

機関番号 : 10101
研究種目 : 基盤研究 (B)
研究期間 : 2008~2010
課題番号 : 20310126
研究課題名 (和文) モジュラー型酵素の機能解析とそれを応用した抗腫瘍性物質生産法の開発
研究課題名 (英文) Functional analysis of modular enzymes and its application to the synthesis of antitumor agents
研究代表者 及川 英秋 (OIKAWA HIDEAKI) 北海道大学・大学院理学研究院・教授 研究者番号 : 00185175

研究成果の概要 (和文) : 抗腫瘍性物質サフラマイシン合成で最も重要な骨格合成酵素 SfmC に標的を絞り、その酵素活性の検出を試みた。長鎖アシル基を有するジペプチド CoA 誘導体およびチロシン誘導体を基質として、ATP および NADPH を補酵素として添加する条件下反応を行ったところ、望む 5 環性環化生成物が得られた。その詳細な反応機構を解析した結果、本酵素 SfmC は、3 回の還元反応、2 回の炭素炭素結合反応 (Pictet-Spengler 反応) を含む 7 段階の反応を触媒する興味深い酵素であることがわかった。

研究成果の概要 (英文) : Non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) promotes condensations of amino acids forming amide linkages, with some modifications. We found that a single NRPS SfmC of the potent antitumor agents saframycin catalyzes a seven-step transformation from readily synthesized dipeptidyl substrates with long acyl chains into a pentacyclic tetrahydroisoquinoline scaffold. Based on deletion mutant analyses, we proposed the detailed mechanism involving the reductions of various peptidyl thioesters by an identical R-domain followed by the C-domain-mediated Pictet-Spengler reactions in an iterative manner.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
2009 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野 : 生物分子科学

科研費の分科・細目 : 生物分子科学

キーワード : 生理活性、酵素反応、微生物、生合成、有機化学

1. 研究開始当初の背景

生物は常温常圧下、強酸、強塩基の助けを借りずに、驚く程単純な方法論で天然物の複雑な構造を作り上げることができる。現状では有機合成による大量供給は天然物の構造が複雑になればなるほど困難になることから、高い分子認識能を有するため保護・脱保

護あるいは官能基変換の繰り返しを必要としない酵素を用いた合成法の利点は大きい。

抗生物質、抗がん剤、酵素阻害物質として利用される天然物の生合成遺伝子に関する解析が最近急速に進んできた。ここ十年間の二次代謝産物生合成研究における目覚ましい進展により、ひと昔前までは天然物を合成

するといえば 100%化学合成を指していたが、ポリケチド合成酵素 (PKS) やポリペプチド合成酵素 (NRPS) といった生合成酵素を用いた合成も十分可能性のある方法論になってきた。

異種生物由来の遺伝子に大腸菌での発現に必要な配列を付加する一般的な手法 (発現カセット法) を開発し、複数遺伝子の導入が可能で各遺伝子が安定に発現するベクターを構築した。本手法を用いて抗腫瘍性物質エキノマイシンの生合成に必要な全長約 35 kb の 16 個の遺伝子が大腸菌に導入し、この菌を用いてエキノマイシンを生産することに成功した (H. Oikawa et al., *Nature Chem. Biol.*, 2006, 2, 423)。これは培養法の確立した大腸菌を用いて通常の培地成分のみから生理活性物質を生産した世界で最初の例である。残念ながら上述の手法による薬剤生産はまだ一例のみであり、有用性を確立するためには他の物質の生産に適用可能であることを示す必要がある。

2. 研究の目的

今回取り上げる NRPS は縮合に必要な 3+ α 個の触媒基本単位をアミノ酸の縮合回数だけ持つモジュラー型酵素であり、アミノ酸の識別に関与する A ドメインやペプチド鎖修飾に関わるドメインを入れ替えることにより、様々な有用ペプチド系天然物が合成可能になるはずである。大腸菌による様々な生物由来の異種タンパク発現の有用性は確立されていたものの、複数の酵素を同時に発現させての有用物質生産は困難であった。そこで最近我々が開発した発現カセット法を用いて、臨床試験で有望視されているながらホヤから微量しか単離されない抗腫瘍性物質 ecteinascidin の大量供給を目的とする。標的とする ecteinascidin の生合成遺伝子は同定されておらず、その代わりとして類似の骨格を持つ抗ガン剤 saframycin の生合成遺伝子を利用し、ecteinascidin に容易に変換可能な合成中間体が大腸菌で生産させる。

