

微生物ゲノム情報から天然物として新規の複素環を発見

～これまでに見えない骨格を有する天然物の発見に期待～

ポイント

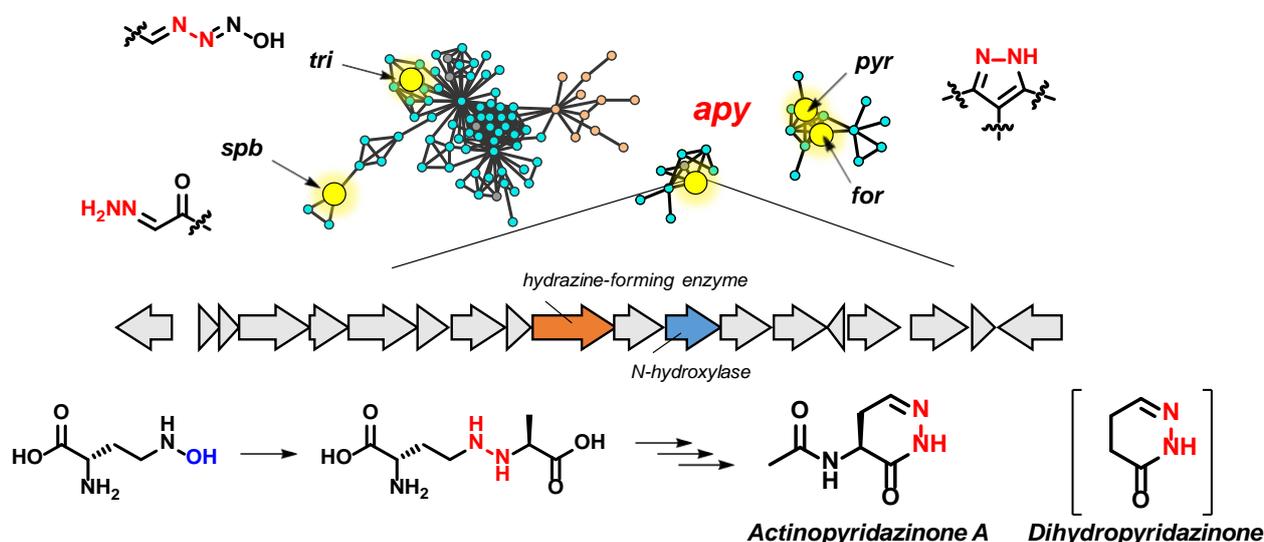
- ・ Dihydropyridazinone 環構造を有する初の天然物 actinopyridazinone を発見。
- ・ 全合成によりユニークな環構造を証明。
- ・ 微生物のもつヒドラジン生合成経路の多様性を解明。

概要

北海道大学大学院薬学研究院の松田研一講師、脇本敏幸教授、産業技術総合研究所の新家一男研究グループ長、東京大学大学院農学生命科学研究科の西山 真教授らの研究グループは、天然物では稀にしか見られない窒素-窒素 (N-N) 共有結合の形成を触媒する「ヒドラジン合成酵素*1」遺伝子を指標としたゲノムマイニング*2 を行い、これまで例のない複素環 dihydropyridazinone 環を有する actinopyridazinone A 及び B を発見しました。

Dihydropyridazinone 環は“wonder nucleus (医薬品リード化合物として有望な骨格)”とも称される有用な分子骨格であり、実際にいくつかの医薬品にも含まれます。今回、同じ骨格が天然から初めて発見されました。今後 dihydropyridazine 環の生合成機構を解明することで、本複素環の効率合成や効率的な構造展開を可能にする有用酵素が発見される可能性があります。また本研究で明らかにしたヒドラジン合成酵素の多様性にもとづきさらなるゲノムマイニングを行うことで、これまでに見えない骨格を有する天然物が今後も発見されることが期待されます。

なお、本研究成果は、2022年7月1日(金曜)公開の Journal of the American Chemical Society 誌に掲載されました。



新たなヒドラジン生合成経路がもたらす新規天然物 actinopyridazinone A

【背景】

ゲノムシーケンス技術が発展したことで、手に入るゲノム情報は指数関数的に増加しています。微生物が産生する天然有機化合物は、古くから医薬品そのものあるいはその原型として利用されてきましたが、未発見の有用天然物を作る能力が微生物にはまだまだ隠されていることが、昨今のゲノム解析によりわかってきました。窒素-窒素 (N-N) は多くの低分子医薬品にみられますが、天然物としては非常に珍しい化学構造です。実際に N-N 結合をもつ天然物は、これまで見つかった天然物のうちわずか 0.1% のみです。しかしゲノムデータベースを閲覧すると、放線菌*³をはじめとする様々な種類の細菌が、N-N 結合を形成する「ヒドラジン合成酵素」遺伝子を持っていることが判明しました。N-N 結合をもつ天然物の報告例は非常に少ないですが、実は様々な細菌がこうした天然物を生合成する潜在能力をもっていることが示唆されました。

