

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560428

研究課題名(和文) モジュール型ポリケタイド合成酵素のリプログラミングによる非天然型新規化合物の創出

研究課題名(英文) Engineering Modular-type Polyketide Synthases

## 研究代表者

阿部 郁朗 (Abe, Ikuro)

東京大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40305496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ポリエン化合物の生合成遺伝子の進化の様式と、酵素の活性機能相関を明らかにすることを目的とした。ポリエン tetrafibricin 産生菌より、その新規中間体 neotetrafibricin の構造を同定し、生合成遺伝子クラスターを取得した。ポリエン合成酵素の遺伝子比較から、ケトシンテースドメイン中の、スターター基質特異性に関わるアミノ酸配列を見出した。ポリケタイドの伸長基質供給酵素 AntE の立体構造解析、基質特異性の拡大に成功し、新規 antimycin 化合物の生産に成功した。本研究により、新規化合物生産のための遺伝子改変の基盤が構築された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the evolutionary relationship of polyketide synthases through comparison of the amino acid sequences of several polyene synthases. The chemical structure of a new precursor of a polyene, tetrafibricin, was determined, and the compound was named neotetrafibricin. The amino acid sequence of neotetrafibricin synthase was compared with other polyene synthases through bioinformatic ways, resulting in the finding of a key motif which determines a starter substrate specificity. In addition, we elucidated the crystal structure of AntE, an enzyme which provides a polyketide synthase with an extender unit. Based on AntE's structure, we enlarged the range of substrate specificity of AntE, leading to the production of new antimycin compounds. These results will pave the way for future studies to engineer module-type polyketide synthases.

研究分野：天然物化学、合成生物学

キーワード：ポリケタイド合成酵素 生合成 遺伝子

### 1. 研究開始当初の背景

I型ポリケタイド合成酵素(PKS)は複数の触媒ドメインが単一のポリペプチドに連なって存在するモジュール型酵素である。一回のポリケタイド伸長反応を触媒する触媒ドメイン集合体のことをモジュールと呼ぶ。PKSによるポリケタイド伸長の伸長は、ATドメインによる malonyl-CoA 等の伸張鎖基質の ACP へのロード、KS ドメインによるスターター基質に対しての malonyl-ACP の Claisen 縮合によって行われる(図1)。伸長反応後のβ位のケトン基は、KR ドメインによる還元、DH ドメインによる脱水、ER ドメインによる水素付加を経て、メチレンへと変換される。KR、DH、ER ドメインはすべてに保存されてはならず、その組み合わせによりβ位の還元度の異なる多様なポリケタイド鎖が形成される。天然における I 型 PKS 反応の多様性は遺伝子配列の重複、相同組換えによるモジュール、触媒ドメインの組み合わせの多様化によって達成されてきた。その組み合わせを人為的にデザインして新規化合物を合成する酵素を作り出す試みがこれまでなされてきたが、各触媒ドメインの基質特異性が厳密であるため、組換え後の酵素が生成物合成活性を失う、あるいは収量が大幅に低下するケースがほとんどであった[Weissman *Nat. Prod. Rep.* **33**, 203, 2016]。そこで、どのような改変が酵素に受け入れられるか解明することが、今後の PKS 改変研究にとって重要である。

