

平成 31 年 4 月 10 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成29年度

受付番号 784

氏 名 森田真布

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： ユタ州ソルトレイクシティ （国名： 米 国 ）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

分子多様性を創出する海洋アルカロイド生合成機構の解明

3. 派遣期間：平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

University of Utah, Department of Medicinal Chemistry

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

5-1) 研究の背景

ホヤや海綿といった海洋無脊椎動物からはユニークな化学構造をもった二次代謝産物（天然物）が数多く報告されている。これら海洋天然物の多くは、宿主動物ではなくその共生微生物により生合成されると考えられているが、海洋共生微生物は一般に単離・培養が難しいこともあり、生産生物および生合成経路の大部分は同定されていない。一方、天然物の複雑かつ多様な構造を創出する生合成酵素は、新たな物質をつくるための生体分子ツールとして有用である。すなわち、天然物の生合成研究は、「だれが」「どのように」天然物をつくるのか、という学術的な問いに答えるだけでなく、将来、医薬品を始めとする有用物質の創出に寄与することが期待される。本研究では、海洋無脊椎動物であるホヤに含まれる天然物に着目し、メタゲノム解析を中心とした培養非依存的な手法を用いて天然物生合成遺伝子の取得に取り組んだ。

5-2) 研究目的

1) ピリドアクリジン類の生合成研究

ピリドアクリジン類は、多環式芳香族アルカロイドの一群であり、抗がん、抗ウイルス、抗真菌活性などの生物活性を示すことが知られている。これまでにホヤや海綿など異なる生物門に属する海洋無脊椎動物から、100 種近くのピリドアクリジン類天然物が単離されているが、その生合成遺伝子および生産生物は明らかになっていない。先行研究によって行われた標識体の取り込み実験によれば、本化合物群の基本炭素骨格は、L-ドーパとトリプトファンを基質として構築されていることが知られている。さらに、その基本骨格が種々の修飾反応（酸化反応やアルキル化）を受けることで、ピリドアクリジン類が合成されるものと推定される。本課題では、海洋軟体動物の共生系からピリドアクリジン類の生合成遺伝子を探索し、簡単な基質から複雑・多様な化学構造を生み出すメカニズムを明らかにすることを目指した。

2) ビテレブアミドの生合成研究

ビテレブアミドは14個のアミノ酸からなる二環式ペプチドであり、微小管の重合阻害活性および白血病モデルマウスに対する延命効果が報告されている。新たな抗がん剤とし

て期待される一方で、化合物の希少性により現在は臨床試験前段階で止まっており、より詳細な生物活性試験への安定した化合物供給が望まれている。また、ビテレブアミドはランチオニン架橋構造やタンパク質を構成しないアミノ酸ユニットなど、ユニークな化学構造を有しており、新規の生合成反応がこの天然物の生合成経路から見出されることが期待される。そこで本課題では、メタゲノム解析と異種発現系を用いて生合成遺伝子の探索と生合成機構の解明に挑戦した。

3) 新規ゲラニル基転移酵素の機能解析

シアノバクテリアからは、多くの環状ペプチド天然物（シアノバクチン類）とその生合成経路が発見されている。合成生物学分野においては、シアノバクチン生合成酵素の遺伝子（群）を利用してペプチド化合物ライブラリーを構築し、医薬品探索に応用する試みが行われている（米国エネルギー省主導の研究課題）。すなわち、個々の生合成酵素とその遺伝子は有用な低分子修飾ツールとして期待されており、ゆえに新たな生合成酵素の発見と機能解析は重要な基礎研究として位置付けられている。こうした背景のもと、本研究では、これまで機能が未知であったシアノバクチン生合成遺伝子の機能解析および天然物の構造決定に取り組んだ。

5-3) 研究の遂行状況および成果

1) ピリドアクリジン類の生合成研究

【ホヤのメタゲノム解析】これまでに単離されたピリドアクリジン類の化学構造および食餌実験の先行研究より、本天然物の骨格は、トリプトファンから誘導されるキヌラミンとドーパから誘導されるキノン誘導体の縮合反応により構築されると推定された。また、前述のように本化合物群は異なる生物門に属する海洋無脊椎動物から単離されている。このことから、本アルカロイドは宿主動物ではなく、共生微生物により生合成されるのではないかと仮定された。この仮定に基づき、パプアニューギニア産のホヤ2検体 *Lissoclinum* 属のメタゲノムについて、ショットガンシーケンシングとアセンブリが行われた。前述の推定生合成経路に基づき、インフォマティクスによる生合成遺伝子の探索を行ったが、候補遺伝子（群）は細菌メタゲノム中からは見

