

令和元年6月20日現在

機関番号：23803
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2017～2018
課題番号：17H07002
研究課題名(和文)イミド含有天然物oxaleimideの生合成機構の解明

研究課題名(英文)Biosynthetic study of oxaleimides

研究代表者

佐藤 道大 (Sato, Michio)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：10629695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、強い細胞毒性活性を有するoxaleimide類の骨格構築機構の解明を目指した。遺伝子ターゲティング法を用いて、生合成に関わる遺伝子の欠損株の作製を行った。デカリン環からインダン環への環縮小反応において、初発のデカリン環二重結合の酸化反応を担う酵素(P450)を同定した。また、末端二重結合およびイミド形成の連続反応に関わる酵素も同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糸状菌*Penicillium oxalicum*が生産するoxaleimide類の骨格構築機構の解明を進めるうえで、P450およびそのパートナータンパク質であるNADPH還元酵素の精製法を確立した。両酵素とも膜貫通型のタンパク質であり、微生物の二次代謝に関わるP450を含む膜タンパク質には興味深い反応を触媒するものが多いが、精製が壁となり分子レベルでの解析が困難であった。本研究で用いた精製法は今後の膜タンパク質の研究の強力なツールとなると言える。

研究成果の概要(英文)：We identified the enzymes which are responsible for two key reactions in the biosynthesis of oxaleimides through gene targeting and in vitro reaction. One of the key reactions is the decalin ring modification to indane ring, and another is a rearrangement of the olefin from the amino acid building block to yield the maleimide scaffold compound. We propose oxidation of the decalin ring at C3, followed by hydroxylation at C2 to give a hydroxy ketone compound, which can undergo a semipinacol rearrangement to afford an indane ring compound. We characterized the enzyme PoxD, which is a member of cytochrome P450 enzymes, can catalyze the oxidation of the olefin at C3 in the decalin ring, and PoxK can hydroxylate the C2 carbon. Furthermore, we identified PoxN is involved in the rearrangement of the olefin from the amino acid. We established the purification method of fungal P450 enzymes, which can be a powerful tool to analyze the complex and intriguing reaction catalyzed by P450 enzymes.

研究分野：天然物化学

キーワード：生合成 ポリケタイド 非リボソームペプチド シトクロームP450

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

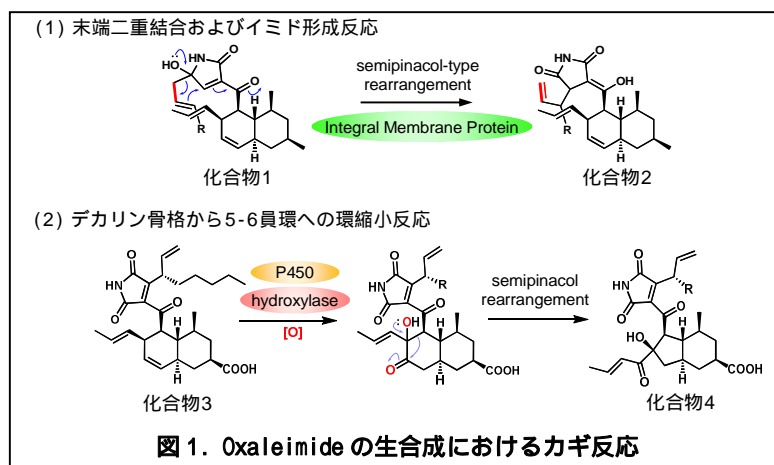
ペニシリウム属糸状菌から抗生物質ペニシリンが発見されたのを皮切りに、多くの微生物や植物などの天然資源から生物活性低分子有機化合物の探索が行われてきた。そのうち、抗菌・抗腫瘍活性などの生物活性を有するものが長らく医薬品もしくはそのシーズとなってきた。しかしながら、あらかたの化合物が取り尽くされた現在では、新規天然物の獲得は困難となっており、研究開発コストのかかる天然物探索研究の規模はアカデミアのみならず製薬会社を中心とした産業界においても縮小している。それでも微生物などの天然資源から作られる多様性に富んだ構造は人智を超えたものであり、天然物探索は新規医薬品の創製において依然重要な役割を担っている(Newman JD, et al, *J. Nat. Prod.* 2016)。問題は、いかに効率よく新規天然物を獲得できるかということである。上述したように天然資源からの新規骨格を有する天然物の探索は、古典的手法では困難であり、異なるアプローチが必要である。

天然物の生産者である微生物のゲノムには、生産される天然物よりもはるかに多くの天然物の生合成遺伝子が存在することが明らかとなっている。大部分の遺伝子は常時発現しているのではなく、休眠しているとされる。この微生物の眠っているポテンシャルを引き出すことで、天然物の獲得が可能となる。加えてゲノム解読技術の飛躍的な向上により、膨大な数の微生物ゲノムが入手可能となっている。これらゲノム情報を用いて休眠生合成遺伝子の覚醒を行った。我々が実際に行ったことは、糸状菌のゲノム情報からこれまでに報告のない配列や組み合わせをもつ二次代謝に関わる遺伝子群を見つけ出し、それを発現させるゲノムマイニング手法である(Medema HM, et al, *Fungal. Genet. Biol.* 2016)。ペニシリウム属真菌ゲノムから、ポリケタイド合成酵素(PKS)およびPKS-非リボソームペプチド合成酵素(NRPS)が隣接した遺伝子クラスター(以下、*pox* クラスターとする)を発見した。このような遺伝子クラスターはこれまでに報告がなく新規化合物の生合成に関わると予想されたため、*pox* クラスターを利用した化合物獲得を試みた。本遺伝子は通常の研究室培養条件下では不活性であったため、転写制御に関わる因子を改変し、その活性化を試みた。その結果、期待通り類縁体を含む9つの新規化合物群(oxaleimide)を得ることに成功した(Sato M, et al *JACS*, 2017)。Oxaleimideは末端二重結合およびマレイミド、もしくはスクシイミド骨格を有する化合物であり、いくつかのoxaleimide類縁体はHela細胞に対し、強い細胞毒性活性を示した。Oxaleimideの類縁体に関しては、これまでに一つしか報告されておらず(Ishii, T et al, *J. Antibiot.* 2000)、作用機序や生合成経路は全く分かっていない。

2. 研究の目的

本研究ではユニークな化学構造を有し、強い細胞毒性を示す新規天然物 oxaleimide の生合成に関わる酵素の機能解析を行う。先述したように Oxaleimide は末端二重結合およびマレイミド、もしくはスクシイミド骨格を有する化合物であり、いくつかの oxaleimide 類縁体は Hela 細胞に対し、強い細胞毒性活性を有する。Oxaleimide の作用機序や生合成経路は全く分かっていない。しかしながら申請者によるこれまでの研究から、本化合物の生合成経路においては、以下の二つの興味深い骨格形成反応が関わっていると推定されている。

- (1) 末端二重結合およびイミド骨格形成反応 (化合物 1 から化合物 2)
- (2) デカリン(6-6員環)から 5-6員環への環縮小反応 (化合物 3 から化合物 4)



3. 研究の方法

化合物 oxaleimide の生産菌である *Penicillium oxalicum* のゲノム中に存在する、化合物の生合成各遺伝子を遺伝子ターゲットングにより欠失させ、上記の反応を担う遺伝子の特定を行う。また、該当する酵素を獲得し試験管内にてその機能を確認する。酵素のメカニズムに関しては、得られたタンパク質を結晶化し、その構造解析から明らかにする。

4. 研究成果

【末端二重結合およびイミド形成反応】

本化合物の骨格は、PKS(ポリケチド合成酵素)-NRPS(非リボソームペプチド合成酵素)ハイブリッド酵素によって構築される。基質となるアミノ酸は、合成アミノ酸および ^{13}C 標識酢酸の取り込み実験から 2-amino-dec-4-enoic acid であることが明らかになっている。このことから、oxaleimide の末端二重結合およびイミド形成は図 1 に示す機構で進行すると考えられた。はじめに遺伝子ターゲティングによる各生合成遺伝子欠損株の作成を行った。次にその変異株培養液の抽出物を LC-MS 解析に供した。図 1 に示す化合物 1 およびその類縁化合物の質量電荷比を指標に探索し、本反応に関わる遺伝子の特定を試みた。しかしながら、化合物 1 に相当する明確なシグナルは得られなかった。一方で、化合物 1 に近い質量電荷比を有する化合物群が多数現れた変異株が得られた。その変異株の該当遺伝子は integral membrane protein (IMP) をコードする遺伝子であった。これは、IMP の欠損株で蓄積するはずの化合物が分解もしくは糸状菌による代謝を受けたことが原因と考えられる。これら類似した化合物は多数見られたものの、生産量が少なく単離・構造決定は困難であった。そのため、酵素の基質になり得る化合物は取得できなかった。今後は各生合成遺伝子の異種発現もしくは有機合成での基質の供給を目指す。また IMP に関しては 4 回膜貫通型のタンパク質であり、大腸菌での発現をやめ出芽酵母での発現を行った。基質化合物の調製を行った後、IMP 発現酵母の無細胞抽出液をタンパク質溶液として用い、試験管内での反応に供す予定である。

【デカリンからインダン環への環縮小反応】

Oxaleimide 類生合成における環縮小反応に関しては、デカリン環の二重結合の酸化、および 2 位の 3 級炭素への水酸基の導入が必要であると考えられている。この反応は、導入された水酸基の酸素原子における非共有電子対からの電子の押し込みを起点としたセミピナコール型の転位反応によって進行すると考えられる。遺伝子欠損株の作製およびその培養液抽出物の解析結果から、デカリン環における二重結合の酸化には、PoxD (P450) の関与が示唆された。また α -ケトグルタル酸依存性酸化酵素である PoxK は、3 級炭素に水酸基を導入する酵素 CmcJ と相同性があることから、デカリン環の 2 位に水酸基を導入すると考えられる。

はじめに PoxD および PoxK の精製を行った。前者はシトクローム P450 に分類される、1 回膜貫通型の酵素である。PoxD は膜貫通型のタンパク質であるため、まず膜貫通領域を欠失させ可溶性タンパク質獲得を試みた。しかしながら大腸菌を宿主として発現させたが、活性型タンパク質は得られなかった。そこで膜貫通領域の N 末端側を改変し界面活性剤を含む可溶性バッファを用いたところ、活性型のタンパク質が得られることが分かった。大量培養し、大腸菌膜画分を回収し、その膜画分を界面活性剤を含む可溶性バッファに懸濁した後、Ni-NTA と結合させアフィニティ精製を行った。続いて陽イオン交換、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーに供し、高純度精製を行った。本酵素を試験管内でのデカリン二重結合の酸化反応に供したところ、基質の酸化反応が確認できたことから、本化合物のデカリン環の酸化に PoxD が関わっていることが明らかとなった。現在、高純度精製した PoxD の結晶化スクリーニングを行っている。

一方 PoxK においては、多量かつ純度の高いタンパク質が得られたため、結晶化を試みた。複数の結晶が得られ、それらを X 線回折装置に供した。しかしこれまでに得られた回折像の分解能は 4 Å までであり、詳細な反応機構を解析するには至っていないため、より高い分解能を示す結晶の作成を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件、すべて査読有り)

1. Twigg F.F., Cai W., Huang W., Liu J., Sato M., Perez T.J., Geng J., Dror M.J., Montanez I., Tong T.L., Lee H., Zhang W. (2019) Identifying the Biosynthetic Gene Cluster for Triacins with an N-Hydroxytriazene Moiety. *ChemBioChem* 20, 1145-1149. DOI: 10.1002/cbic.201800762.
2. Masuya T., Tsunematsu Y., Hirayama Y., Sato M., Noguchi H., Nakazawa T., Watanabe K. (2019) Biosynthesis of lagopodins in mushroom involves a complex network of oxidation reactions. *Org. Biomol. Chem.* 17, 234-239. DOI: 10.1039/c8ob02814a.
3. Ohashi M., Liu F., Hai Y., Chen M., Tang M.C., Yang Z., Sato M., Watanabe K., Houk K.N., Tang Y. (2017) SAM-dependent enzyme-catalysed pericyclic reactions in natural product biosynthesis. *Nature* 549, 502-506. DOI: 10.1038/nature23882.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Sato M., Tang Y., Watanabe K. (2018) Expanding the Scope of Biosynthetic Cooperativity Between Polyketide Megasyntases Through Genome Mining. (30th International Symposium on the Chemistry of Natural Products and the 10th International Congress on Biodiversity (ISCN30 & ICB10)).

2. 横山 葵, 佐藤 道大, 前田 直哉, 恒松 雄太, 原 幸大, 橋本 博, 渡辺 賢二. (2018) 酵素-生成物複合体を用いた CghA の立体選択的反応機構の解明. 日本生薬学会第 65 回年会 (広島)
3. 佐藤 道大, Dander E.J., Garg K.N., Tang Y., 渡辺 賢二. (2017) 糸状菌ポリケタイド合成酵素によるイミド含有天然物の生合成. 第 59 回天然有機化合物討論会.

4.

〔図書〕(計 件)

〔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:

国内外の別:

取得状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://swab.u-shizuoka-ken.ac.jp/~kenji55-lab/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号 (8 桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名: