

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24380052

研究課題名(和文)次世代天然化合物導出を指向した新規生合成ロジックの構築

研究課題名(英文)Construction of a biosynthetic logic toward a new era of natural product

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) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：微生物が有する未知の二次代謝生合成遺伝子の機能を解明し、新規化合物生産に活用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、放線菌(*Streptomyces reveromyceticus*)が有するリベロマイシンA生合成遺伝子クラスターにコードされている新規の酵素群に着目し、その生化学的性質を詳細に解析することによって、ポリケチド多様化に関わる生合成機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In a post genome era, it is important to reveal the function of unknown genes included in microbial secondary metabolite gene cluster. The findings can be utilized for the production of novel compounds. In this study, we focused on novel enzymes encoded in reveromycin gene cluster from *Streptomyces reveromyceticus*. Based on biochemical analyses of the enzymes, we demonstrated novel biosynthetic mechanisms responsible for the diversification of polyketide compounds.

研究分野：応用微生物学

キーワード：生合成 スピロアセタール アルキルマロニルCoA リベロマイシン 放線菌 ポリケチド CoAリガー
セ

1. 研究開始当初の背景

リベロマイシン A (RM-A) 生産菌 (*Streptomyces reveromyceticus*) ゲノム解読を行い、RM-A 生合成遺伝子クラスターを同定していた。また、遺伝子クラスターに存在する機能不明遺伝子の破壊解析によって、未知反応を触媒する酵素群の存在が示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究では、RM-A 生合成に関わる新規の酵素反応に着目し、新規天然化合物の創製につながる生合成機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

RM-A 生合成遺伝子クラスターから見出された新規遺伝子群は、スピロアセタール生合成、エステル化反応、2-アルキルマロニル CoA 生合成に関わる酵素をコードする。これら酵素群の反応機構を解明するために蛋白質結晶化および生化学的解析を行った。

(1) スピロアセタール立体構造の制御機構を理解するために RevG 及び RevJ を精製し結晶構造解析を行った。

(2) エステル化に関与すると考えられる酵素群を調製し、複合酵素系の反応を検討した。

(3) 脂肪酸生合成と酸化経路の一部を活用した2-アルキルマロニル CoA 生合成を予想した。CoA 誘導体を合成するとともに、各酵素に対する基質特異性を検討した。

4. 研究成果

(1) スピロアセタール形成機構の解明：RevG 及び RevJ は、反応に必須の酵素であり、反応機構解析には結晶構造の取得が重要である。そこで、数千以上にのぼる結晶化条件を検討した結果、微結晶様の沈殿物が得られたが、X線回折実験に適した結晶を得ることはできなかった。構造解析に適した結晶が得られない理由として、RevG、RevJ とともに溶液中で多量体を形成するために、その分子量が単一ではないと考え、精製過程で単分散になるように精製方法を改良した。

(2) 新規エステル化酵素反応の解明：遺伝子破壊実験により反応の関与が示唆されている RevK, L, M に着目した。第一に、各酵素は不安定であることから、高活性の酵素を取得するために、精製条件の検討を行った。また、複合体形成を予想し、各精製酵素を混合しゲル濾過を行ったが、検討した buffer 条件においては多量体形成を示唆する結果は得られなかった。また、生成する二リン酸を定量することで RevL 基質特異性を評価した。一方、RevL 反応産物の同定は困難であり、今後の課題である。

(3) アルキルマロニル CoA 生合成機構の解明：異種発現し均一に精製した RevS を用いて、脂肪酸基質、CoA、及び ACP (アシルキャリアープロテイン) との反応性を詳細に解析した。RevS は、アミノ酸配列から ACP リガーゼと予想

されたが、炭素数 8 - 10 の遊離中鎖脂肪酸をアシル CoA 体に変換する CoA リガーゼであり、ACP リガーゼではないことが明らかになった。還元カルボキシル化酵素 (RevT) を用いて基質特異性を生化学的に検討したところ、アシル CoA のみを基質にすることが明らかになった。生化学解析からリベロマイシン類の構造多様化に関わるアルキル側鎖生合成には RevS、RevT が重要な機能を担うことが判明した。また、RevR は、脂肪酸生合成の初期反応に関わる酵素であることが遺伝子破壊実験から示唆されているが、反応系構築が困難であるため、反応動力学的解析は今後の課題である。

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 12 件)

Miyazawa T., Takahashi S., Kawata A., Panthee S., Hayashi T., Shimizu T., Nogawa T., and Osada H. Identification of middle chain fatty acyl-CoA ligase responsible for the biosynthesis of 2-alkylmalonyl-CoAs for polyketide extender unit. *J. Biol. Chem.* 290: 26994-27011, 2015. 査読有, doi: 10.1074/jbc.M115.677195.

Lim C.L., Nogawa T., Okano A., Futamura Y., Kawatani M., Takahashi S., Ibrahim D. and Osada H. Unantimycin A, a new neoantimycin analog isolated from a microbial metabolite fraction library. *J. Antibiot.* 査読有, doi:10.1038/ja.2015.124.

Kato N., Nogawa T., Hirota H., Jang J.-H., Takahashi S., Ahn J.S., Osada H. A new enzyme involved in the control of the stereochemistry in the decalin formation during equisetin biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 460: 210-215, 2015. 査読有, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.03.011.

Jang J.-P., Nogawa T., Uramoto M., Okano A., Futamura Y., Shimizu T., Takahashi S., Jang J.-H., Ahn J.-S., and Osada H. RK-270A-C, New Oxindole Derivatives Isolated from a Microbial Metabolites Fraction Library of *Streptomyces* sp. RK85-270. *J. Antibiot.* 68: 293-295, 2015. 査読有, doi: 10.1038/ja.2014.141.

Takahashi S., Nagano S., Nogawa T., Kanoh N., Uramoto M., Kawatani M., Shimizu T., Miyazawa T., Shiro Y., and Osada H. Structure-function analyses of cytochrome P450revI involved in reveromycin A biosynthesis and evaluation of the biological activity of its substrate, reveromycin T. *J.*

Biol. Chem. 289: 32446-32458, 2014. 査読有, doi:10.1074/jbc.M114.598391.
Aizawa T., Kim S.-Y., Takahashi S., Koshita M., Futamura Y., Osada H., and Funo N. Alkyldihydropyrone, a new polyketide synthesized by type III polyketide synthase from *Streptomyces reveromyceticus*. *J. Antibiot.* 67: 819-823, 2014. 査読有, doi: 10.1038/ja.2014.80.
Lim C. L., Nogawa T., Uramoto M., Okano A., Hongo Y., Nakamura T., Koshino H., Takahashi S., Ibrahim D., and Osada H. RK-1355A and B, Novel Quinomycin Derivatives Isolated from a Microbial Metabolites Fraction Library Based on NPPlot Screening. *J. Antibiot.* 67: 323-329, 2014. 査読有, doi:10.1038/ja.2013.144.
Nogawa T., Takahashi S., Sekiyama Y., Takagi H., Uramoto M., Koshino H., Kawatani M., Shimizu T., Osada H. Creation of novel reveromycin derivatives by alcohol-added fermentation. *J. Antibiot.* 66: 247-250, 2013. 査読有, doi: 10.1038/ja.2012.115.
Kato N., Suzuki H., Okumura H., Takahashi S., and Osada H. A point mutation in *ftmD* blocks the fumitremorgin biosynthetic pathway in *Aspergillus fumigatus* strain Af293. *Biosci. Biotech. Biochem.* 77: 1061-1067, 2013. 査読有, doi: 10.1271/bbb.130026.
Nogawa T., Kawatani M., Uramoto M., Okano A., Aono H., Futamura Y., Koshino H., Takahashi S., and Osada H. Pyrrolizilactone, a new pyrrolizidinone metabolite produced by a fungus. *J. Antibiot.* 66: 621-623, 2013. 査読有, doi:10.1038/ja.2013.55.
高橋 俊二、長田 裕之、リペロマイシン A 生合成に関わる未知酵素の解明 - スピロアセタール環化酵素の発見、化学と生物, Vol.51, No.3, 2013, pp.138-140. 査読有
Nogawa T., Takahashi S., Okano A., Kawatani M., Uramoto M., Saito T., and Osada H. Spirotoamides A and B, novel 6,6-spiroacetal polyketides isolated from a microbial metabolite fraction library. *J. Antibiot.*, 65: 123-128, 2012. 査読有, doi:10.1038/ja.2011.121.

[学会発表](計 28 件)

Miyazawa T., Characterization of middle chain fatty acyl-CoA ligase

responsible for the biosynthesis of 2-alkylmalonyl-CoAs for polyketide extender unit, The 8th Korea-Japan Chemical Biology Symposium, Jan. 18-19th, 2016, Naha, Okinawa, Japan.
宮澤 岳、ポリケチド伸長単位生合成に関与する脂肪酸活性化酵素の機能解析、放線菌学会、2015年9月7-8日、富山
Miyazawa T., Carboxylase/reductase independent system for 2-alkylmalonyl-CoA biosynthesis, RIKEN-KRIBB Chemical Biology Joint Symposium, May 22, 2015, Suzuki Umetaro Hall, Wako.
Takahashi S., Structure-function analyses of cytochrome P450revI involved in reveromycin A biosynthesis, Society for Industrial Microbiology and Biochemistry, Jan 11-14, 2015, The Westin San Diego Gaslamp Quarter, San Diego, CA USA.
奥村 英夫、リペロマイシン生合成に関わる RevL の結晶構造解析、日本農芸化学会、2015年3月26-29日、岡山大学
野川 俊彦、アルコール添加による新規リペロマイシン誘導体の創製と生合成機構の考察、日本農芸化学会、2015年3月26-29日、岡山大学
宮澤 岳、Carboxylase/reductase に依存しない新規 2-alkylmalonyl-CoA 生合成機構の解析、生物生産工学研究センターシンポジウム、2014年12月8日、東京大学
Takahashi S., Biosynthesis of natural products, The GRDC Symposium, Nov. 10-11, 2014, Konkuk University, Seoul, Korea.
Takahashi S., In vitro reconstitution of biosynthetic machinery for reveromycin, International Symposium on the Biology of Actinomycetes, Oct. 8-12, 2014, Pine Bay Holiday Resort Hotel, Turkey.
宮澤 岳、Butylmalonyl-CoA の選択的生産に関与する RevR の機能解析、放線菌学会、2014年6月19-20日、つくばカピオ
高橋 俊二、リペロマイシン A 生合成反応の invitro 再構成、日本農芸化学会関東支部第一回例会シンポジウム、2014年5月24日、東京大学
前島 希、Reveromycin A 生合成におけるサクシニル化酵素の機能解析、日本農芸化学会、2014年3月27-30日、明治大学
宮澤 岳、Butylmalonyl-CoA 生合成に関与する RevR の機能解析、日本農芸化学会、2014年3月27-30日、明治大学
寺井 淳高、Verticilactam 遺伝子クラスターに存在する生合成遺伝子群の機能解析、日本農芸化学会、2014年3月27-30日、明治大学

Takahashi S., Elucidation of reveromycin A biosynthesis, 1st US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products For Young Researcher, March 2-3, 2014, O-okayama, Tokyo.

Takahashi S., In vitro reconstruction of reveromycin A biosynthesis, The 7th Japan-Korea Chemical Biology Symposium, Feb 9-11, 2014, Jeju Island, Koera.

Lim C.L., Isolation of Novel Bioactive Compounds from Fraction Library of Microorganisms Based On NPPlot Screening, 2013年9月18-20日, 第55回天然有機化合物討論会、京都

宮澤 岳、*S. reveromyceticus* を活用した samR0483 遺伝子の機能解析、放線菌学会、2013年9月5-6日、メルパルク広島
寺井 淳高、異種発現による Verticilactam 生合成遺伝子の同定、放線菌学会、2013年9月5-6日、メルパルク広島

Miyazawa T., Elucidation of 2-alkylmalonyl-CoA biosynthesis in Reveromycin production, KRIBB-RIKEN Chemical Biology Joint Symposium, May 28-30, 2013, Ochang, Korea.

- ⑳ Takahashi S., Analysis of Reveromycin A biosynthetic machinery, RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology *The 2nd Symposium*, April 15-17, 2013, Wako Saitama.
- ㉑ 宮澤 岳、[3,3-D₂]heptanoic acid を用いたリベロマイシン D 生合成経路の解析、日本農芸化学会、2013年3月24-28日、東北大学
- ㉒ 高橋 俊二、リベロマイシン生合成におけるサクシニル化機構の解析、日本農芸化学会、2013年3月24-28日、東北大学
- ㉓ Takahashi S., Structure and Function of P450revI in Reveromycin A Biosynthesis, チトクロム P450 発見50周年記念シンポジウム、2012年12月2-3日、九州大学
- ㉔ 野川 俊彦、新規リベロマイシン誘導体の創製と活性評価、第54回天然有機化合物討論会、2012年9月18-20日、東京農業大学
- ㉕ 高橋 俊二、リベロマイシン生合成における3級水酸基のサクシニル化、放線菌学会、2012年9月6-7日、府中の森芸術劇場
- ㉖ 宮澤 岳、2-アルキルマロニル-CoA 生合成経路の解析、放線菌学会、2012年9月6-7日、府中の森芸術劇場
- ㉗ Takahashi S., Deciphering of reveromycin A biosynthesis, RIKEN-MAXPLANCK JOINT RESEARCH CENTER Kick Off Symposium, Mar 6-7, 2012, Dortmund, Germany.

〔その他〕

天然物生合成研究ユニット

<http://www.csrs.riken.jp/jp/labs/npbu/index.html>

<http://www.csrs.riken.jp/en/labs/npbu/index.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

奥村 英夫 (Okumura, Hideo)

公益財団法人

高輝度光科学研究センター

タンパク質結晶解析推進室

研究員

研究者番号：90377903