出されなかった。

【メタゲノムライブラリーの構築とスクリーニング】インフォマティクスによる遺伝子探索と並行して、ホヤ共生細菌のメタゲノムライブラリーを作製し、スクリーニングを試みた。ここでは、断片長 30–40 kbp のメタゲノムを大腸菌用ベクターに挿入し、大腸菌を宿主としたライブラリーを構築した。その結果、十分なサイズのライブラリーを得ることができ、およそ 470,000 の大腸菌クローンの機能性スクリーニングを行った。機能性スクリーニングには、ピリドアクリジン類が鮮やかな赤色から橙色の色素であることを利用した。推定基質（トリプトファン、キヌラミン、チロシン、ドーパ、ドーパミン、*N*-アセチルドーパミン）を加えた寒天培地上で、ピリドアクリジン生合成酵素群の機能性スクリーニングを行ったが、陽性クローンは検出されなかった。

【ホヤのトランスクリプトーム解析】これまで海洋天然物の多くは、宿主ではなく共生微生物によって生合成されると考えられてきた。しかし、当研究室の最新研究結果（未発表）から、海洋軟体動物に由来する天然物のいくつかは、宿主である動物により生合成されることが分かってきた。この結果と前述したメタゲノム解析およびメタゲノムライブラリーのスクリーニング結果を鑑みて、本研究ではホヤで転写使用されている遺伝子の解析を行った。まず、メタゲノム解析で用いたものと同じ *Lissoclinum* 属の 2 検体を用い、抽出した RNA から逆転写酵素を用いて完全長 cDNA を合成し、およそ 0.5–10 kbp 長の cDNA を酵母–大腸菌ベクターに挿入し、ライブラリーとして保存した。しかし、得られたライブラリーのサイズは小さく、約 1000 クローンであった。また、同じ検体の RNA サンプルを用いてトランスクリプトーム解析を試みたものの、本化合物に限らず二次代謝に関わる遺伝子が十分に網羅されていないことが分かった。本実験に用いた生物試料は 2018 年の時点で採集から 7 年が経過したサンプルであり、RNA 実験には適していない可能性が示唆された。そこで、2018 年ソロモン諸島にてピリドアクリジン類を含有する新たな生物試料（4 検体）の採集を行った。現在、

これらの新しい生物検体を用いて cDNA ライブラリーの構築とトランスクリプトーム解析が進められている。

2) ビテレブアミドの生合成研究

【ビテレブアミド生合成遺伝子群の探索】

ビテレブアミドを含有するホヤ 2 検体（オレゴン州立大学、Kerry McPhail 教授より供与）のショットガンシーケンシングを行った。アセンブリ後に抽出された細菌ゲノムを用いて生合成遺伝子クラスターの探索を行い、その候補遺伝子を得ることができた。研究開始当初、ビテレブアミドはその構造にランチオニン架橋やデヒドロアラニンを含んでいることから、ランチペプチド類と同様にリボソーム上で合成され翻訳後に修飾を受けるペプチド分子（RiPPs）だと推定されていた。しかし、メタゲノム上に RiPPs の生合成遺伝子群はなく、ビテレブアミドの構造に対応した計 14 モジュール、44 ドメインから構成される非リボソームペプチド合成酵素

（NRPS）の遺伝子が見出された。なお、NRPS 遺伝子の近傍には、ABC トランスポーター、メチル基転移酵素、エノラーゼ、コハク酸デヒドロゲナーゼ、酸化酵素（機能はいずれも推定）等の遺伝子がコードされている。ビテレブアミドが有するいくつかの構造とアミノ酸は、NRPS による合成されるペプチド分子としては前例のない構造であり、新規の反応を触媒する天然物の生合成酵素が見出されることが期待される。

【ビテレブアミド生合成遺伝子の異種発現】

現在、見出したビテレブアミド生合成遺伝子群の機能解析を進めている。この遺伝子クラスターには 2 つの NRPS 遺伝子がコードされており、アデニル化（A）ドメインの推定基質は天然物の構造と良い一致を見せた。現在、各 A ドメインの基質特異性を異種発現と標識体を用いた実験系で調べている。最近、合成生物学分野においては NRPS の各ドメインを連結するリンカー部分の研究が進んでおり、各モジュールを人工的に組み替える試みが精力的に行われている。本課題においても、上記実験と並行して、ビテレブアミド NRPS の各モジュールを組み合わせ、人工ペプチドを大腸菌内で創出する試みを始めている。

