

実施課題名 超微量生合成中間体の構造解析及び高感度NMRを用いた生合成経路解析手法の構築

【背景】

非常に複雑で巨大な分子骨格を有する二次代謝産物の生合成機構の解明を行った結果、未知の生合成中間体や、新規二次代謝産物の獲得に成功した。しかしながら、これらの得られた量は超微量であり、その化学構造の解明には高感度NMR装置が必要不可欠であった。そこで、超微量生合成中間体の構造を解明し、全生合成経路の解明のために、高感度NMRを用いた生合成経路解析手法の構築および、分子多様性創出機構の解明を行うこととした。

【実施内容】

メロテルペノイドなどの、非常に複雑で巨大な分子骨格を有する糸状菌の二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターを取得した後に、糸状菌 *Aspergillus oryzae* を宿主とした異種発現系を順次構築した。その代謝物を GC-MSなどを用いて分析したところ、導入遺伝子特異的な代謝産物の生成が確認された。そこで、その代謝産物を HPLC などの装置を用いて精製し、得られた化合物を重クロロホルムなどの各種重溶媒に溶解させ、専用のチューブに封入後、理化学研究所の Bruker Avance III HD (900 MHz) NMR 装置にて各種スペクトル測定を行った。測定内容としては、主に  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR, DQF-COSY, TOCSY, NOESY, HMQC, HMBC をおよそ1週間の間、測定した。得られた各種スペクトルを解析することで、化合物の相対立体配置を含めた化学構造を解明した。絶対立体構造については、改良モッシャー法を用いて MTPA エステルへと誘導後、 $^1\text{H}$ -NMR スペクトルを測定することで絶対立体構造についても決定した。これらを繰り返すことで、多段階反応からなる二次代謝産物の生合成経路を解明した。

