

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H00416

研究課題名(和文)天然化合物の多様性拡張を志向した生合成分子基盤の解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular basis of biosynthesis with the aim of expanding the diversity of natural products

研究代表者

高橋 俊二 (Takahashi, Shunji)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：30311608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,900,000円

研究成果の概要(和文)：微生物が作る天然化合物は創薬探索源として知られている。微生物が有している遺伝子情報を化合物資源へと変換することはポストゲノム時代の重要課題である。本研究では、生合成機構が長らく未解明であった天然化合物を生産する放線菌のゲノム解読情報、遺伝子機能アノテーション情報をもとに生合成遺伝子クラスターの解明に取り組んだ。放線菌異種発現解析、生合成遺伝子破壊と破壊株に蓄積する生合成中間体の構造決定、修飾酵素群の生化学解析を行うことによって、未解明生合成遺伝子クラスターの同定に成功した。本研究によって未解明の有用天然化合物の構造多様化に関わる分子基盤を解明することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、微生物が有している未解明の生合成遺伝子クラスターが有用化合物(核酸系化合物、ポリケチド、テルペノイド)へと変換される仕組みを解明した。本学術研究の成果は、天然化合物の多様性を拡張する研究の発展に資するものであり、社会に貢献する創薬シードの導出に向けた有用な遺伝子・酵素情報をもたらすことが出来た。

研究成果の概要(英文)：Natural products created by microorganisms are known as a source of drug discovery. Conversion of genetic information possessed by microorganisms into natural products is an important issue in the post-genome era. In this study, we have worked to elucidate the biosynthetic gene cluster based on genome decoding and gene function annotation of actinomycetes, which create natural products whose biosynthetic mechanisms have long remained unresolved. By analyzing heterologous expression using actinomycetes, determining the structures of biosynthetic intermediates that accumulate in gene disruptants, and biochemical analysis of modification enzymes, we have succeeded in identifying an uncharacterized biosynthetic gene cluster. Through this research, we were able to find the scientific basis for the creation of structural diversity of useful natural products that have not yet been elucidated.

研究分野：天然化合物生合成

キーワード：放線菌 天然化合物 異種発現 生合成 遺伝子資源 化学資源

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人知を超えた構造と強い生理活性から、微生物が作る天然化合物は創薬探索源として重要である。天然物生合成に仕込まれている新規酵素の機能を遺伝子工学、生化学、構造生物学、計算化学により総合的に解明し、天然化合物の多様化と新規生理活性物質の創出につなげることがポストゲノム時代の重要課題である。本研究では、長期に未解明であった天然化合物の生合成遺伝子資源を異種発現系により化学資源へと変換し、化合物の骨格形成を担う酵素や修飾酵素の機能解明により、天然化合物の構造多様性の創出基盤を構築する。

2. 研究の目的

これまでに多様な構造と生理活性を有する天然化合物が単離・構造決定されてきた。この中には、同定後に数十年が経過した現在でも生合成機構が解明されていない天然化合物が存在する。特に、生産性が不安定な天然化合物の生合成機構の解明は、従来の遺伝子工学手法では極めて困難であり研究が遅れていた。一方、DNA 配列解析技術の進展により、微生物ゲノム情報を安価に取得し、独自に保有する生産菌のゲノム配列解読と遺伝子機能アノテーションを進めることが可能になった。そこで、本研究では、有用化合物生産菌からゲノム DNA を抽出し、二次代謝生合成遺伝子クラスターの全長をクローン化する。次に、異種発現ホストに導入することにより、有用遺伝子資源を化合物資源へと変換する。さらに、天然化合物の多様性拡張に向けて、生合成の鍵酵素反応を総合的に解析する。

3. 研究の方法

(1) 放線菌 (*Streptomyces* sp. RK-16, *Streptomyces* sp. 80H647, 及び *Streptomyces spiroverticillatus* JC-8444) ゲノム解読情報、遺伝子機能アノテーション情報を統合して、フォスミドシン (PM)、アスカマイシン (ASM)、バーティシラクタム (VTL) 生合成遺伝子クラスターと推定される領域全長を異種発現用ベクターにクローニングした。

(2) 独自に見出した糸状菌由来の新規テルペン環化酵素 (AstC) をクエリに相同性検索を行い、海洋由来の真正細菌より未解明の 6 つの遺伝子を見出した。大腸菌に最適化した人工合成 DNA を調製後、酵素を異種発現精製し生化学的に反応を解析した。