3) 新規ゲラニル基転移酵素の機能解析

【生合成酵素の機能解析】本研究は、機能が未知であった淡水性シアノバクテリア PCC-7005 株のある遺伝子が、シアノバクチン天然物のチロシン残基をゲラニル化する酵素をコードしていることを明らかにした。シアノバクチン天然物は、リボソーム上で合成された後に翻訳後修飾を受ける RiPPs に分類される。本研究で明らかになったチロシン残基のゲラニル化は、シアノバクチン天然物の翻訳後修飾として前例のない反応であった。また、ゲラニル化は一般的にペプチド低分子の細胞膜透過性を向上させると考えられ、同定されたゲラニル基転移酵素は、ペプチド創薬のための新たな修飾ツールとなることが期待される。また、野生型の PCC_7005 株は極微量のシアノバクチンしか生産しないため、天然物の構造はこれまで明らかになっていなかった。本課題では、新規ゲラニル基転移酵素を用いて、シアノバクチン天然物を *in vitro* 合成し、NMR を用いた構造解析によりその化学構造を明らかにした。本課題で得られた天然物は、現在、抗菌活性などの生物活性試験が行われている（ヘルシンキ大学、Kaarina Sivonen 教授との共同研究）。

【生合成酵素の構造とエンジニアリング】は乳類に由来するタンパク質のプレニル基転移酵素や、糸状菌に由来する芳香族化合物のプレニル基転移酵素とは対照的に、細菌のペプチドプレニル基転移酵素の構造と機能については、これまで限られた知見しか得られていなかった。本課題では、イリノイ大学 Nair 教授との共同研究により、PCC_7005 株の新規ゲラニル基転移酵素の結晶化に成功し、X 線結晶構造解析を行った。この結晶自体は基質を含まないアポ体であったが、今回得られたシアノバクチン天然物のゲラニル基転移酵素と 2016 年に得られたプレニル基転移酵素の結晶構造を比較・解析することが可能になった。結晶構造を基にした変異体作製実験により、わずか 1 残基のアミノ酸側鎖がイソプレニル供与体の炭素鎖長選択性をコントロールしていること、変異導入により炭素鎖長の選択性と酵素活性の両方が同時に向上することを明らかにした。シアノバクチン天然物の修飾酵素は天然の基質だけでなく幅広いペプチドを基質として受け入れることが知られてい

る。今回作製されたプレニル基転移酵素の変異体は、天然のペプチド基質だけでなく、サイズ・アミノ酸配列ともに様々なペプチド分子のチロシン残基を化学選択的かつ高効率で修飾することを見出した。本課題で用いた人工改変ロジックを他のシアノバクチン類プレニル基転移酵素にも適用することで、今後、より多様な修飾様式をもつペプチド分子の創出が可能になるものと期待される。

5-5) 成果発表・関係学会への参加状況等

[学術論文]

1. Estrada, P.*; Morita, M.*; Hao, Y.*; Schmidt, E. W.; Nair, S. K. A single amino acid switch alters the isoprene donor specificity in ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide prenyltransferases. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 8124–8127. *co-first authors
2. Morita, M.*; Hao, Y.*; Jokela, J. K.; Sardar, D.; Lin, Z.; Sivonen, K.; Nair, S. K.; Schmidt, E. W. Post-translational tyrosine geranylation in cyanobactin biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 6044–6048. *co-first authors
3. Morita, M.; Schmidt, E. W. Parallel lives of symbionts and hosts: chemical mutualism in marine animals. *Nat. Prod. Rep.* **2018**, *35*, 357–378.
4. Sardar, D.; Hao, Y.; Lin, Z.; Morita, M.; Nair, S. K.; Schmidt, E. W. Enzymatic N- and C-protection in cyanobactin RiPP natural products. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 2884–2887.
5. Hao, Y.; Pierce, E.; Roe, D.; Morita, M.; McIntosh, J. A.; Agarwal, V.; Cheatham III, T. E.; Schmidt, E. W.; Nair, S. K. Molecular basis for the broad substrate selectivity of a peptide prenyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2016**, *113*, 14037–14042.

[学会発表]

1. Morita, M.; Hao, Y.; Sardar, D.; Lin, Z.; Jokela, J. K.; Sivonen, K. Nair, S. K.; Schmidt, E. W. Peptide geranylation by an ABBA prenyltransferase. Society of Industrial Microbiology and Biotechnology Meeting, Tampa, FL, January 2018 (ポスター)