● Fig.1

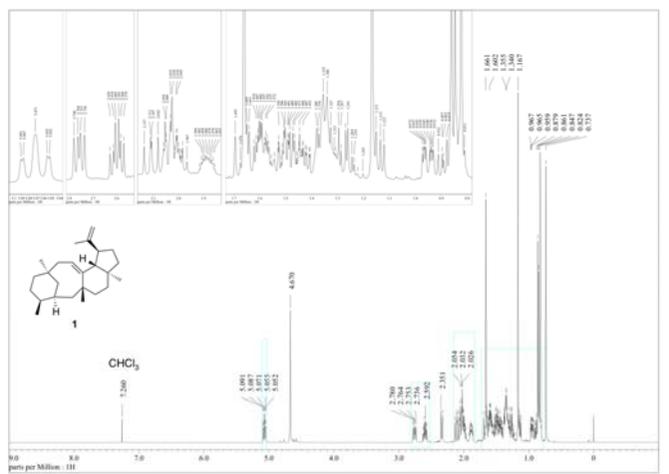


Fig.1  $^1\text{H}$  NMR spectrum of astellifadiene in  $\text{CDCl}_3$

● Fig.2

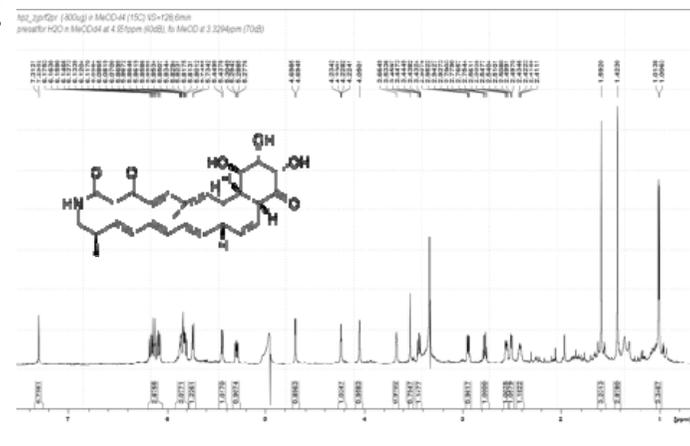


Fig.2  $^1\text{H}$  NMR spectrum of niizalactam C in  $\text{CD}_3\text{OD}$

NMR 共用プラットフォーム 特定課題利用  
利用報告書

申請番号	PF012	課題受付番号	PF14-100-004
実施機関名	東京大学		
実施部署名	大学院薬学系研究科・天然物化学教室		
実施責任者管理職名・氏名	職名	教授	氏名 阿部 郁朗
実施部署所在地	東京都文京区本郷 7-3-1		
利用課題名	超微量生合成中間体の構造解析及び高感度 NMR を用いた生合成経路解析手法の構築		
本課題の概要・目的	<p>生物はさまざまな化学構造を有する二次代謝産物を生産し、その中には複雑な骨格を有するものも多い。近年では次世代シーケンサーなどの技術開発により、それら二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターを解明、取得することが比較的容易となっており、微生物を宿主とした異種発現を行うことで、多段階反応からなる二次代謝産物の創出、さらにその生合成機構を明らかにすることが可能となってきた。我々は、糸状菌の二次代謝産物であるメロテルペノイドなど、非常に複雑で巨大な分子骨格を有する二次代謝産物の生合成機構の解明を行った結果、未知の生合成中間体や、新規二次代謝産物の獲得に成功した。しかしながら、これらの得られた量は超微量であり、その化学構造の解明には高感度 NMR 装置が必要不可欠であった。そこで、超微量生合成中間体の構造を解明し、全生合成経路の解明のために、高感度 NMR を用いた生合成経路解析手法の構築および、分子多様性創出機構の解明を行うこととした。</p>		
利用実施時期、及び期間	<p>平成 26 年 9 月 29 日～平成 28 年 3 月 14 日</p> <p>総利用日数：140 日</p> <p>当初計画どおり・当初計画変更 (変更理由)</p>		
利用施設 理化学研究所	NMR 装置 (該当部分に ○)	<p>利用装置①</p> <p>・ ( ) 溶液 600MHz、( ) 溶液 700MHz、( ) 溶液 800MHz、( ○ ) 溶液 900MHz ( ) 固体 700MHz、( ) 固体 900MHz</p> <p>利用期間 1：平成 26 年 9 月 29 日～平成 26 年 10 月 2 日          利用期間 2：平成 26 年 10 月 30 日～平成 26 年 11 月 5 日          利用期間 3：平成 26 年 12 月 8 日～平成 26 年 12 月 15 日          利用期間 4：平成 27 年 1 月 7 日～平成 27 年 1 月 13 日          利用期間 5：平成 27 年 3 月 2 日～平成 27 年 3 月 9 日          利用期間 6：平成 27 年 4 月 21 日～平成 27 年 4 月 28 日          利用期間 7：平成 27 年 5 月 14 日～平成 27 年 5 月 22 日          利用期間 8：平成 27 年 5 月 26 日～平成 27 年 6 月 2 日          利用期間 9：平成 27 年 7 月 1 日～平成 27 年 7 月 7 日          利用期間 10：平成 27 年 8 月 3 日～平成 27 年 8 月 17 日          利用期間 11：平成 27 年 9 月 24 日～平成 27 年 10 月 5 日          利用期間 12：平成 27 年 10 月 22 日～平成 27 年 10 月 27 日</p>	

