

## 微生物のもつ緻密な含窒素複素環合成経路を解明

～有用な複素環の効率的な合成法の確立に期待～

### ポイント

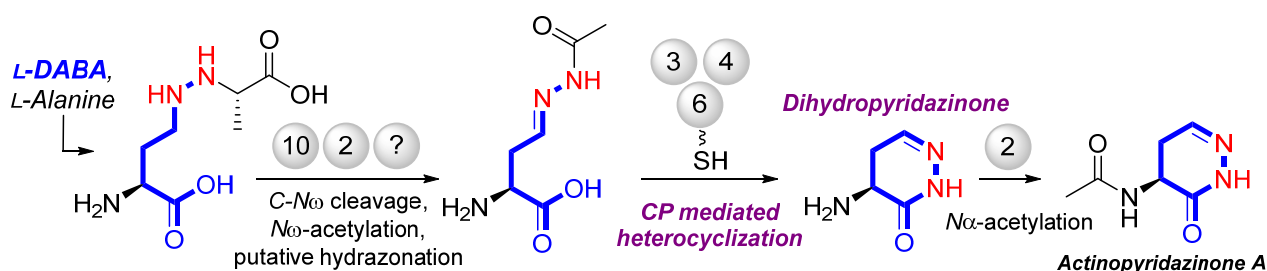
- ・ Actinopyridazinone の生合成経路の全容を解明。
- ・ Dihydropyridazinone 環が、保護基の着脱を鍵とする緻密な経路によって生合成されることを解明。
- ・ 微生物のもつ含窒素複素環合成経路の多様性を解明。

### 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の研究グループは、放線菌\*<sup>1</sup>が生産する天然物 actinopyridazinone が生体内でどのように作り出されるのか検証し、特徴的な dihydropyridazinone 環が「キャリアタンパク質\*<sup>2</sup>」を使った緻密な仕組みによって形成されることを明らかにしました。

含窒素複素環は、医薬品の開発現場で盛んに利用される有用な骨格であり、本研究で生合成機構が明らかになった dihydropyridazinone 環もいくつかの医薬品に含まれる有用な骨格です。今回明らかになった生合成の仕組みを活用することで、今後、医薬品原料となる有用な分子を効率よく合成できるようになることが期待されます。

なお、本研究の成果は、2023年5月17日公開の *Angewandte Chemie International Edition* 誌にオンライン掲載されました。



放線菌から見出された新規含窒素複素環の生合成機構

## 【背景】

環構造の構成元素に窒素を含む含窒素複素環は、低分子医薬品のおよそ6割に含まれる重要な部分構造です。こうした分子を、環境負荷を抑制しつつ効率的に合成できれば、有用物質の開発・製造コストの低減に繋がります。天然からはこれまでに多種多様な含窒素複素環が発見されてきました。これらが生体内で作り上げられる仕組みを理解できれば、効率的な合成技術として利用できる可能性があります。

一方、当研究グループはこれまでの研究で、放線菌から dihydropyridazinone 環を有する初めての天然物 actinopyridazinone を発見しました。本複素環はカルボニルとヒドラゾンが連続した環状アシルヒドラゾンであり、これまで複数の医薬品の母核として利用されてきた有用な骨格です。そこで本研究では、微生物が dihydropyridazinone 環を作り出す仕組みを分子レベルで明らかにすることを目指しました。

## 【研究手法】

一般に二次代謝産物<sup>\*3</sup>は、生体内に普遍的に存在する原料（一次代謝産物）がいくつかの化学反応によって変換されることで合成されます。この工程を1ステップずつ明らかにするために、生合成に関わると考えられる遺伝子をひとつずつノックアウト（破壊）し、代謝経路の各段階を遮断しました。経路を遮断することで新たに蓄積する代謝物は、変換過程の途中の「中筒体」と考えられます。これらの化学構造を調べることで代謝経路を考察しました。さらに大腸菌を用いて生合成酵素の組換えタンパク質を調製し、化学合成した中間体と試験管内で反応させることで、その機能を詳細に調べました。

## 【研究成果】

Actinopyridazinone の生合成に関わると予想した14個の遺伝子を個別にノックアウトすることで、生産に必須な遺伝子群を明らかにしました。また、ノックアウト株の代謝物を精査することで複数の中間体を検出し、その化学構造を明らかにしました。生産に必須な遺伝子がコードする生合成酵素の組換え体を調製し、それらが触媒する化学反応をひとつずつ試験管内で検証しました。以上により、actinopyridazinone の生合成経路のほぼ全ての工程を明らかにしました（図1）。

中でも興味深かったのは、dihydropyridazinone 環を形成する仕組みです。人工的に化合物を合成する有機合成化学においては、反応性の高い中間体に余分な構造を一時的に導入して、望まない副反応を抑制する工夫がごく一般的になされます。こうした構造は「保護基」と呼ばれ、役割を終えた後は除去されるため最終的な化学構造には残りません。その種類を適切に選択し、着脱のタイミングを厳密に制御することが、目的通りに化合物を合成するために必要不可欠です。今回明らかにした dihydropyridazinone 環の生合成機構においても反応性の高い中間体が生じるタイミングがありますが、微生物はあたかも有機合成化学者のように保護基を使いこなし、合成経路を緻密に設計していることが明らかになりました。具体的には、加水分解されやすいヒドラゾンが生じる前に予め保護基（アセチル基）を導入し、比較的安定なアシルヒドラゾンとして生合成します。続いて、分子の反対側にあるカルボニルを活性化しキャリアタンパク質と結合します。最後に保護基を除去（脱保護）することで露出したヒドラゾンが活性化されたカルボニルに攻撃し、dihydropyridazinone 環が構築されます。この過程で、キャリアタンパク質は、脱保護を触媒する加水分解酵素<sup>\*4</sup>と相互作用し、そのタイミングの制御に重要な役割を担っていると考えられます。各官能基の反応性を順序良く緻密に制御することで、本複素環の生合成が達成されていることが明らかになりました。