3. 研究の方法

Saframycin と構造が類似する safracin の生合成遺伝子群は、データベースから入手可能であり、人工合成により必要遺伝子は調達する。既に我々は cyanocycline の生合成遺伝子群を取得したが、saframycin の生合成遺伝子群の情報是一部しか得られないため、生産菌のゲノムライブラリーから、目的遺伝子群を特定する。こうして得られた 3 種の物質由来の NRPS は分子量が 7-16 万と比較的大きなタンパクであるが、すべてを発現させ、*in vitro* で酵素活性を検出するとともに、酵素反応により生合成中間体を合成する。既に我々は分子量 34 万と巨大な echinomycin

NRPS 遺伝子を発現させており、その経験を生かせば、発現は十分可能だと考えている。

様々な合成前駆体 (ジ-、トリペプチド SNAC 体) を用いた酵素反応を行ない、基質特異性を調べる。また saframycin 生合成に関与する NRPS は酵素反応としてはあまり例のない Pictet-Spengler 型反応による環化反応が複数回使われている。最後のモジュールに存在する R ドメインが、ペプチド鎖の還元的切り出し、環形成反応を行っているとは推定されるが、この多段階反応はどのように進行するのかに関し、この酵素の反応機構を速度論解析、補因子の有無、合成基質の変換能などについて詳細に調べる。

この特異な多段階反応の妥当性を検証するために、生合成中間体のアナログを使って、アミドカルボニル基の還元、脱水によるイミンの形成、引き続き Pictet-Spengler 型反応など生合成類似の反応を行なう。Saframycin にはチロシン由来の異常アミノ酸が存在するが、その供給に必要とされる 3 種の遺伝子を一つのプラスミドに導入して、大腸菌で発現させる。またこのアミノ酸は有機合成的にも適当な不斉補助基を用いて合成する。

In vitro の解析結果を踏まえ、我々が開発した”発現カセット法”を利用して、骨格合成に関わる 2 あるいは 3 種の NRPS 遺伝子を一つのベクターに、もう一つのベクターには原料となるチロシン誘導体生合成遺伝子のほか T ドメインに必須な phosphopantetheinyl 基を導入する Sfp 遺伝子など組み込む。これら生合成遺伝子発現用プラスミドで形質転換した大腸菌を培養して物質生産を行なう。これ以前の検討は、LC-MS を用いて化合物を同定することになるが、発現条件、細胞密度を最適化した後、培養液から生成物を単離して、その構造を確認する。

4. 研究成果

抗腫瘍性物質サフラマイシン生合成で最も重要な骨格合成酵素 SfmC に標的を絞り、その酵素活性の検出を試みた。長鎖アシル基を有するジペプチド CoA 誘導体およびチロシン誘導体を基質として、ATP および NADPH を補酵素として添加する条件下反応を行ったところ、望む 5 環性環化生成物が得られた。その詳細な反応機構を解析した結果、本酵素 SfmC は、3 回の還元反応、2 回の炭素炭素結合反応 (Pictet-Spengler 反応) を含む 7 段階の反応を触媒する興味深い酵素であることがわかった。さらにアシル基部分の鎖長が、反応速度に劇的な影響を与えることも明らかにした。本変換反応で最も興味深い Pictet-Spengler 反応を触媒するドメインを特定するため、調製した複数の変異酵素を用

いて、単一触媒回転実験を行ったところ、本来ペプチド結合形成を触媒するCドメインが、還元 (R) ドメインによって生じたアルデヒドとアミノ酸 (チロシン誘導体) の間でイミン形成後、生じたイミンとフェノールの隣接炭素の間で結合形成を触媒することを明らかにした。本研究では、ペプチド合成酵素 (NRPS) の新規機能を発見したのみならず、サブライシンと同一の骨格を有する臨床用抗ガン剤の酵素合成に適用可能な重要な変換反応を見出した。