		<p>利用期間 13 : 平成 27 年 11 月 4 日～平成 27 年 11 月 13 日          利用期間 14 : 平成 27 年 12 月 15 日～平成 27 年 12 月 22 日          利用期間 15 : 平成 28 年 1 月 8 日～平成 28 年 1 月 15 日          利用期間 16 : 平成 28 年 2 月 3 日～平成 28 年 2 月 15 日          利用期間 17 : 平成 28 年 3 月 7 日～平成 28 年 3 月 14 日</p> <hr/> <p>利用装置②</p> <p>・( <input type="checkbox"/> ) 溶液 600MHz、( <input type="checkbox"/> ) 溶液 700MHz、( <input type="checkbox"/> ) 溶液 800MHz、( <input type="checkbox"/> ) 溶液 900MHz          ( <input type="checkbox"/> ) 固体 700MHz、( <input type="checkbox"/> ) 固体 900MHz</p> <p>利用期間 1 : 平成 26 年 12 月 26 日～平成 27 年 1 月 5 日          利用期間 2 : 平成 年 月 日～平成 年 月 日          利用期間 3 : 平成 年 月 日～平成 年 月 日</p>
その他の 利用施設		
成果の 概要	実施内容	<p>メロテルペノイドなどの、非常に複雑で巨大な分子骨格を有する糸状菌の二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターを取得した後に、糸状菌 <i>Aspergillus oryzae</i> を宿主とした異種発現系を順次構築した。その代謝物を GC-MS などを用いて分析したところ、導入遺伝子特異的な代謝産物の生成が確認された。そこで、その代謝産物を HPLC などの装置を用いて精製し、得られた化合物を重クロロホルムなどの各種重溶媒に溶解させ、専用のチューブに封入後、理化学研究所の Bruker Avance III HD (900 MHz) NMR 装置にて各種スペクトル測定を行った。測定内容としては、主に <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, DQF-COSY, TOCSY, NOESY, HMQC, HMBC をおよそ 1 週間の間、測定した。得られた各種スペクトルを解析することで、化合物の相対立体配置を含めた化学構造を解明した。絶対立体構造については、改良モッシャー法を用いて MTPA エステルへと誘導後、<sup>1</sup>H-NMR スペクトルを測定することで絶対立体構造についても決定した。これらを繰り返すことで、多段階反応からなる二次代謝産物の生合成経路を解明した。</p>
	本課題により得られた成果と当初目標との比較	<p>本課題により得られた成果は、当初の目標と比較して期待以上の成果を上げることが出来たと言える。多段階反応からなる二次代謝産物の各生合成中間体の中には生成量が超微量の物質もあり、その化学構造の解明には高い S/N 比を有する高感度 NMR 装置が必要不可欠であった。さらに、たとえ比較的少量の生合成中間体を得られたとしても、複雑で巨大な分子骨格を有している場合はスペクトルが非常に狭い領域に密集してしまうため、高分解能を有する NMR 装置が必要不可欠であった。理化学研究所の Bruker Avance III HD (900 MHz) NMR 装置は高感度、高分解能を有しており、また、測定に関しても専門スタッフの高い技術により、鮮明な各種スペクトルが得られた。その結果、成果発表で決定された Dietziamides や Niizalactams、Astellifadiene などの化学構造はいずれも、500 MHz NMR 装置で測定したデータからは解明することが出来ず、理化学研究所の Bruker Avance III HD (900 MHz) NMR 装置を測定することで初めて炭素-炭素結合や、炭素-水素結合の相関が明らかとなり、構造解析が大幅に容易となった。これらのデータが決定的な証拠となり、さまざまな化学構造を有する様々な二次代謝産物の解析に成功した。</p>