4. 研究成果

(1) *Streptomyces* sp. RK-16 によって生産される PM 生合成機構の解明に向けて、異種発現ベクターにクローニングされた標的遺伝子クラスターの上流に機能するプロモーターを付加することによって異種発現を検討した。また、*Streptomyces* sp. 80H647 によって生産される ASM 生合成機構の解明に向けて、推定される領域を異種発現用のベクターにクローニングし、放線菌異種発現を検討した。生合成に必要と考えられる全遺伝子が揃っていない可能性を考慮し、候補遺伝子の追加導入も検討した。ASM 遺伝子クラスターは、複数のプロモーターによる制御であることから、生産菌を用いた転写制御因子導入による発現改善についても検討した。さらに、生合成機構の解明、中間代謝産物の同定を容易にするために、生産性向上に関わる要因について検討した。転写制御因子群を含む複数の遺伝子の恒常発現、レアコドンに対応する tRNA 補充を行った結果、ASM 生産性の向上に成功した。また、上記の条件で発現が向上している遺伝子を見出すために RNA-seq 解析を行った結果、生産性向上に関与すると予想される複数の機能未知遺伝子を見出した。生化学解析によりアラニン付加に関わる修飾酵素の同定にも成功した。

(2) *Streptomyces spiroverticillatus* JC-8444 のゲノム解読情報を解析した。その結果、ポリケチド合成酵素の機能ドメイン・モジュール構成、アシル基転移酵素の基質 (マロニル-CoA 及びメチルマロニル-CoA) 選択性の解析、ローディングユニットの生合成に関わる酵素遺伝子の構成から VTL 生合成遺伝子クラスターを推定した。次に、VTL 生合成遺伝子クラスター全長をクロー

ニングし、放線菌 (*Streptomyces avermitilis* SUKA17) を用いて異種発現を検討した。VTL 生合成機構の解明に向けて、プロモーター改変により最適化された経路特異的転写制御因子を恒常的に発現させることによって、VTL の安定生産と新規類縁体の取得に成功した。遺伝子破壊株に蓄積するポリエンマクロライド生合成中間体及び派生する環化誘導体の構造を解析した。さらに、ポリケチド修飾酵素群を精製し、生合成中間体との反応を解析した結果、水酸化、オクタリン及びフラン環形成に関わる酵素を特定することに成功した。

(3) 独自に見出した糸状菌由来 AstC を起点として、ハロ酸デハロゲナーゼ (HAD) 様ヒドロラーゼドメインとテルペン合成酵素ドメインから構成される新規テルペン環化酵素群の機能解明に取り組んだ。独自にゲノム解読を行った糸状菌 10 種から得られた候補配列を含め系統解析を行い、真菌および真正細菌での分布を確認した。この中で海洋由来の微生物 (*Aquimarina spongiae*) メタゲノムより HAD 様ヒドロラーゼスーパーファミリーに分類されるテルペン環化酵素群に着目した。人工合成 DNA を用いて大腸菌異種発現を行い、精製酵素を用いて生化学的に反応を解析した結果、ドリメノール生産に関わることを見出した。さらに、海洋微生物由来のメタゲノム情報から得られた、その他の新規テルペン環化酵素群の機能を解析したところ、全てドリメノール合成酵素であることが判明した。アミノ酸配列の比較から酵素活性部位の解明に重要な知見を得ることが出来た。