【研究手法】

アメリカ国立生物工学情報センター (NCBI) によって提供されている、冗長性を省いたゲノムデータベース (nr データベース) を網羅的に探索し、ヒドラジン合成酵素遺伝子をもつ微生物の系統的多様性やその遺伝子を取り巻くゲノム領域の多様性を検証しました。ヒドラジン合成酵素をもつ放線菌 *Streptomyces* sp. MSD090630SC-05 に着目し、ヒドラジン*⁴を検出する比色定量法*⁵を利用して、N-N 結合をもつ未知の天然物を精製し、化学構造を解析しました。また推定構造を化学合成することで、その構造が正しいことを実証しました。さらに、遺伝子ノックアウトや組換えタンパク質の *in vitro**⁶機能解析を行い、得られた天然物がどのような仕組みで生合成されるのか明らかにしました。

【研究成果】

ゲノムデータベースから代表的なヒドラジン合成酵素遺伝子を 800 個以上の見出し、それを取り巻くゲノム領域をネットワーク解析したところ、ヒドラジン合成酵素遺伝子は様々な代謝酵素遺伝子と共存していることがわかりました。このことから、ヒドラジン合成酵素によって作られるヒドラジンが重要な中間体となり、様々な化学構造をもつ天然物が生合成されることが示唆されました。

1951 年、ソテツ科の植物から N-N 結合をもつ初めての天然物として macrozamin が発見されました。その化学構造の決定の際、加水分解で無機ヒドラジン N_2H_4 が生成することが N-N 結合の重要な証拠の一つになりました。本研究ではこの手法を利用し、加水分解によって生じる N_2H_4 を、N-N 結合をもつ未知天然物の検出に利用しました。ヒドラジン合成酵素遺伝子をもつ放線菌の代謝物を、 N_2H_4 を検出する比色定量法でスクリーニングしたところ、*Streptomyces* sp. MSD090630SC-05 の代謝物の酸分解によって N_2H_4 が生成しました。同法を指標に各種カラムクロマトグラフィーにて精製を行い、非常に親水性が高い 2 種類のアミノ酸誘導体 actinopyridazinone A 及び B を得ました。核磁気共鳴 (NMR) スペクトル解析から推定される構造を化学合成し、これらが天然物としてはこれまで例のない複素環である dihydropyridazinone 骨格を有することを証明しました。

生産菌の遺伝子ノックアウトや組換えタンパク質の *in vitro* 機能解析の結果、actinopyridazinone 類は L-ジアミノ酪酸 (L-DABA) と L-アラニン为原料とし、二つのアミノ酸が N-N 結合して生じるユニークなヒドラジン中間体 (DABA-Ala) を介して生合成されることが明らかになりました。これまでヒドラジン合成酵素は L-リシンの側鎖に N-N 結合を導入するもののみが知られていましたが、リシン以外の塩基性アミノ酸の側鎖に N-N 結合が導入されるのは今回が初めての例になります。さらに研究グループはヒドラジンの原料となる塩基性アミノ酸の多様性を検証するため、データベースを解析した結果、

新たに L-オルニチンの側鎖に N-N 結合を導入する代謝経路を発見しました。以上のことから、細菌はヒドラジン合成酵素を利用して様々なアミノ酸からヒドラジンを生合成することがわかりました。

【今後への期待】

Dihydropyridazinone 環は“wonder nucleus”とも称され、創薬研究で盛んに利用されてきた骨格で、実際いくつかの医薬品にも含まれます。今回、同じ骨格が天然から初めて発見されました。今後 dihydropyridazine 環の生合成機構を解明することで、本複素環の効率合成や効率的な構造展開を可能にする有用酵素が発見される可能性があります。また本研究で明らかにしたヒドラジン合成酵素の多様性にもとづきさらなるゲノムマイニングを行うことで、これまでにない骨格を有する天然物が今後も発見されることが期待されます。