	<p>その中には新規骨格を有する新規生合成中間体も含まれており、これまで未解明であったセスタテルペンの生合成経路の解明、および複合培養法により得られた二次代謝産物の分子多様性創出機構の解明に成功した。</p>
<p>成果発表</p>	<p>◆論文</p> <p>1) Dietziamides, novel tetramic acid dimers from <i>Dietzia timorensis</i> MZ-3 with antioxidative activity; Hoshino, S., Wakimoto, T., <u>Zhang, H.</u>, Hayashi, F., Okada, M., Abe, I.; <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i>, <b>25</b>, 3953–3955 (2015)</p> <p>2) Niizalactams A–C, multicyclic macrolactams isolated from combined-culture of <i>Streptomyces</i> sp. with mycolic acid containing bacterium; Hoshino, S., Okada, M., Wakimoto, T., <u>Zhang, H.</u>, Hayashi, F., Onaka, H., Abe, I.; <i>J. Nat. Prod.</i>, <b>78</b>, 3011–3017 (2015)</p> <p>3) Astellifadiene, a unique tetracyclic fungal sesterterpene: structure determination by an NMR-coupled crystalline sponge method and elucidation of its biosynthesis; Matsuda, Y., Mitsuhashi, T., Lee, S., Hoshino, M., Mori, T., Okada, M., <u>Zhang, H.</u>, <u>Hayashi, F.</u>, Fujita, M., Abe, I. <i>Angew. Chem. Int. Ed.</i>, <b>55</b>, in press (2016) DOI: 10.1002/anie.201601448 (理研・東大共同プレス発表：理研 CLST トピックスへ)</p> <p>◆学会発表</p> <p>4) 複合培養法により <i>Streptomyces</i> 属放線菌から単離された新規 macrolactam 類の構造決定：○星野翔太郎<sup>1</sup>、張 恵平<sup>2</sup>、林 文晶<sup>2</sup>、岡田 正弘<sup>1</sup>、脇本 敏幸<sup>3</sup>、尾仲 宏康<sup>4</sup>、阿部 郁朗<sup>1</sup>〔<sup>1</sup>東大院薬、<sup>2</sup>理研、<sup>3</sup>北大院薬、<sup>4</sup>東大院農〕日本生薬学会第62回年会 平成27年9月11日—12日（岐阜）口頭発表 講演要旨集 2B-01 p. 81（優秀講演賞）</p> <p>5) 複合培養法を利用した <i>Streptomyces</i> 属放線菌からの新規薬用資源探索：○星野翔太郎<sup>1</sup>、岡田 正弘<sup>1</sup>、張 恵平<sup>2</sup>、林 文晶<sup>2</sup>、脇本 敏幸<sup>3</sup>、尾仲 宏康<sup>4</sup>、阿部 郁朗<sup>1</sup>〔<sup>1</sup>東大院薬、<sup>2</sup>理研、<sup>3</sup>北大院薬、<sup>4</sup>東大院農〕第6回食品薬学シンポジウム 2015年10月30日—31日（岡山）口頭発表（優秀発表賞）</p> <p>6) 複合培養法を用いた新規 macrolide 類の単離構造決定：星野 翔太郎<sup>1</sup>、岡田 正弘<sup>1</sup>、張 恵平<sup>2</sup>、脇本 敏幸<sup>3</sup>、林 文晶<sup>2</sup>、尾仲 宏康<sup>4</sup>、阿部 郁朗<sup>1</sup>〔<sup>1</sup>東大院薬、<sup>2</sup>理研、<sup>3</sup>北大院薬、<sup>4</sup>東大院農〕日本薬学会第136年会 2016年3月26日—29日（横浜）口頭発表</p>

今後の展開	<p>本課題により、高感度かつ高分解能を有する NMR 装置を用いることで、機能未知遺伝子の異種発現という単純な手法を用いながら、非常に複雑で巨大な分子骨格を有し、かつ超微量の二次代謝産物の化学構造を決定できることが明らかとなった。今後は、この手法を用いることにより、他の糸状菌由来の二次代謝産物だけでなく、様々な生物由来の多段階反応からなる二次代謝産物の創出機構やその生合成機構を明らかにするとともに、その過程で得られる未知の生合成中間体や、新規二次代謝産物の獲得およびその化学構造の決定を目指す予定である。</p> <p>さらに、これらの生合成酵素の X 線結晶構造解析や反応機構解析などを通じて、本酵素群に関する新たな知見の取得を目指すとともに、これらの酵素の機能改変による新規二次代謝産物の獲得なども試みたい。</p>
社会・経済への波及効果の見通し	<p>創薬のリード化合物となるライブラリーの構築が可能になる。超微量の未知の二次代謝産物の化学構造を Bruker Avance III HD (900 MHz) など、今回使用した高感度 NMR 装置を用いることで解明することが出来るため、様々な多段階反応からなる二次代謝産物の生合成機構の解明が可能になる。また、非常に複雑で巨大な分子骨格を有する二次代謝産物の化学構造についても高い S/N 比を有する同装置を用いることで解明することが出来る。遺伝子の設計図をもとに生合成システムを改変したり、立体構造情報をもとに酵素(生体触媒)の触媒機能を操作、あるいは、人為的に遺伝子を組み合わせ(コンビナトリアル生合成)微生物を生産工場とした物質生産系を構築したり、といったことも既に現実のものになりつつある。これにより希少有用物質の安定供給や天然物に匹敵する創薬リード化合物ライブラリーの構築が可能になる。</p>
利用における感想 (改善要望等を含む) 利用周辺環境に関する希望	<p>高感度かつ高分解能を有する NMR 装置を用いることができただけでなく、スタッフの方々の丁寧な対応によって、様々な測定方法を行うことが出来た結果、有意義なデータが得られた。</p>
今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待	<p>今後も継続的に利用可能な設備、システムであって頂きたい。</p>
成果公開延期の希望の有無	<p>( ) あり : (○) なし 「あり」の場合理由 :</p>
その他	<p>今後も継続的に利用可能な設備、システムであって頂きたい。</p>