## 【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、微生物が進化の過程で獲得した dihydropyridazinone 環の緻密な生合成戦略が明らかになりました。この仕組みを利用することで、今後、医薬品の部品として重要な含窒素複素環を生物的に合成することが可能になると期待されます。

### 【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」、学術変革領域研究 (A) 「予知生合成科学」、基盤 B (16H06448、18H02581、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」、「感染症治療薬の新モダリティ天然物 2.0」、国立研究開発法人科学技術振興機構 (JST)、A-STEP (JPMJTR20US)、ACT-X 「生命と化学」 (JPMJAX201F)、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、テルモ生命科学振興財団、つくし奨学・研究基金の支援を受けて行われました。

### 論文情報

論文名	Carrier Protein Mediated Formation of the Dihydropyridazinone ring in Actinopyridazinone Biosynthesis (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	有馬 陸 <sup>1</sup> 、秋山智子 <sup>1</sup> 、新家一男 <sup>3</sup> 、松田研一 <sup>2*</sup> 、脇本敏幸 <sup>2*</sup> ( <sup>1</sup> 北海道大学大学院生命科学院、 <sup>2</sup> 北海道大学大学院薬学研究院、 <sup>3</sup> 産業技術総合研究所) (*共同責任著者)
雑誌名	Angewandte Chemie International Edition (化学全般の専門誌)
DOI	10.1002/anie.202305155
公表日	2023年5月17日(水)(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)

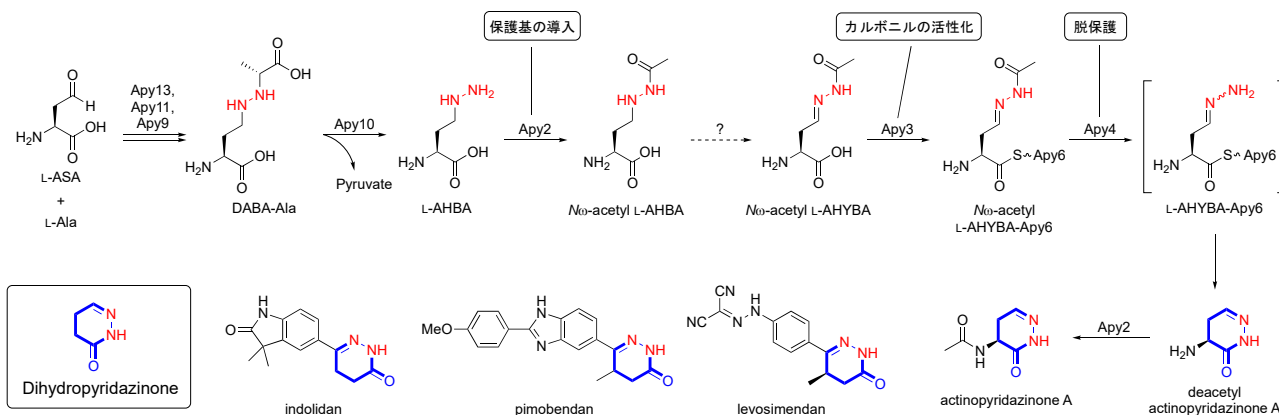
T E L 011-706-3241 F A X 011-706-3922 メール kematsuda@pharm.hokudai.ac.jp

### 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

## 【参考図】



**図1.** 本研究から明らかになったactinopyridazinoneの生合成経路。本化合物は一次代謝物であるアスパラギンセミアルデヒド (ASA) から9段階の工程を経て生合成されます。Apy6はdihydropyridazinone環形成の過程で働くキャリアタンパク質です。Dihydropyridazinone環を青で示し、環を構成する窒素原子を赤で示しました。Dihydropyridazinone環を含む医薬品の例としてindolidan、pimobendan、levosimendanを示しています。

## 【用語解説】

- \*1 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。
- \*2 キャリアタンパク質 … 代謝経路の中間体を一時的に結合するタンパク質の総称。化学的に不安定な中間体を外部の環境から保護する機能や、他の酵素と相互作用することで結合した中間体の効率的な変換を補助する役割がある。脂肪酸合成やアミノ酸合成、エネルギー代謝などの一次代謝経路に加え、二次代謝経路においても用いられる。
- \*3 二次代謝産物 … 代謝物のうち生命の維持に必須な一次代謝産物に対して、生命の維持に必ずしも必要ではない代謝物は二次代謝産物と総称されます。生物が生産する抗生物質や染料、香料などの有用な物質が含まれます。
- \*4 加水分解酵素 … 加水分解反応を触媒する酵素の総称で、様々なタイプが存在します。今回の酵素は触媒残基にセリンを用いるセリンプロテアーゼ型の酵素です。