

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460140

研究課題名(和文)新規糖尿病治療薬の開発を目指した放線菌代謝産物の生合成研究

研究課題名(英文) Biosynthetic studies on actinomycete metabolites for development of novel diabetes drugs

研究代表者

伊藤 卓也 (Ito, Takuya)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授

研究者番号：90517484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：トレスタチンおよびアミロスタチンはそれぞれ放線菌 *Streptomyces dimorphogenes* および *S. conglobatus* から産生される C7N アミノサイクリトール化合物で、 α -グルコシダーゼ阻害活性を有する。新たな糖尿病治療薬の開発を目指して、トレスタチンおよびアミロスタチンの生合成研究を行った。トレスタチンおよびアミロスタチンの生産菌の遺伝子解析を行ったところ、これら化合物の生合成に関わる遺伝子クラスターの取得に成功した。また、これらの情報から、これら二つの化合物の生合成経路を予想することができた。さらに、新たな類縁体を創製する目的で、機能タンパク質の欠損株を調製した。

研究成果の概要(英文)：Trestatin and amylostatin are aminocyclitols, which have α -glycosidase inhibitory activities. In order to develop new diabetes drugs, biosynthetic studies on trestatin and amylostatin, were carried out. Draft sequence analysis of trestatin and amylostatin producing strains indicated gene clusters involved in biosynthesis of these compounds. Furthermore, biosynthetic pathways of these compounds were predicted on the basis of the amino acid sequence data. In addition, we prepared genetic-disruption mutants of several functional proteins for creating new analogs of these antibiotics.

研究分野：天然資源系薬学

キーワード：放線菌 糖尿病 生合成

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は、1型および2型に分類され、日本人においては約9割が2型糖尿病ということが知られている。現在、我が国において糖尿病患者は約800万人おり、いつ糖尿病を発症してもおかしくない糖尿病予備軍を含めると2000万人を超える勢いで、10年前に比べて1.5倍増えているという報告もある。

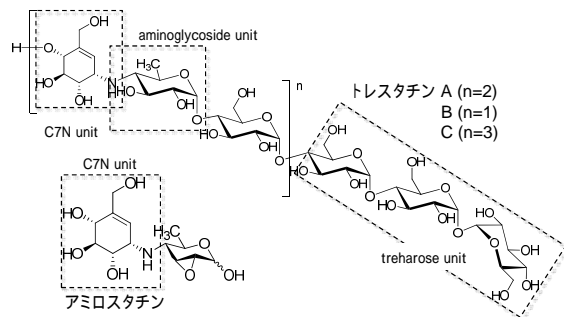
2型糖尿病の発症要因は、遺伝的な因子とともに、食習慣、ストレス、運動など環境的な因子が加わることで引き起こされるが、インスリンの分泌不全とインスリン抵抗性が2型糖尿病発症の成因として挙げられる。欧米人ではインスリン分泌量は多いが、インスリンの抵抗性が強く、日本人ではインスリンの抵抗性は強いが、インスリン分泌量は少ない2タイプの2型糖尿病に大別できる。現在、我が国における2型糖尿病患者の増加は、もともとインスリン分泌量が低いという点、食生活、食習慣が欧米化されたことにより内臓脂肪蓄積型肥満が増えてインスリン抵抗状態が加わったことに起因している。

糖尿病は、手のしびれなどの神経障害、網膜症、腎の機能が低下する腎障害など3大合併症が発症することが問題となっている。その他にも、動脈硬化を起こすことがあり、心臓病や脳卒中などで死亡するリスクが非常に高くなる。一方、 α -グルコシダーゼ阻害薬は、オリゴ糖や二糖類の分解を抑制することにより、腸管からのブドウ糖の吸収を遅延させ、食後の血糖値の急激な上昇を抑える糖尿病治療薬で、アカルボースやボグリボースが臨床で使われている。アカルボースは、 α -グルコシダーゼ阻害だけでなく α -アミラーゼ阻害作用を示すため、デンプンなどの多糖類の分解まで抑制する。そのため、分解されないデンプンが腸内細菌で発酵されることにより、膨満感や下痢などの副作用が発生する欠点がある。このようなことから、副作用の軽減や薬効の向上を目的として新たな α -グルコシダーゼ阻害薬の開発が切望されている。