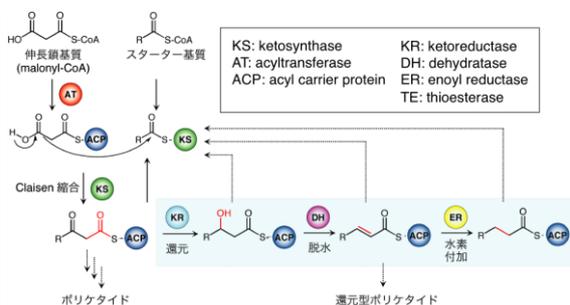


図1 ポリケタイド合成反応

### 2. 研究の目的

本研究では、mediomycin、ECO-02301 のポリエン化合物を合成する I 型 PKS のモジュール構造の進化機構に注目する。これらの複数の PKS 遺伝子は各モジュール同士の触媒ドメインの相同性が非常に高く、触媒機能と構造の比較に適している。放線菌 *Streptomyces blastomyces* の mediomycin 生合成遺伝子クラスターを元に、本申請課題にて見出した PKS 遺伝子の進化の法則に基づいて組換えを行った改変型 PKS 遺伝子を異種発現し、新規物質創出系の構築につなげる。これによって、モジュール構造の組み合わせによる新規 I 型 PKS 酵素を生み出すための方法論を構築する。本研究の結果、「PKS 遺伝子の進化の法則に従って遺伝子の改変を行い、微生物体内での異種発現によって新規物質生産を

行う」ことが可能となる。本研究で得られる知見を他の有用物質生産 I 型 PKS に適応することで、非天然型有用物質を生産する PKS を創出可能となる。PKS 酵素の進化の法則を酵素改変に応用した例はなく、本研究でその方法論を提供することの学術的価値は非常に大きいと考えられた。

### 3. 研究の方法

ポリエン化合物 mediomycin、ECO-02301 合成に関わる I 型 PKS 遺伝子の各触媒ドメインの系統樹解析を行うことによって、DHn-KSn+1 のドメインが一つのセットとなって相同組換えが起こる新規機構を提唱した。この機構に基づいて、DHn-KSn+1 を一単位としてモジュール構造を組替えることができる。具体的には、medPKS DH6-KS7 と DH8-KS9 の入れ替え、medPKS DH19-KS20 の欠損を行い、ECO-02301 型の水酸基、ペンタエンの部分構造を持つ非天然型 mediomycin の生成を行うことが可能となる。本研究によって、多様なポリエン化合物の生合成遺伝子の進化の様式と、酵素の活性機能相関を明らかにし、更なる遺伝子改変の基盤を構築する。特にスターター基質、伸長基質の導入に関わる酵素部位に注目する。

#### (1) ポリエン生合成遺伝子の配列解析

ポリエン化合物 mediomycin、ECO-02301 合成に関わる I 型 PKS の系統樹解析の結果、各モジュール中の KS、DH ドメインは、それぞれ受け入れる中間体のβ位の構造に応じて、それぞれ相同性を持つことが判明した。解析の過程で mediomycinKS7 (medKS7) と ECO-02301KS9 (ecoKS9)、medDH6 と ecoDH8 はそれぞれ高い相同性を持つことが示された。そこで、mediomycin 合成 PKS モジュール 6-7 の DH-KR-ACP-KS が自身のモジュール 8-9 と相同組換えによって入れ替わることで ECO-02301 合成 PKS へと進化したという仮説が提示された。実際に mediomycin と ECO-02301 は対応する構造を持つ(図2 赤、黄括弧)。このことより、DHn-KSn+1 のドメインが一つのセットとなって相同組換えが起き、PKS 酵素が新しい活性を獲得する機構が提唱できる。この機構により、medPKS DH6-KS7(図2 赤)と DH8-KS9(図2 黄)を入れ替えても、その下流のポリケタイド伸長反応は進行し、水酸基の位置が変化した非天然型 mediomycin が生成することが期待される。また、mediomycin のモジュール 19-20 間の構造は ECO-02301 には存在しない。よって、medPKS DH19-KS20 を遺伝子中より欠損し、mediomycin 構造中部のヘキサエンがペンタエンへと変換された構造を合成する PKS 遺伝子構造を構築する。設計した PKS 遺伝子を異種放線菌宿主にて発現し、非天然型 mediomycin の生産を試みる。

