

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：平成20年度～平成22年度

課題番号：20241049

研究課題名(和文) 生合成系の融合による分子多様性の拡大

研究課題名(英文) Diversification of Molecular Structures by Merger of Biosynthetic Pathways

研究代表者

海老塚 豊 (EBIZUKA YUTAKA)

国立医薬品食品衛生研究所・生薬部・客員研究員

研究者番号：90107384

研究成果の概要(和文)：糸状菌ゲノムデータベースを対象に、ポリケタイド合成酵素およびプレニル基転移酵素の共存する遺伝子クラスターを検索することで、2種のメロテルペノイド生合成遺伝子クラスターを見だし、各酵素遺伝子を異種糸状菌で発現することにより機能同定した。これらの酵素はいずれも既知生合成酵素とは反応性、特異性を異にする新規な酵素であり、天然物の構造多様性拡大への貢献が期待される。また、異種糸状菌での共発現によるメロテルペノイド生合成系の再構築に成功し、さらに、非生理的基質を出発基質とすることで非天然型新規メロテルペノイドの生成に成功した。

研究成果の概要(英文)：By searching for gene-clusters that contain both putative PKS and PT in public gene database of filamentous fungi, two meroterpenoid gene clusters have been found and identified for the first time. All PKSs, PTs and CYCs found in this study show novel reactivity and specificity, and thus are expected to contribute for construction of structural diversity in a combinatorial fashion. Heterologous expression of the enzyme genes reconstituted a meroterpenoid biosynthesis. Further, a substrate directed biosynthesis afforded a non-natural meroterpenoid.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	15,100,000	4,530,000	19,630,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	23,300,000	6,990,000	30,290,000

研究分野：天然物化学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：生合成、メロテルペノイド、遺伝子クラスター、糸状菌、ポリケタイド合成酵素、テルペン環化酵素、ピリピロペン、テレットニン

## 1. 研究開始当初の背景

(1)ヒトをはじめとする多くの生物種のゲノム解析により、難治性疾患や新興感染症などの原因遺伝子・創薬標的タンパクが次々と発見・同定されてきているが、実際にこれら疾

病の治療や予防に用いられる医薬品の開発には、医薬品候補となる物質そのものの多様性を如何にして創出するかが鍵となることは自明である。期待された combinatorial chemistry では、医薬品リードに求められる

構造多様性が必ずしも十分に得られず、多様な化学構造と多彩な生物活性を示す天然有機化合物（いわゆる天然物）が、合成化合物ライブラリーを凌ぐ創薬資源ケミカルプールとして再認識されてきている。しかし、従来型の化学的、また生物活性スクリーニングによる探索研究では新規骨格の天然物を見いだす可能性は極端に低下してきている。一方、天然物生合成の酵素・遺伝子レベルでの研究は、従来型の探索法に代わる新規天然物ライブラリーの構築や有用標的天然物の選択的生産系の開発をも可能にするものとして大きな期待を集めている。

(2)このような観点から、研究代表者のグループでは、天然物の構造多様性をもたらす生合成酵素として、各種トリテルペン合成酵素およびポリケタイド合成酵素の構造機能研究を展開し、世界をリードする数々の研究成果を挙げてきた。これらの酵素群は、それぞれ膨大な構造多様性をもたらすものであるが、これらテルペン系とポリケタイド系生合成経路の融合により生産される天然物メロテルペノイドを標的とし、生合成酵素の機能構造解析の成果を基盤とすることで天然物分子構造多様性の飛躍的な拡大を図ることができる。