2. 研究の目的

放線菌から産生されるアミドグリコシド系やアンサマクロライド系抗生物質は、 $C_{7}N$ 部分を含む化合物群である。また、アミノサイクリトールは2-*epi*-5-*epi*-valioloneを生合成の原料とする $C_{7}N$ 含有化合物群で、生物活性においても興味深い化合物が多い。例えば、農薬・殺菌剤バリダマイシンや、前述した糖尿病治療薬アカルボースは、同じ $C_{7}N$ 部分を持ちながら、前者は抗真菌活性を示し、後者は α -グルコシダーゼ阻害活性を示す。このことから、この $C_{7}N$ 部分は、活性発現に重要な構造であるが、糖部分の構造が異なることで、活性発現の作用点も異なることが示唆される。したがって、 $C_{7}N$ 部分や糖部分の構造を変化させることで、新たな抗菌薬や糖尿病薬治療薬の開発が期待できる。

トレスタチンおよびアミロスタチンは、それぞれ放線菌 *Streptomyces dimorphogenes* および *S. conglobatus* から産生される $C_{7}N$ アミノサイクリトール化合物である。トレスタチンの構造は、 $C_{7}N$ 部分に6-デオキシグルコース、2つのグルコース、末端にトレハロースがグリコシド結合している。 $C_{7}N$ 部分は2-*epi*-5-*epi*-valioloneを出発原料として生合成されていると予想される。また、トレハロース部分はマルトースが変換され、トレハロースとして組み込まれると考えられる。一方、アミロスタチンは $C_{7}N$ 部分に2,3-エポキシアミノ糖がグリコシド結合している非常に面白い構造をしている。また、これら2つの化合物は、 α -グルコシダーゼ阻害活性を有している。今回、この2つの化合物に着目し、生合成経路の解明及び新規類縁体の創製を目指した生合成研究を行った。



3. 研究の方法

(1) トレスタチンおよびアミロスタチン生合成遺伝子クラスターを得る目的で、それぞれの生産菌を培養し、染色体を取得する。得られた染色体を約40 Kbpに断片化し、Fosmidクローンを調製して遺伝子ライブラリーを構築する。また、ゲノムシーケンサーの解析により染色体のドラフト配列を取得しアノテーションを行い、目的のタンパク質を検索する。その後、遺伝子ライブラリーから目的のタンパク質を含むクローンを得て、DNA配列を決定してORF解析することでこれら化合物の生合成遺伝子クラスターを得ることができる。

(2) 遺伝子クラスターがトレスタチンおよびアミロスタチンの生合成に関与しているか確認する目的で、2-*epi*-5-*epi*-valiolone合成酵素やグルコシルトランスフェラーゼなどの機能タンパクを破壊した株を調製して、産生されたかを確認する。

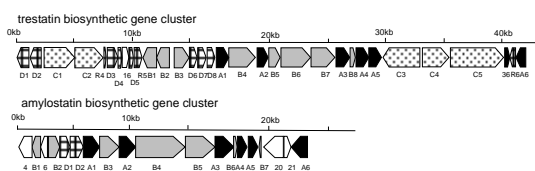
(3) 新たな類縁体を見出すために、遺伝子破壊株および改変株を培養して、産生物質の変化を観察した。

4. 研究成果

(1) トレスタチン産生菌 *S. dimorphogenes* の染色体をゲノムシーケンサーを利用して解析することによりドラフト配列が得られた。

染色体の塩基配列を基に ORF (Open Reading Frame) 解析および機能タンパク質のアノテーション解析を行ったところ、C₇N 部分の生合成中間体 2-*epi*-5-*epi*-valiolone を合成する酵素、及び糖を結合させる酵素グリコシルトランスフェラーゼと非常に相同性が高い遺伝子群が認められた。そこで、これら酵素遺伝子の配列を基にプライマーを作製して遺伝子ライブラリーの PCR スクリーニングを行った。その結果、これら生合成遺伝子群が含まれる Fosmid クローンを取得し、さらなる遺伝子解析を行ったところ、下図のように、C₇N 部分を生合成する遺伝子群 (黒色の矢印) 糖の結合に関係する酵素遺伝子群 (灰色の矢印) が含まれており、これらがトレスタチンの生合成遺伝子クラスターであることが推測された。