【謝辞】

本研究は、文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「生合成リデザイン」、基盤B (21H02635)、若手研究 (19K16390、22K15302)、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED)「革新的中分子創薬技術の開発」、国立研究開発法人科学技術振興機構 (JST)、A-STEP、ACT-X「生命と化学」、北海道大学国際連携研究教育局バイオサーフェス創薬グローバルステーション、旭硝子財団、内藤記念科学振興財団、上原記念生命科学財団、住友財団、第一三共生命科学研究振興財団の支援を受けて行われました。

論文情報

論文名	A natural dihydropyridazinone scaffold generated from a unique substrate for a hydrazine forming-enzyme (特異な前駆体からヒドラジン合成酵素によって生合成されるジヒドロピリダジノン骨格含有天然物)
著者名	松田研一 ^{1,2*} 、有馬 陸 ¹ 、秋山智子 ¹ 、山田惟人 ¹ 、阿部 葉 ¹ 、末永 光 ³ 、橋本絢子 ⁴ 、新家一男 ³ 、西山 真 ^{5,6} 、脇本敏幸 ^{1,2*} (¹ 北海道大学大学院薬学研究院、 ² 北海道大学国際連携研究教育局バイオサーフェス創薬グローバルステーション、 ³ 産業技術総合研究所、 ⁴ バイオ産業情報化コンソーシアム、 ⁵ 東京大学大学院農学生命科学研究科、 ⁶ 東京大学微生物科学イノベーション連携研究機構) (*共同責任著者)
雑誌名	Journal of the American Chemical Society (化学全般の専門誌)
DOI	10.1021/jacs.2c05269
公表日	2022年7月1日(金)(オンライン公開)

お問い合わせ先

北海道大学大学院薬学研究院 教授 脇本敏幸（わきもととしゆき）

T E L 011-706-3239 F A X 011-706-3922 メール wakimoto@pharm.hokudai.ac.jp

U R L <https://www.pharm.hokudai.ac.jp/tennen/>

北海道大学大学院薬学研究院 講師 松田研一（まつだけんいち）

T E L 011-706-3241 F A X 011-706-3922 メール kematsuda@pharm.hokudai.ac.jp

配信元

北海道大学社会共創部広報課（〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目）

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【用語解説】

- *1 ヒドラジン合成酵素 … 塩基性アミノ酸残基の側鎖アミノ基ともう一分子のアミノ酸の α -アミノ基の間に N-N 結合を形成し、ヒドラジンを合成する酵素。N末端側のキュピンドメイン (cupin) と C末端側のメチオニル tRNA 合成酵素に類似したドメイン (MetRS-like) から構成される。反応の一段階目では MetRS-like ドメインによってアミノ酸が ATP 依存的に活性化され、N-水酸化された塩基性アミノ酸と結合することで、O-アシル中間体が生成される。反応の二段階目では、O-アシル中間体が cupin ドメインの機能によって分子内で転位し、ヒドラジンが生成される。
- *2 ゲノムマイニング …ゲノム情報を探索の指標とすることで、標的の新規性をある程度担保しつつ行う天然物探索の方法。膨大なゲノムデータを新規天然物（金脈）の眠る鉱山に見立てて「ゲノムマイニング」と呼ばれる。従来、天然物は生物活性や物理化学的な性質を指標に探索されてきたが、現在では探索資源の枯渇から、これまでと同じ方法で新規天然物を発見することは以前よりも格段に難しくなっている。そのため、従来の天然物探索を相補する方法として盛んに研究されている。
- *3 放線菌 … 様々な環境に生息するグラム陽性細菌の一種。生物活性物質を産生する能力が高く、これまで数多くの有用天然物が放線菌から発見されてきた。
- *4 ヒドラジン … 2つの窒素原子が単結合でつながった分子。
- *5 N_2H_4 を検出する比色定量法 … 酸性条件下、1分子の N_2H_4 は2分子の *p*-dimethylaminobenzaldehyde (DAB)と縮合しアジンに変換される。生じたアジンは485 nm に特徴的な UV 吸収波長をもち、高速液体クロマトグラフィーの UV 検出器で高感度に検出できる。
- *6 *in vitro* … 試験管内で組換え酵素と基質及び必要な補酵素類を混ぜ合わせることで酵素反応を検証する実験方法。系中の化合物を種々変更することで酵素機能を詳細に解析できる。