またアシル基の鎖長を C2 から C16 まで変えたジペプチド CoA 誘導体およびチロシン誘導体を基質として反応を行ったところ、C14 以上の鎖長有する場合のみ望む 5 環性環化生成物を与えた。次いで重水素標識した NADPH を用いて還元で使用される水素を調べたところ、4S 側水素が特異的に利用されることがわかった。さらに補酵素を NADH および NADPH をとして濃度を変化させて行ったところ、望む環化生成物は低濃度では NADPH、高濃度では NADH を用いた場合良好な結果が得られた。これにより比較的大量の生成物を得て、その解析から構造を確定することができた。CoA 誘導体からアルデヒドへと基質を替えた場合、鎖長依存性が低下し、収量も大きく向上することが判った。本研究全体を通し、ペプチド合成酵素 (NRPS) におけるペプチド鎖の切り出しを行う還元ドメインおよび縮合ドメインに関する新規機能を見出した。

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 15 件)

- ① Y. Hirose, K. Watanabe, A. Minami, T. Nakamura, H. Oguri and H. Oikawa "Involvement of Common Intermediate 3-Hydroxy-L-Kynurenine in Chromophore Biosynthesis of Quinomycin Family Antibiotics." *J. Antibiot.*, 査読有, Vol.64, No.1, 2011, 117-122
- ② K. Koketsu, K. Watanabe, H. Suda, H. Oguri and H. Oikawa "Reconstruction of the Saframycin Core Scaffold Defines Dual Pictet-Spengler Mechanisms." *Nat. Chem. Biol.*, 査読有, Vol.6, No.6, 2010, 408-410
- ③ K. Kasahara, T. Miyamoto, T. Fujimoto, H. Oguri, T. Tokiwano, H. Oikawa, Y. Ebizuka and I. Fujii "Solanapyrone Synthase, a Possible Diels-Alderase, and Iterative Type I Polyketide Synthase Encoded in a Biosynthetic Gene Cluster from *Alternaria Solani*." *ChemBioChem*, 査読有, Vol. 11, No.9, 2010, 1245-1252
- ④ Koketsu, H., Watanabe, K., Suda, H., Oguri, H. and Oikawa, H. "Reconstruction of the saframycin core scaffold defines dual Pictet-Spengler mechanisms." *Nat. Chem. Biol.*, 査読有, Vol.6, 2010, 408-410
- ⑤ Watanabe, K., Oguri, H. and Oikawa, H. "Diversification of echinomycin molecular structure by way of chemoenzymatic synthesis and heterologous expression of the engineered echinomycin biosynthetic pathway" *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 査読有, Vol.13, 2009, 189-196
- ⑥ Watanabe, K., (5 persons), Oikawa, H. "Rationally Engineered Total Biosynthesis of a Synthetic Analogue of a Natural Quinomycin Depsipeptide in *Escherichia coli*." *ChemBioChem*, 査読有, Vol.10, 2009, 1965-1968
- ⑦ Watanabe, K., (8 persons), Oikawa, H. "Escherichia coli Allows Efficient Modular Incorporation of Newly Isolated Quinomycin Biosynthetic Enzyme into Echinomycin Biosynthetic Pathway for Rational Design and Synthesis of Potent Antibiotic Unnatural Natural Product" *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有, Vol.131, 2009, 9347-9353
- ⑧ Watanabe, K., Oguri, H. and Oikawa, H. "Enzymatic synthesis of molecular skeletons of complex antitumor antibiotics with non-ribosomal peptide synthetases" *J. Synth. Org. Chem., Jpn.*, 査読有, Vol. 67, 2009, 1152-1160
- ⑨ A. P. Praseuth, M. B. Praseuth, H. Oguri, H. Oikawa, K. Watanabe, and C. C. Wang. "Improved production of triostin A in engineered *Escherichia coli* with furnished quinoxaline chromophore by design of experiments in small-scale culture" *Biotechnology Progress*, 査読有, Vol. 24, No.1, 2008, 134-139
- ⑩ K. Koketsu, H. Oguri, K. Watanabe, and Oikawa, H. "Enzymatic macrolactonization in the presence of DNA leading to triostin A analogs" *Chem. Biol.*, 査読有, Vol. 15, No.1, 2008, 818-828
- ⑪ Y. Shichijo, A. Migita, H. Oguri, M. Watanabe, T. Tokiwano, K. Watanabe, and H. Oikawa, "Epoxide hydrolase

Lsd19 for polyether formation in the biosynthesis of Lasalocid A: Direct experimental evidence on polyene-polyepoxide hypothesis in polyether biosynthesis" J. Am. Chem. Soc., Vol. 130, No.1, 査読有, 2008, 12230-12231