## 2. 研究の目的

分子内にテルペン構造とポリケタイド構造を併せ持つ天然物はメロテルペノイドと総称され、単純なテルペノイドやポリケタイドに比較し、その構造は格段の多様性を有しており、ユニークな生物活性を示すものが多数報告されている。単純なプレニルフェノール類を除けば、これらメロテルペノイド化合物の遺伝子・酵素レベルでの生合成研究はほとんど例がなく未開拓の分野である。高等植物では、天然物生合成に関与する遺伝子がゲノム上に分散して存在するのに対し、微生物においては、一種の天然物の生合成に関与する一連の酵素遺伝子がゲノム上にクラスターを形成していることが良く知られている。本研究ではこの点に着目し、研究対象を糸状菌の生産するメロテルペノイドに絞って検討する。このような生合成クラスターが得られ、構成酵素遺伝子産物の構造および機能についての分子論的理解が得られれば、タンパク工学的、また遺伝子工学的的手法により、非天然型を含む多様なメロテルペノイド化合物の創出が可能となる。そこで、本研究ではまず、

(1) 近年全ゲノム配列が明らかにされた *Aspergillus* 属糸状菌のゲノムデータベース情報を最大限に活用し、特徴的な構造とユニークな生物活性から注目されているメロテルペノイド化合物、ピリピロペンおよびテレットニンの生合成遺伝子クラスターをクローニングする。ピリピロペン A は Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase の選択的かつ

強力な阻害剤であり、スタチン系薬剤に代わる脂質代謝異常症治療薬として開発が期待されている化合物であり、テレットニン類は高頻度で検出されるマイコトキシンである。

次いで、

(2) メロテルペノイド生合成の鍵酵素となるポリケタイド合成酵素 (PKS)、プレニル基転移酵素 (PT) 及びテルペン部分の環化酵素 (CYC) を中心にそれぞれのクラスターを構成する生合成酵素の機能を異種生物種における発現により同定する。

(3) これら酵素の示す基質・生成物特異性がメロテルペノイド分子多様性の最も重要な起源となることから、基質および生成物特異性を詳細に解析する。非生理的基質や合成基質類縁体の適用<sup>2</sup>により、潜在酵素機能を最大限に引きだし分子多様性の拡大を計る。

以上を総合し、新機能物質探索源となる人工メロテルペノイドライブラリーの構築、および実用的な標的メロテルペノイド化合物生産系開発、の可能性を検証する

## 3. 研究の方法

(1) 公開された *A. fumigatus* および *A. terreus* の全ゲノム配列データベース中にそれぞれピリピロペンおよびテレットニン生合成遺伝子クラスターを検索する。

ピリピロペンの生合成には、ピリジン環を有するニコチン酸-CoA をスターター基質とし、2 分子のマロニル-CoA を縮合してピロン環（ポリケタイド部）を形成するポリケタイド合成酵素 (PKS) と、炭素数 15 から成るファルネシル基（テルペン部）を PKS 産物に転移するプレニル基転移酵素 (PT) の存在が必須である。その後、テルペン部分が環化した後、水酸化、アシル基転移等の修飾を受けて最終産物が生成する。ニコチン酸由来の CoA 体をスターター基質とするポリケタイド合成酵素 (PKS) はこれまでに報告がなく、このスターター基質がいかんして供給されるかと併せ注目される。ピリピロペン生合成遺伝子クラスターの探索では、テルペン部分の生合成が鍵となるが *A. fumigatus* ゲノムデータベースに、既知の PT および PKS の相同遺伝子が共存するクラスターを検索し、更にその中から、酸化酵素やアシル基転移酵素などピリピロペンの構造との関連を予想させる酵素遺伝子の存在するクラスターに絞り込む。

テレットニン生合成クラスターについても同様に、*A. terreus* ゲノムデータベース中に、既知の PT および PKS の相同遺伝子が共存するクラスターを検索する。更にその中から、数種の酸化酵素およびカルボン酸のメチル化に関わる O-メチル基転移酵素の共存するクラスターに絞り込む。

(2) 得られた候補生合成遺伝子クラスター内の各酵素遺伝子を異種生物に導入発現し、コ

ードされるタンパクの酵素機能を同定する。

(3) 得られた PKS, PT, その他クラスター構成酵素の入れ替え、あるいは非生理的な出発基質の投与などの方法により、天然には存在しない「非天然型メロテルペノイド」の作成を試みる。