新型コロナウイルス感染症による影響で研究が遅延したものの、最終年度までには、未知の生合成遺伝子クラスターの機能を解明する研究を予定通り進展させることが出来た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nogawa Toshihiko, Terai Atsutaka, Amagai Keita, Hashimoto Junko, Futamura Yushi, Okano Akiko, Fujie Manabu, Satoh Noriyuki, Ikeda Haruo, Shin-ya Kazuo, Osada Hiroyuki, Takahashi Shunji	4. 巻 83
2. 論文標題 Heterologous Expression of the Biosynthetic Gene Cluster for Verticilactam and Identification of Analogues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 3598 ~ 3605
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.0c00755	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 Sakai Katsuyuki, Takao Risa, Koshino Hiroyuki, Futamura Yushi, Osada Hiroyuki, Takahashi Shunji	4. 巻 74
2. 論文標題 6,9-Dihydroxytetrangulol, a novel angucyclinone antibiotic accumulated in <i>kiq0</i> gene disruptant in the biosynthesis of kinanthraquinone	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 593 ~ 595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-021-00442-1	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 Fujiyama Keisuke, Kato Naoki, Re Suyong, Kinugasa Kiyomi, Watanabe Kohei, Takita Ryo, Nogawa Toshihiko, Hino Tomoya, Osada Hiroyuki, Sugita Yuji, Takahashi Shunji, Nagano Shingo	4. 巻 60
2. 論文標題 Molecular Basis for Two Stereoselective Diels Alderases that Produce Decalin Skeletons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 22401 ~ 22410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202106186	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 A. Abdelhakim Islam, Bin Mahmud Fauze, Motoyama Takayuki, Futamura Yushi, Takahashi Shunji, Osada Hiroyuki	4. 巻 85
2. 論文標題 DihydroLucilactaene, a Potent Antimalarial Compound from <i>Fusarium</i> sp. RK97-94	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 63 ~ 69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.1c00677	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 Suemune Hironori, Nishimura Doukan, Mizutani Kenjiro, Sato Yusuke, Hino Tomoya, Takagi Hiroshi, Shiozaki-Sato Yumi, Takahashi Shunji, Nagano Shingo	4. 巻 593
2. 論文標題 Crystal structures of a 6-dimethylallyltryptophan synthase, IptA: Insights into substrate tolerance and enhancement of prenyltransferase activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 144 ~ 150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.01.018	査読の有無 無
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 Vo Nhu Ngoc Quynh, Nomura Yuhta, Kinugasa Kiyomi, Takagi Hiroshi, Takahashi Shunji	4. 巻 17
2. 論文標題 Identification and Characterization of Bifunctional Drimenol Synthases of Marine Bacterial Origin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1226 ~ 1238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.2c00163	査読の有無 無
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 Abdelhakim Islam A., Motoyama Takayuki, Nogawa Toshihiko, Mahmud Fauze Bin, Futamura Yushi, Takahashi Shunji, Osada Hiroyuki	4. 巻 75
2. 論文標題 Isolation of new lucilactaene derivatives from P450 monooxygenase and aldehyde dehydrogenase knockout Fusarium sp. RK97-94 strains and their biological activities	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 361 ~ 374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-022-00529-3	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yu ZHENG, Katsuyuki SAKAI, Hiroshi TAKAGI, Yumi SHIOZAKI-SATO, Toshihiko NOGAWA, Shunji TAKAHASHI
2. 発表標題 Biosynthetic study of verticilactam, a polycyclic macrolactam from Streptomyces
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yu ZHENG, Katsuyuki SAKAI, Hiroshi TAKAGI, Yumi SHIOZAKI-SATO, Toshihiko NOGAWA, Shunji TAKAHASHI
2. 発表標題 Biosynthetic study of verticilactam, a polycyclic macrolactam from Streptomyces
3. 学会等名 4th International Conference on Natural Products Discovery and Development in the Genomic Era (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nhu Ngoc Quynh Vo, Yuhta Nomura, Kiyomi Kinugasa, Hiroshi Takagi, Yumi Shiozaki-Sato, and Shunji Takahashi
2. 発表標題 Discovery of novel bifunctional drimane sesquiterpene synthases from marine bacteria.
3. 学会等名 第64回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nhu Ngoc Quynh Vo, Yuhta Nomura, Kiyomi Kinugasa, Hiroshi Takagi, Yumi Shiozaki-Sato, and Shunji Takahashi
2. 発表標題 Discovery of novel bifunctional drimane-type sesquiterpene synthases of marine bacterial origin.
3. 学会等名 第32回 イソプレノイド研究会例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤 直樹, 藤山 敬介, 永野 真吾, 高橋 俊二
2. 発表標題 デカリン合成酵素の阻害剤同定と共結晶構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nhu Ngoc Quynh Vo , Yuhta Nomura , Kiyomi Kinugasa , Hiroshi Takagi , Yumi Shiozaki-Sato , Shunji Takahashi
2. 発表標題 Functional characterization of a novel bifunctional drimenol synthase of bacterial origin: A step toward the discovery of drimane sesquiterpenes in bacteria
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yu ZHENG , Hiroshi TAKAGI , Katsuyuki SAKAI , Yumi SHIOZAKI-SATO , Toshihiko NOGAWA , Shunji TAKAHASHI
2. 発表標題 Characterization of cytochrome P450 function in verticilactam biosynthesis
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toshihiko Nogawa, Atsutaka Terai, Keita Amagai, Junko Hashimoto, Manabu Fujie, Noriyuki Satoh, Haruo Ikeda, Kazuo Shin-ya, Hiroyuki Osada, Shunji Takahashi
2. 発表標題 Analysis of verticilactam biosynthetic gene cluster
3. 学会等名 Pacifichem (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤 直樹、藤山 敬介、野川 俊彦、長田 裕之、永野 真吾、高橋 俊二
2. 発表標題 デカリン合成酵素Phm7およびFsa2のin vitroアッセイ系の構築
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 俊二
2. 発表標題 放線菌の二次代謝生成機構と生産性増強に関する研究
3. 学会等名 日本放線菌学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	野川 俊彦 (Nogawa Toshihiko) (40462717)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・技師 (82401)	
研究分担者	滝田 良 (Takita Ryo) (50452321)	東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・准教授 (12601)	
研究分担者	永野 真吾 (Nagano Shingo) (60286440)	鳥取大学・工学研究科・教授 (15101)	
研究分担者	加藤 直樹 (Kato Naoki) (90442946)	摂南大学・農学部・准教授 (34428)	

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