一方、アミロスタチン産生菌 *S. conglobatus* も同様に染色体を取得し、遺伝子解析を行ったところ、C₇N 部分の生合成遺伝子群と糖の結合に関する遺伝子群が含まれている領域があり、これらがアミロスタチンの生合成遺伝子クラスターと類推できた。



(2) トレスタチン生合成遺伝子クラスターの各酵素からトレスタチンの生合成経路を予想した。最初に、*sedo*-heptulose-7-phosphate に 2-*epi*-5-*epi*-valiolone 合成酵素が働き 2-*epi*-5-*epi*-valiolone へと導かれる。次に、2-*epi*-5-*epi*-valiolone が 2-*epi*-5-*epi*-valiolone dehydratase/epimerase の作用により 2 位がエピメリ化、5 位が脱水されることで valienone が生成する。その後、oxidoreductase の作用による 1 位が還元を経て、C7cyclitol-7-kinase、1-*epi*-valienol-7-phosphate-1-kinase により 1 位と 6 位がリン酸化される。最終的に adenylyltransferase により 1 位がアデニル化されサイクリトール(C₇N)部分が生合成されると予測される。次に、グルコース-1-リン酸が thymidyltransferase により 1 位がチミジル化され、続いて dTDP-glucose 4,6-dehydratase の作用により 4 位の水酸基の酸化、6 位の水酸基の脱水がおこる。その後、4 位がアミノ化され、dTDP-4-amino-6-deoxyglucose が生成し、サイクリトール部分と SN2 反応することでアミノグリコシド中間体を得られる。糖部分が glycosyltransferase の作用により伸長し、トレスタチンが生合成されると考えられた。

一方、アミロスタチンの生合成経路は、アミノサイクリトール部分まではトレスタチンと同様の生合成酵素遺伝子群が観察されたことから、アミノサイクリトール部分はトレスタチンと同様に生成されると予測した。糖部分は、グルコースの水酸基が glucose 4,6-dehydratase の作用により 4 位が酸化、6

位が脱水される。その後、アミノ化転移酵素による 4 位のアミノ化、機能未知の酵素 (AmyB7) による 3 位のハロゲン化を経て、最後に haloacid dehalogenase によって 2,3-epoxy-4-amino-6-deoxy-glucose を形成する。このエポキシアミノ糖とサイクリトール部分が SN2 反応し、アミロスタチンが生成すると考えている。

両菌株から得られた遺伝子クラスターが実際におよびアミロスタチン生合成に関与しているか確認するため、酵素の機能を破壊した株を調製した。2-*epi*-5-*epi*-valiolone は、上述したようにアミノサイクリトール (C₇N 部分) 生合成する上で重要な中間体である。この生合成に関わる 2-*epi*-5-*epi*-valiolone 合成酵素の機能を欠損させた株を調製した。その結果、両化合物の生成は確認できなかった。このことから、これら遺伝子クラスターは 2 つの代謝物の生成に関与していることが証明できた。

(3) 両化合物の生産菌から様々な機能を欠損させた株を調製した。現在、詳細な代謝産物の変化を観察しているところであり、新たな糖尿病治療に繋がる化合物が見出されることを期待している。

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 29 件)

Ito T., Nisa K., Rakainsa S. K., Lallo S., Morita H. New phloroglucinol derivatives from Indonesian *Baeckea frutescens*. *Tetrahedron*, **2017**, *73*, 1177-1181.

Nguyen H. T., Ho D. V., Vo H. Q., Le A. T., Nguyen H. M., Kodama T., Ito T., Morita H., Raal A. Antibacterial activities of chemical constituents from the aerial parts of *Hedyotis pilulifera*. *Pharm. Biol.* **2017**, *11*, 787-791

Nguyen H. T., Ho D. V., Vo H. Q., Hoang T. H. X., Kodama T., Ito T., Morita H., Raal, A. The components from aerial parts of *Sarcosperma affinis* Gagnep. and their antibacterial activities. *Cogent Chem.* **2016**, *2*, 125421.

Hien N. M., Ito T., Win N. N., Kodama T., Hung V. Q., Hoai N. T., Morita H. New antibacterial sesquiterpene aminoquinones from a Vietnamese marine sponge of *Spongia* sp. *Phytochem. Lett.* **2016**, *17*, 288-292.

Win N. N., Ito T., Win Y. Y., Ngwe H. Abe I., Morita H. Quassinoids: Viral protein R inhibitors from *Picrasma javanica* bark collected in Myanmar. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 4620-4624.

Nishio A., Mikami H., Imagawa H., Hashimoto T., Tanaka M., Ito T., Iguchi M., Iseki K., Noji M., Umeyama A. Two novel diphenolic metabolites from the inedible mushroom

Thelephora palmate. *Nat. Prod. Comm.* **2016**, *11*, 1147–1149.

Ito T., Aimaiti S., Win N. N., Kodama T., Morita H. New sesquiterpene lactones, vernonilides A and B, from the seeds of *Vernonia anthelmintica* in Uyghur and their antiproliferative activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 3608–3611.

Ito T., Nisa K., Kodama T., Tanaka M., Okamoto Y., Ismail, Morita H. Two new cyclopentenones and a new furanone from *Baeckea frutescens* and their cytotoxicities, *Fitoterapia* **2016**, *112*, 132–135.

Awouafack M. D., Tchuenguem R. T., Ito T., Dzoyem J. P., Tane P., Morita H. A new isoflavanol from the fruits of *Kotschyia strigosa* (Fabaceae), *Helv. Chim. Acta.* **2016**, *99*, 321–324.

Nguekeu Y. M. M., Ndontsa B. L. Mbouangouere R., Awouafack M. D. Ito T., Tane P., Morita H. A new alkenylmethylresorcinol from the fruits of *Ardisia kivuensis*. *Nat. Prod. Comm.* **2016**, *11*, 661–662.

Win N. N., Ito T., Matsui T., Aimaiti S., Kodama T., Ngwe H., Okamoto Y., Tanaka M., Asakawa Y., Abe I., Morita H. Isopimarane diterpenoids from *Kaempferia pulchra* rhizomes collected in Myanmar and their Vpr inhibitory activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 1789–1793.

Awouafack M. D., Ito T., Tane P., Kodama T., Tanaka M., Asakawa Y., Morita H. A new cycloartane-type triterpene and a new eicosanoic acid ester from fruits of *Paullinia pinnata* L. *Phytochem. Lett.* **2016**, *15*, 220–224.

Nisa K., Ito T., Kodama T., Tanaka M., Okamoto Y., Asakawa Y., Imagawa H., Morita H. New cytotoxic phloroglucinols, baecenones D–F, from the leaves of Indonesian *Baeckea frutescens*. *Fitoterapia* **2016**, *109*, 236–240.

Nguyen T. H., Duc H. V., Phu N. D. Q., Kodama T., Ito T., Morita H. A new iridoid from aerial parts of *Hedyotis pilulifera*. *Nat. Prod. Comm.* **2016**, *11*, 365–367.

Nagashima F., Tabuchi Y., Ito T., Harinantenaina L., Asakawa Y. Terpenoids, flavonoids and acetogenins from some Malagasy plants. *Nat. Prod. Comm.* **2016**, *11*, 153–157.

Win N. N., Ito T., Ismail, Kodama T., Win Y. Y., Tanaka M., Okamoto Y., Imagawa H., Ngwe H., Asakawa Y., Abe I., Morita H. Picrajavanicins H–M, new quassinoids from *Picrasma javanica* collected in Myanmar and their antiproliferative activities. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 746–752.

Nisa K., Ito T., Subehan, Matsui T., Kodama T., Morita H. New acylphloroglucinol derivatives from the leaves of *Baeckea frutescens*. *Phytochem. Lett.* **2016**, *15*, 42–45.

Win N. N., Ito T., Ismail, Kodama T., Win Y. Y., Tanaka M., Ngwe H., Asakawa Y., Abe I., Morita

H. Picrajavanicins A–G: quassinoids from *Picrasma javanica* collected in Myanmar. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 3024–3030.

Win N. N., Ito T., Aimaiti S., Kodama T., Tanaka M., Ngwe H., Asakawa Y., Abe I., Morita H. Kaempulchraols P–T, diterpenoids from *Kaempferia pulchra* rhizomes collected in Myanmar. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 2306–2309.

Duc H. V., Kodama T., Hien L. T. B. P., Kiem V., Thao D. T., Tai B. H., Anh L. T., Win N. N., Imagawa H., Ito T., Morita H., Nguyen H. T. A new polyoxygenated cyclohexene and a new megastigmane glycoside from *Uvaria grandiflora*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 3245–50.

② Win N. N., Ito T., Aimaiti S., Kodama T., Imagawa H., Ngwe H., Asakawa Y., Abe I., Morita H. Kaempulchraols I–O: new isopimarane diterpenoids from *Kaempferia pulchra* rhizomes collected in Myanmar and their antiproliferative activity. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 4707–4713.

② Win N. N., Ito T., Aimaiti S., Imagawa H., Ngwe H., Abe I., Morita H. kaempulchraols a–h, diterpenoids from the rhizomes of *Kaempferia pulchra* collected in Myanmar. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 1113–1118.

③ Wakimoto T., Egami Y., Nakashima Y., Wakimoto Y., Mori T., Awakawa T., Ito T., Kenmoku H., Asakawa Y., Piel J., Abe I. Calyculin Biogenesis from a Pyrophosphate Protoxin Produced by a Sponge Symbiont. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 648–655.

④ Awakawa T., Zhang L., Wakimoto T., Hoshino S., Mori T., Ito T., Ishikawa J., Tanner M. E., Abe I., A methyltransferase initiates terpene cyclization in teleocidin B biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 9910–9913.

⑤ Yoshikawa K., Baba C., Iseki K., Ito T., Asakawa Y., Kawano S., Hashimoto T. Phenanthrene and phenylpropanoid constituents from the roots of *Cymbidium Great Flower 'Marylaurencin'* and their antimicrobial activity. *J. Nat. Med.* **2014**, *68*, 743–747.

⑥ Grudniewska A., Hayashi S., Shimizu M., Kato M., Suenaga M., Imagawa H., Ito T., Asakawa Y., Ban S., Kumada T., Hashimoto T., Umeyama A. Opaliferin, a new polyketide from cultures of entomopathogenic fungus *Cordyceps* sp. NBRC 106954. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 4695–4697.

⑦ Horikawa M., Inai M., Oguri Y., Kuroda E., Tanaka M., Suzuki S., Ito T., Takahashi S., Kaku H., Tsunoda T. Isolation and total syntheses of cytotoxic cryptolactones A₁, A₂, B₁, and B₂: α,β -unsaturated δ -lactones from a *Cryptomyzus* sp. aphid. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 2459–2464.

⑧ Asakawa Y., Nagashima F., Hashimoto T., Toyota M., Ludwiczuk A., Komala I., Ito T., Yagi Y. Pungent and bitter, cytotoxic and antiviral terpenoids from some bryophytes and inedible

fungi. *Nat. Prod. Commun.* **2014**, 9, 409–17.

⑳Yoshikawa K., Okahuji M., Iseki K., Ito T., Asakawa Y., Kawano S., Hashimoto T. Two novel aromatic glucosides, marylaurencinosides D and E, from the fresh flowers of *Cymbidium* Great Flower 'Marylaurencin'. *J. Nat. Med.* **2014**, 68, 455–458.

〔学会発表〕(計 14 件)

Senda K. R., 伊藤卓也, 森田洋行, New diterpenoids from *Plectranthus scutellarioides* collected in Indonesia, 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 25-27 日 (仙台)

Ito T., Phytochemical study on *Baekkea frutescens* collected in Indonesia and biosynthesis study on asukamycin. 2016 Joint Symposium of The Natural Products Research Institute at Seoul National University & The Institute of Natural Medicine at University of Toyama, Nov. 8, 2016 (Toyama, Japan)

Ito T., Nisa K., Morita H., Phytochemical Constituents of *Baekkea frutescens* Collected in Indonesia. International Symposium on Natural Products for the Future 2016, Sep. 1-4, 2016 (Tokushima, Japan)

Ito T., Nisa K., Morita H., Phytochemical constituents of *Baekkea frutescens* collected in Indonesia. International Symposium on Natural Products for the Future 2016, Sep. 1-4, 2016 (Tokushima, Japan)

Nisa, K., 伊藤卓也, 松井崇, 児玉猛, 森田洋行, Three new phloroglucinols from Indonesian *Baekkea frutescens*. 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 27-29 日 (横浜)

Ito T., Biologically active compounds from microorganisms: Isolation and biosynthesis. Seminar between International Cooperative Center for researches of Medicinal Resources, Pekin University & Institute of Natural Medicine, University of Toyama, March 11, 2016 (Beijing, China)

Ito T., Kodama T., Noguchi H., Abe I., Morita H., Precursor-directed biosynthesis of unnatural novel alkaloids by using a plant type III polyketide synthase obtained from *Evodia rutaecarpa*, Pacificchem 2015, Dec. 15-20, 2015 (Honolulu, Hawaii, USA)

Ito T., Biological active compounds from microorganisms: Isolation and biosynthesis. Scientific workshop on Natural Products Chemistry. Nov. 2, 2015 (Yangon, Myanmar)

Ito T., Hoai T. N., Duc H. V., Kodama T., Hien L. T. V., Imagawa H., Win N.N., Morita H., A new polyoxygenated cyclohexene and a new megastigmane glycoside from aerial part of *Uvaria grandiflora* and their cytotoxicity, Inaugural Symposium of the photochemistry society of Asia, Aug. 29- Sep. 2, 2015 (Tokushima, Japan)

Win N.N., Ito T., Aimaiti S., Kodama T.,

Morita H., Kaempulchraols A-O, new diterpenoids from *Kaempferia pulchra* rhizomes collected in Myanmar and their antiproliferative activity, Inaugural Symposium of the photochemistry society of Asia, Aug. 29- Sep. 2, 2015 (Tokushima, Japan)

張驪驛, 伊藤卓也, 脇本敏幸, 淡川孝義, 浅川義範, 阿部郁朗, メディオマイシン生合成遺伝子の同定, 第 20 回天然薬物の開発と応用シンポジウム, 2014 年 11 月 5-6 日 (東京)

伊藤卓也, 永井宏和, Pengfei Xie, Taifo Mahmud, 浅川義範, 新規アスカマイシン類縁体の創製と生産性の向上, 第 20 回天然薬物の開発と応用シンポジウム, 2014 年 11 月 5-6 日 (東京)

森貴裕, 淡川孝義, 張驪驛, 星野翔太郎, 脇本敏幸, 森田洋行, 伊藤卓也, 石川 淳, 阿部 郁朗, Teleocidin 類の生合成経路の解明, 第 56 回天然有機化合物討論会, 2014 年 10 月 15-17 日 (高知)

Awakawa T., Mori T., Zhang L., Wakimoto T., Ito T., Ishikawa J., Abe I. Cyclohexene ring formation facilitated by methylation of the prenyl chain in teleocidin B4 biosynthesis. 248th ACS National Meeting & Exposition. Aug.10-14, 2014 (San Francisco, USA)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.inm.u-toyama.ac.jp/napc/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 卓也 (ITO, TAKUYA)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授
研究者番号：90517484