#### 4. 研究成果

(1) 公開されている *A. fumigatus* Af293 株および *A. terreus* NIH2624 株のゲノムデータベース中に、PKS と PT の共存する遺伝子クラスターを検索した。さらに投与実験の結果から推定されている酸化酵素、メチル基転移酵素、アシル化酵素等、修飾酵素群が存在することを指標に絞り込みを行い、ピリピロペン A およびテトレニン生合成の候補となる遺伝子クラスターを見いだした。これらのクラスターは、既知のテルペン環化酵素の相同遺伝子を含まないことを除けば、それぞれピリピロペン A (9 遺伝子, *pyr*) およびテトレニン (14 遺伝子, *trt*) 生合成遺伝子クラスターとして矛盾のないものであった。

(2) *pyr*-クラスター中には酸化酵素に加え、CoA ligase (CL) と思われる遺伝子も存在し、ピリピロペンに特徴的なニコチン酸由来の CoA 体の生成に関与しているものと推測された。そこで、本クラスター中の CL (*pyr1*) と PKS (*pyr2*) 遺伝子を *A. oryzae* M-2-3 株を用いた異種糸状菌発現系にて共発現し、ニコチン酸を基質としてピリピロペン生合成中間体であるピロン体 4-hydroxy-6-(3-pyridinyl)-2H-pyran-2-one (HPP0) を生成することを明らかにした。次いで、同じ発現系を用いて CL, PKS ならびに PT (*pyr6*) の 3 遺伝子共発現を試みた。その結果、これら遺伝子を導入した *A. oryzae* 形質転換株において HPP0 にファルネシル基の付加した farnesyl-HPP0 が生成することを明らかにした。さらに、PT, FMO 共発現体を作製し培地に PT の基質となるピロン体を投与したところ、ジヒドロキシ体が得られた。この結果は、末端二重結合のエポキシ体は生成しているものの、環化酵素の非存在下ではホスト由来の酵素により加水分解されるものと予想した。環化酵素の候補として、*pyr*-, *trt*-両クラスターに共通して存在している”integral membrane protein”とアノテーションされている遺伝子 *pyr4* が存在している。そこで、Pyr4 の機能を解析するため、PT, FMO, Pyr4 の 3 遺伝子共発現体を構築した。培地にピロン体を投与し、*pyr4* 特異的な生産物の分析を行ったところ、環化産物の生産が確認された。また Pyr4 が単独で環化酵素として機能することを証明するため、化学的に調製したエポキシ体を *pyr4* 導入株のミクロソーム画分と反応させ、*in vitro* で環化活性を確認した。Pyr4 はテルペノイドの環化を触媒する新規環化酵素である。

(3) *trt*-クラスターのテトレニン生合成への関与を確認するため、まず *trt4* のコードする PKS の形質転換株が予想生合成中間体である 2,4-dihydroxy-3,5,6-trimethylbenzoic acid (DTBA) を生成することを明らかにした。次いで、PKS および PT (*trt2*) 両遺伝子を共発現し、DTBA にファルネシル基の付加した farnesyl-DTBA が生成することを明らかにした。本反応は、6 位炭素上に置換反応ではなく付加反応でファルネシル基を転移し、芳香環の崩れた化合物を与える大変興味深い反応である。さらに、フラビン要求性モノオキシゲナーゼ (FMO) をプレニル基転移酵素と共発現し 2,4-dihydroxy-3,5,6-trimethylbenzoic acid を投与したところ、epoxyfarnesyl 化された生成物を単一のジアステレオマーとして確認した。以上の結果から *trt*-クラスターがテトレニン生合成遺伝子クラスターであるものと結論した。

(4) *A. fumigatus* の *pyr*-クラスター中に見いだした膜結合型新規テルペン環化酵素 Pyr4 には、既知テルペン環化酵素に見られる酸性アミノ酸残基からなる活性モチーフ (DXDXXD, DCTAE 等) が見られない。そこで、Pyr4 のホモログに共通して存在する酸性アミノ酸残基である Glu63 あるいは Asp218 の変異体を作成したところ、これらの変異体はいずれも環化活性を失ったことから、これら酸性アミノ酸残基が協同的に働き基質のエポキシ環をプロトンーションすることで環化反応を開始することを明らかにした。

(5) ピリピロペン生合成酵素遺伝子群を用いて、構造類縁体の創製を試みた。ニコチン酸の代わりに安息香酸を出発基質とし、異種糸状菌 *A. oryzae* で発現したピリピロペン生合成の 5 段階の酵素群と反応させ、ピリジン環がベンゼン環に置換されたピリピロペン類縁体の生成に成功した。この類縁体は天然ピリピロペン類に共通の基本構造を有しており、さらに酸化酵素、アシル化酵素と組み合わせることで反応することにより多様なピリピロペン類縁体の生産が可能である。

(6) 生合成系の融合による分子多様性のさらなる拡大を図るため、糸状菌由来新規 I 型 PKS 1 種 (Solanapyrone Synthase from *Altenaria solani*) および III 型 PKS 2 種 (CsyA, CsyB from *A. oryzae*) をクローニングし、異種発現タンパクを用いた機能同定に成功した。また、糸状菌由来では初のトリテルペン環化酵素として *A. fumigatus* のプロトスタジエノール合成酵素をクローニングし、本酵素のモデル構造からデザインした変異体を作成することによりラノステロール合成酵素への機能変換にも成功した。また、構造多様性拡大の観点からの関連研究として、PKS-NRPS ハイブリッド天然物のモデルとなる *A. flavus* におけるシクロピアゾン酸生合成酵素の機能同定も行った。

本研究で見出した *pyr*-, *trt*-遺伝子クラスターはメロテルペノイド生合成遺伝子クラスターとして初めて同定されたものである。またこれらのクラスター中に存在する PKS, PT, FMO, CYC 等の生合成酵素は、既知生合成酵素には見られない反応性や特異性を示す全く新規なものであり、さらに詳細な構造機能解析を進めることで、天然物の構造多様性の構築に大きく貢献することが期待される。本研究で対象とした *A. fumigatus* や *A. terreus* 以外にも既に 30 種を超える糸状菌の全ゲノム配列が明らかにされている。これらの中にはメロテルペノイド生合成に関わると推定される遺伝子クラスターが多種存在する。本研究の成果を踏まえ、これら遺伝子クラスターの機能解析を推進することで、糸状菌由来天然物を基盤とする生物活性有用物質プールの構造多様性を飛躍的に拡大することが期待できる。

#### 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 7 件)

- ① T. Itoh, K. Tokunaga, Y. Matsuda, I. Fujii, I. Abe, Y. Ebizuka, T. Kushiro, Reconstitution of a Fungal Meroterpenoid Biosynthesis Reveals the Involvement of a Novel Family of Terpene Cyclases, *Nature Chemistry* (査読あり), **2**, 858-864, 2010.
- ② Y. Seshime, P. R. Juvvadi, K. Kitamoto, Y. Ebizuka, I. Fujii., *Aspergillus oryzae* Type-III Polyketide Synthase CsyA is Involved in the Biosynthesis of 3,5-Dihydroxybenzoic Acid, *Bioorg. Med. Chem.* (査読あり), **20**, 4784-4788, 2010.
- ③ K. Kasahara, T. Miyamoto, T. Fujimoto, H. Oguri, T. Tokiwano, H. Oikawa, Y. Ebizuka, I. Fujii, Solanapyrone Synthase, a Possible Diels-Alderase and Iterative Type-I Polyketide Synthase Encoded in a Biosynthetic Gene Cluster from *Altenaria solani*, *ChemBioChem.* (査読あり), **11**, 1245-1252, 2010.
- ④ Y. Seshime, P. R. Juvvadi, K. Kitamoto,

Y. Ebizuka, I. Fujii., Identification of Csypyrone B1 as the Novel Product of *Aspergillus oryzae* Type-III Polyketide Synthase CsyB, *Bioorg. Med. Chem.* (査読あり), **18**, 4542-4546, 2010.

⑤ M. Kimura, T. Kushiro, M. Shibuya, Y. Ebizuka, I. Abe, Protostadienol Synthase from *Aspergillus fumigatus*: Functional Conversion into Lanosterol Synthase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読あり), **391**, 899-902, 2010.

⑥ Y. Seshime, P. R. Juvvadi, M. Tokuoka, Y. Koyama, K. Kitamoto, Y. Ebizuka, I. Fujii. Functional Expression of the *Aspergillus flavus* PKS-NRPS Hybrid CpaA Involved in the Biosynthesis of Cyclopiazonic Acid, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (査読あり), **19**, 3288-3292, 2009.

⑦ H. Mitsuguchi, Y. Seshime, I. Fujii, M. Shibuya, Y. Ebizuka, T. Kushiro, Biosynthesis of Steroidal Antibiotic Fusidanes: Functional Analysis of Oxidosqualene Cyclase and Subsequent Tailoring Enzymes from *Aspergillus fumigatus*, *J. Am. Chem. Soc.* (査読あり), **131**, 6402-6411, 2009.

[学会発表] (計 22 件)

- ① 下川良彦、鱈淵清史、松村真里、森田洋行、阿部郁朗、メロテルペノイド生合成に関わる Pyr1 酵素の構造機能解析、日本薬学会第 131 年会、2010. 3. 29. 静岡。
- ② 阿部郁朗、二次代謝酵素の潜在的触媒能力と機能制御文部科学省科学研究費補助金「新学術領域研究」生合成マシナリー第 1 回公開シンポジウム、2011. 1. 8. 東京。
- ③ T. Kushiro, Reconstituted Biosynthesis of Meroterpenoid in Fungi, International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM2010), 2010. 12. 16., Hawaii, USA.
- ④ I. Abe, Engineering of Plant Polyketide Synthases, International Chemical Congress of Pacific Basin Societies

(PACIFICHEM 2010), 2010.12.15., Hawaii, USA.

⑤I. Abe, Engineering Natural Products Biosynthesis, 9th NRCT-JSPS Joint Seminar, 2010.12.9., Bangkok, Thailand.

⑥阿部郁朗、植物二次代謝酵素の潜在的触媒能力と機能拡張、第47回植物化学シンポジウム、2010.11.18., 静岡。

⑦I. Abe, Engineering Natural Products Biosynthesis, 25th Symposium on Natural Products, 2010.11.5., Kaoshung, Taiwan.

⑧松田侑大、徳永欽也、藤井勲、久城哲夫、海老塚豊、阿部郁朗、糸状菌由来メロテルペノイド生合成に関わる新規膜結合性テルペン環化酵素の構造機能解析、日本薬学会第130年会、2010, 3, 28, 岡山。

⑨徳永欽也、伊藤崇敬、藤井勲、久城哲夫、海老塚豊、阿部郁朗、糸状菌由来メロテルペノイド生合成に関わるプレニル基転移酵素の構造機能解析、日本薬学会第130年会、2010, 3, 28, 岡山。

⑩伊藤崇敬、藤井勲、久城哲夫、海老塚豊、阿部郁朗、糸状菌由来メロテルペノイド生合成遺伝子を活用した創薬へのアプローチ、第28回メディシナルケミストリーシンポジウム、2009.11.25., 東京。

⑪松田侑大、徳永欽也、藤井勲、久城哲夫、海老塚豊、阿部郁朗、メロテルペノイド生合成に関わる新規膜結合性テルペン環化酵素の構造機能解析、第9回糸状菌分子生物学コンファレンス、2009.11.18., 東京。

⑫徳永欽也、伊藤崇敬、藤井勲、久城哲夫、海老塚豊、阿部郁朗、*Aspergillus fumigatus* 由来メロテルペノイド生合成遺伝子クラスターを用いた非天然型新規ハイブリッド型化合物の創製、第9回糸状菌分子生物学コンファレンス、2009.11.18., 東京。

⑬伊藤崇敬、藤井勲、海老塚豊、久城哲夫、糸状菌由来メロテルペノイド化合物 pyripyropene A の生合成研究、第51回天然有機化合物討論会、2009.10.7., 名古屋。

⑭松田侑大、徳永欽也、藤井勲、久城哲夫、海老塚豊、阿部郁朗、メロテルペノイド生合成に関わる新規膜結合性テルペン環化酵素の構造機能解析、日本生薬学会第56回年会、2009.10.3., 京都。

⑮徳永欽也、伊藤崇敬、藤井勲、久城哲夫、海老塚豊、阿部郁朗、メロテルペノイド生合成遺伝子クラスターを用いた非天然型新規ハイブリッド型化合物の創製、日本生薬学会第56回年会、2009.10.3., 京都。

⑯久城哲夫、海老塚豊、糸状菌メロテルペノイド骨格合成酵素の機能解析、日本化学会第89春期年会シンポジウム、生合成工学-酵素を駆使した生物活性天然物の創製を目指して、2009.3.27., 千葉。

⑰伊藤崇敬、勢ノ康代、藤井勲、久城哲夫、海老塚豊、糸状菌由来メロテルペノイド化合物の生合成研究(3)

pyripyropene A 生合成におけるテルペノイド部分の環化に関与する酵素の機能解析、日本薬学会第129回年会、2009.3.26., 京都。

⑱T. Kushiro, T. Itoh, Y. Seshime, I. Fujii, Y. Ebizuka, Biosynthesis of Fungal Meroterpenoids: A Rich Source of Promising Drug Candidates, The 8th NRCT-JSPS Joint Seminar: Innovative Research in Natural Products for Sustainable Development, 2009.2.3., Bangkok, Thailand.

⑲伊藤崇敬、勢ノ康代、藤井勲、久城哲夫、海老塚豊、糸状菌由来メロテルペノイド化合物ピリピロペン A の生合成研究、第17回天然薬物の開発と応用シンポジウム、2008.11.14., 福岡。

⑳T. Kushiro, T. Itoh, Y. Seshime, I. Fujii, Y. Ebizuka, Reconstituted Biosynthesis of Meroterpenoid in Fungi, The 22nd Naito Conference on Chemical Biology [I], 2008.9.10. 札幌。

㉑T. Kushiro, Functional Analysis of Fungal Meroterpenoid Gene Cluster, 7th US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products, 2008.6.26., San Diego, USA.

㉒T. Itoh, Y. Seshime, I. Fujii, T. Kushiro, Y. Ebizuka, Reconstituted Biosynthesis of Meroterpenoid in Fungi, 2008.6.26., San Diego, USA.

〔図書〕(計1件)

①海老塚豊、久城哲夫、日本化学会、糸状菌メロテルペノイド骨格合成酵素の機能解析、第二次先端ウォッチング：融合領域の創成生合成工学、11-15, 2009.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

海老塚 豊 (EBIZUKA YUTAKA)

国立医薬品食品衛生研究所・生薬部・客員  
研究員

研究者番号：90107384

### (2) 研究分担者

渋谷 雅明 (SHIBUYA MASAOKI)

新潟薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50170923

久城 哲夫 (KUSHIRO TETSUO)

明治大学・農学部・准教授

研究者番号：80373299

阿部 郁朗 (ABE IKUROU)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授  
研究者番号：40305496