- ⑫ T. Tokiwano, H. Watanabe, T. Seo, and H. Oikawa, "Unprecedented biological cyclopropanation in the biosynthesis of FR-900848" Chem. Commun., No.1, 査読有, 2008, 6016-6018
- ⑬ A. Migita, M. Watanabe, Y. Hirose, K. Watanabe, T. Tokiwano, H. Kinashi, and H. Oikawa, "Identification of a gene cluster of polyether antibiotic lasalocid from *Streptomyces lasaliensis*" Biosci. Biotechnol. Biochem Vol.73, No.1, 査読有, 2009, 169-176
- ⑭ Watanabe, K., Oguri, H. and Oikawa, H. "Diversification of echinomycin molecular structure by way of chemoenzymatic synthesis and heterologous expression of the engineered echinomycin biosynthetic pathway" Curr. Opin. Chem. Biol. Vol.13, No.1, 査読有, 2009, 189-196
- ⑮ Toyomasu, T., Kaneko A, Tokiwano, T., Kanno, Y., Kanno, Y., Nuda, R., Miura, S., Nishioka, T., Ikeda, C., Mitsunashi, W., Dairi, T., Kawano, T., Oikawa, H., Kato, N. and Sassa, T., "Biosynthetic gene-based secondary metabolite screening: a new diterpene, methyl phomopsenonate, from the fungus *Phomopsis am ygdali*" J. Org. Chem. Vol.74, No.1, 査読有, 2009, 1541-1548

〔学会発表〕(計 8 件)

- ① 及川英秋、生物活性物質の骨格合成酵素を利用した誘導体合成を目指して、東京大学生物生産工学研究センターシンポジウム「微生物代謝研究におけるケミカルバイオロジーの最前線」、2010 年 12 月 8 日、東京大学
- ② 及川英秋、天然物生合成は、普遍的有用物質生産法となり得るか?、化学トピックス特別講義、2010 年 11 月 17 日、東京工業大学
- ③ 及川英秋、抗腫瘍抗生物質サフラマイシンの生合成酵素を用いた骨格合成、第 52 回天然有機化合物討論会、2010 年 9 月 29 日-10 月 1 日、静岡
- ④ 及川英秋、生合成に Diels-Alder 反応は関与するのか? 始まり-苦闘-結末、藪田セミナー: 市原メモリアルシンポジウ

ム、2010 年 6 月 18 日-19 日、北海道大学

- ⑤ Oikawa, H., Biosynthetic Engineering on Antitumor Peptide Antibiotics, 14th European Congress on Biotechnology, 2009 年 9 月 13 日, Barcelona, Spain
- ⑥ 額額健人、抗腫瘍抗生物質サフラマイシン生合成酵素を用いたテトラヒドロイソキノリン骨格の酵素合成、第 95 回有機合成シンポジウム、2009 年 6 月 11 日、東京
- ⑦ 額額健人、渡辺賢二、大栗博毅、及川英秋、テトラヒドロイソキノリン系抗生物質 SF-1739HP 生合成経路の解明、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 28 日、福岡
- ⑧ 及川英秋、非リボソーム依存性ペプチド合成酵素を用いた抗腫瘍性物質ライブラリー構築の試み、日本化学会第 89 春季年会大会シンポジウム、第二次先端ウォッチングイブニングセッション「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 年 3 月 27 日、船橋

〔図書〕(計 4 件)

- ① Yamane, H., Konno, K., Takabayashi, J., Sassa, T., Oikawa, H., Elsevier, "Chemical Defence and Toxins of Plant." in Comprehensive Natural Products Chemistry II, 2010, 47
- ② Yamane, H., Konno, K., Takabayashi, J., Sassa, T., Oikawa, H., Elsevier, "Chemical Defense and Toxins of Plant." in Comprehensive Natural Products Chemistry II, 2010, 46
- ③ Oikawa, H., Elsevier, "Diels-Alderase." in Comprehensive Natural Products Chemistry II, 2010, 39
- ④ 渡辺賢二、大栗博毅、及川英秋、シーエムシー出版、天然物全合成の最新動向『生合成酵素による天然物の全合成 抗腫瘍性物質エキノマイシンの合成を中心に』、2009、16

6. 研究組織

(1) 研究代表者

及川 英秋 (OIKAWA HIDEAKI)
北海道大学・大学院理学研究院・教授
研究者番号: 00185175

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし