成緯、藤井 勲、白須 賢、及川英秋
2. 発表標題 植物病原性糸状菌で見いだされたal ternapyrone生合成遺伝子クラスターの機能解析
3. 学会等名 第17回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤優哉、瀧野純矢、椎名哲也、鵜飼孝大、南篤志、尾崎太郎、劉 成緯、藤井 勲、丸山潤一、及川英秋
2. 発表標題 ゲノム編集技術CRISPR/Cas9を用いた糸状菌天然物の異種生産
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤優哉、瀧野純矢、椎名哲也、鷓飼孝大、南 篤志、尾崎太郎、劉 成偉、藤井 勲、丸山潤一、及川英秋
2. 発表標題 CRISPR/Cas9システムを用いた糸状菌由来天然物の異種生産
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岩手医科大学薬学部天然物化学分野ホームページ http://inpc.iwate-med.ac.jp/iNPC_IMU/HOME.html

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
---------	---------