発現ベクターとして、pCC01 を構築する。まず、市販品の pCC1fos fosmid (Epicenter)を

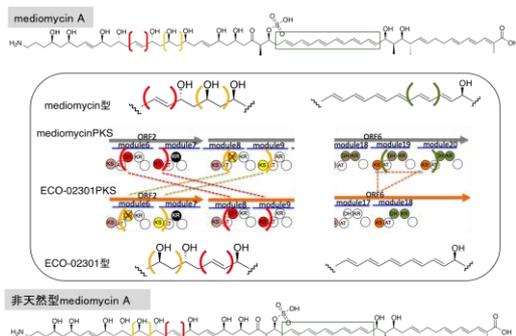


図2 非天然型 mediomycin 生産のための遺伝子設計

ベースとして、酵母での複製基点、放線菌の染色体組み込みエレメントを付加する。そこに、mediomycin 合成 PKS 遺伝子クラスターの両端の配列 100 bp を付加し、pCC01 を構築する。pCC01 構築には、in-fusion システム (Takara)、大腸菌生体内での組換え機構を用いた RED-ET システム [Zhang *Nat. Genet.* **20**, 123, 1998] を用いて行う。得られた pCC01 と mediomycin を生産する放線菌 *S. blastomyces* クロモソームを酵母 *Saccharomyces cerevisiae* スフェロプラストに導入し、相同組換えを起こすことで、mediomycin 遺伝子クラスターをベクター pCC01 上に取得する。目的の遺伝子配列を持つベクター (pCC01-med) を保持する酵母クローンを選択後、核酸を抽出し、接合伝達が可能 ET12567 大腸菌宿主に形質転換する。その後、接合伝達によりベクターを放線菌宿主にベクターを導入する。宿主には遺伝子操作が容易な放線菌 *Streptomyces lividans*、大規模なゲノム欠損株であり二次代謝産物の合成に適した *Streptomyces avermitilis* SUKA22 株を用いる [Komatsu *ACS Synth. Biol.* **2**, 384, 2013]。遺伝子の発現量が少なく、生成物の収量が少ない場合には、遺伝子のプロモーター領域を高発現型の *ermE* プロモーター、*thipA* プロモーターに大腸菌生体内で RED-ET システムによって組替えることによって、遺伝子を強制発現する。medPKS DH6-KS7 と DH8-KS9 の入れ替え、medPKS DH19-KS20 の PKS 遺伝子からの欠損を行い、変異型 PKS 遺伝子を創出し、水酸基、二重結合の構造が変化した非天然型 mediomycin の生成を行う (図 2)。遺伝子の組換えは pCC01-med を大腸菌宿主内に導入し、RED-ET システムを用いた組換え機構にて行う。得られた改変型 mediomycin 合成遺伝子クラスターを持つベクターを放線菌に接合伝達を用いて導入し、化合物の醗酵生産を行う。生成物を大量調製し、それらを LC-MS 分析、NMR 分析することによって、新規 polyene 化合物の構造決定を行う。

Mediomycin 類似の polyene 化合物は、tetrafabricin、lienomycin が存在する。これら

のスター基質は同じであるが、構造は二重結合、水酸基の位置、数がそれぞれ異なる。生産菌のゲノム情報を解読することで、それぞれの PKS 遺伝子配列の差異を見出し、その相違点から更なるモジュール構造の組換えを行う。これらの構造を合成する酵素遺伝子群を mediomycin 生合成経路と組み合わせることによって更なる多様な類縁体を合成することができる。

#### 4. 研究成果

##### (1) mediomycin の絶対立体配置の決定

これまで生合成遺伝子情報より mediomycin の立体配置が予想できることが示唆されていたが、有機化学的手法での絶対立体配置の同定を通して、その評価を試みた。mediomycin の N,C 両末端をそれぞれアセチル化、メチル化により保護の後オゾン分解により断片化、各断片に対し一級水酸基の保護及びアセトナイド化を施し、Trost 法により硫酸以外の 4 フラグメントについて絶対立体配置を決定した (図 3)。Trost 法により決定された立体は全て遺伝子情報より予測された立体と一致していたことから、遺伝子情報による mediomycin の立体決定の推定が信頼できることが示された。

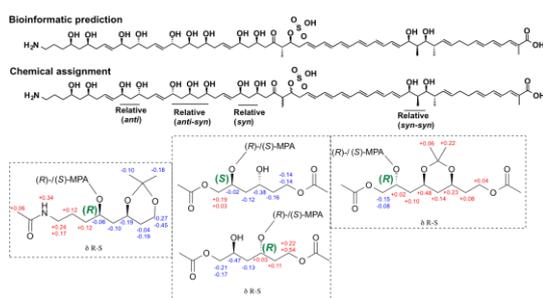


図3 mediomycin の立体配置の決定

##### (2) 新規直鎖ポリエン類縁体の同定

mediomycin と ECO-02301 は構造上類似しており、生合成遺伝子クラスターの分析から共通の祖先を持つことが示唆されたが、他にも同様の直鎖ポリエンは単離報告があり、それらの遺伝子比較により、より詳細な組替えメカニズムの解析が可能になることが推測された。そこで全合成のターゲットともなっている tetrafabricin の遺伝子クラスターの探索に着手した。興味深いことに、tetrafabricin 産生菌はより分子量の大きな新規化合物 neotetrafabricins (図 4) を与え、tetrafabricin はこの新規化合物の生合成中間体であることが示唆された。新規化合物の構造は MS 及び NMR により決定し、候補生合成遺伝子クラスターも取得した。

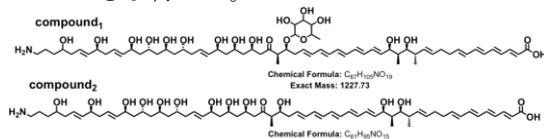


図4 neotetrafabricins (compound1,2)の化学構造

(3) 直鎖ポリエン系化合物の遺伝子進化  
neotetrafratricins、mediomycin、ECO-02301  
の生合成遺伝子のバイオインフォマティクス解析の結果、3つの遺伝子が共通の祖先を有すること、それに対してATドメインは例外であり、化合物特有の祖先を有することが判明した。また、N末端側（ポリケタイド鎖伸長反応の上流側）のモジュール同士の類似度が高く、N末端側で組替えが起こり、モジュールが増加していくことが示唆された。この解析結果を受けて3つの遺伝子配列を合わせて詳細に解析したところ、ketosynthaseのアミノ酸配列が上流側のPKSのβ-ケト修飾の違いによって、異なる系統樹上のクレードを形成していることを解明した。その結果、ketosynthase中に基質の修飾段階の違いを反映する特徴的なモチーフがあることを突き止めた(図5)。このモチーフは他のモジュール型PKSにも見られ、普遍的な配列と考えられる。

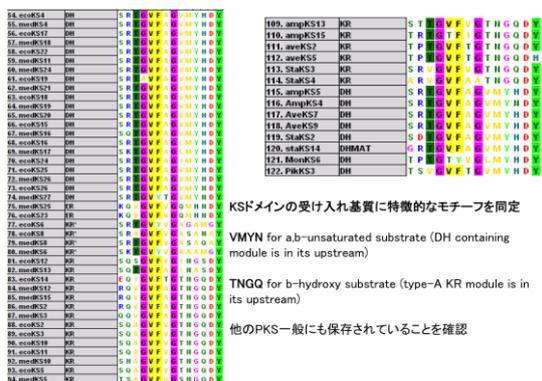


図5 ketosynthaseの配列比較による新規基質認識モチーフの同定

(4) ポリケタイド伸長鎖基質供給系の改変  
Antimycinの生合成においてポリケタイドの伸長基質を供給しているAntEの結晶化に成功し、その構造解析と機能改変に取り組んだ。変異体酵素は基質特異性が拡大し、AntE変異体を組み込んだ放線菌において非天然型基質を培地添加し発酵生産した結果、新規炭素骨格を有するantimycinの産生に成功した。

ポストゲノム時代においてゲノム情報を活用する上で遺伝子情報から化合物の構造情報を得ることが重要となる。本研究において、複雑な立体を有し固定配座をとらない直鎖ポリエンの立体決定にPKSの遺伝子解析が有効であることを示すことができた。さらにPKS酵素反応の特異性を遺伝子情報から推測できることも明らかとし、遺伝子組み換えメカニズムの解明と合わせて、これらの情報は遺伝子レベルでの合成生物学の発展に寄与し、リプログラミングの理論的基盤を与えることが期待される。化合物創出の取り組みについても、伸長基質の供給により炭素骨格を変える応用性の高い手法を用いて成功事例を示すことができたと考えられる。

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 5 件)

① 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.*, Vol. 10, 2014, pp. 648-655. DOI : 10.1038/nchembio.1573 査読あり

② Matsuda, Y., Wakimoto, T., Mori, T., Awakawa, T., Abe, I., Complete biosynthetic pathway of anditomin: nature's sophisticated synthetic route to a complex fungal meroterpenoid., *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 136, 2014, pp.15326-15336. DOI : 10.1021/ja508127q 査読あり

③ Matsuda, Y., Iwabuchi, T., Wakimoto, T., Awakawa, T., Abe, I., Uncovering the unusual D-ring construction in terretinin biosynthesis by collaboration of a multifunctional cytochrome P450 and a unique isomerase., *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 137, 2015, pp. 3393-3401. DOI : 10.1021/jacs.5b00570 査読あり

④ Zhang, L., Chen, J., Mori, T., Yan, Y., Liu, W., Abe, I., Crystallization, and preliminary X-ray diffraction analysis of AntE, a crotonyl-CoA carboxylase/reductase from *Streptomyces* sp. NRRL 2288., *Acta. Crystallogr. Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.*, Vol. 70, 2014, pp. 734-737. DOI : 10.1107/S2053230X14008371 査読あり

⑤ Zhang, L., Mori, T., Zheng, Q., Awakawa, T., Yan, Y., Liu, W., Abe, I., Rational control of polyketide extender units by structure-based engineering of a crotonyl-CoA carboxylase/reductase in antimycin biosynthesis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, Vol. 54, 2015, pp. 13462-13465. DOI : 10.1002/anie.201506899 査読あり

[学会発表] (計 5 件)

① 阿部 郁朗 「Engineered biosynthesis of medicinal natural products」 9<sup>th</sup> International symposium on chromatography of natural products (招待講演)、2014年5月26日-5月29日、Lublin, Poland

② 阿部 郁朗 「Biosynthesis of fungal meroterpenoids」 97<sup>th</sup> Canadian Chemistry

Conference and Exhibition (招待講演)、2014 年  
6 月 1 日-6 月 5 日、Vancouver, Canada

③阿部 郁朗「天然物の生合成工学」第 49  
回天然物化学談話会(招待講演)、2014 年 7 月  
2 日-7 月 4 日、倉敷市、岡山県

④ Abe, I., 「Engineered biosynthesis of  
medicinal natural products」2014 Fall Annual  
Convention of Pharmaceutical Society of Korea  
(招待講演)、2014 年 10 月 23 日-10 月 24 日、  
Gyeongju, Korea

⑤阿部 郁朗「複雑骨格天然物の生合成マシ  
ナリーの解明」日本化学会第 95 春期年会イ  
ブニングセッション(招待講演)、2015 年 3 月  
26 日、船橋市、千葉県

[その他]

東京大学大学院薬学系研究科天然物化学教  
室 <http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~tennen/head.htm>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

阿部 郁朗 (ABE, Ikuro)  
東京大学・大学院薬学系研究科・教授  
研究者番号：40305496

### (2)研究分担者

淡川 孝義 (AWAKAWA, Takayoshi)  
東京大学・大学院薬学系研究科・助教  
研究者番号：80609834