

機関番号：12601
領域設定期間：平成28年～令和2年
領域番号：2805
研究領域名（和文）生物合成系の再設計による複雑骨格機能分子の革新的創成科学
研究領域名（英文）Creation of Complex Functional Molecules by Rational Redesign of Biosynthetic Machineries
領域代表者
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
交付決定額（領域設定期間全体）：（直接経費）1,106,300,000円

研究成果の概要

本領域研究は、先の新学術領域研究「生合成マシナリー：生物活性物質の構造多様性創出システムの解明と制御」（平成22～26年度、領域代表者：及川英秋）の格段の発展をめざすもので、今回は、生合成の「設計図を読み解く」から、さらに「新しい設計図を書く」方向に飛躍的な展開を図った。即ち、天然物構造多様性の遺伝子・酵素・反応の視点からの精密解析に基づき、新たに生合成工学や合成生物学の世界最先端の技術基盤を確立することで、生合成システムの合理的再構築による複雑骨格機能分子の革新的創成科学を新たな学術領域として展開した。いずれの研究課題も概ね計画通り順調に進捗し、質、量ともに充実した成果をあげることに成功した。

研究分野：複合領域、生体分子科学、生物分子化学

キーワード：生合成リデザイン、合成生物学、生合成工学、天然物化学、生物分子科学

1. 研究開始当初の背景

ポストゲノムの時代、多くの生物のゲノム情報が容易に入手可能で、ゲノムマイニング（遺伝子探索）が化合物の探索に直結する時代になった。先の「生合成マシナリー」では、さまざまな天然物の生合成遺伝子を取得し、微生物を宿主として異種発現、その生合成系を再構築して有用物質の生産を行うとともに、多段階の変換反応からなる分子多様性創出機構を明らかにした。次のブレークスルーは、「この生合成マシナリーを如何に活用するか」という点であり、生合成システムにさらに改良を加えることで、天然物を凌ぐ新規有用物質の創出や、希少有用天然物の大量、安定供給などが可能になる。生合成を利用した効率的な物質生産は、クリーンかつ経済的な新しい技術基盤として、医薬品など広く有用物質の安定供給を可能にするため、合成生物学は、新たな学術領域として大きな注目を集めており、資源が枯渇しつつある現代にあって、ますます重要になる。生合成システムの合理的再構築により、狙ったものを正確に作る、天然物を凌ぐ新規希少機能分子の大量安定供給が実現する。これら酵素が触媒する反応には、有機合成化学が格段に進歩した今日にあって、酵素のみが唯一効率よく行うことが可能なものも少なくなく、生体触媒を用いた合成法の利点は計り知れない。また、物質の単離構造決定など、生命現象を物質レベルで精密に記述できる点は、多くの天然物化学者が参画する本領域の強みであり、次世代天然物化学の発展には欠かせない。

2. 研究の目的

多くの生物のゲノム情報が容易に入手可能となり、ゲノムマイニング（遺伝子探索）により様々な天然物の生合成遺伝子を取得し、その生合成系を再構築することで天然物の生産が可能となりつつある。次のブレークスルーは、この生合成マシナリーを如何に活用するかという点であり、本研究領域では、生合成の「設計図を読み解く」から、さらに「新しい設計図を書く」方向に飛躍的な展開を図る。即ち、天然物構造多様性の遺伝子・酵素・反応の視点からの精密解析に基づき、新たに生合成工学や合成生物学の世界最先端の技術基盤を確立することで、生合成システムの合理的再構築による複雑骨格機能分子の革新的創成科学を新たな学術領域として展開することを目的とした。本領域で取り組むゲノム進化の機構解明や合成生物学の技術基盤の確立は、人類が全く新しい機能性分子創生技術を手にする将来へ向けた礎となる。

3. 研究の方法

生合成システムの合理的再構築による物質生産を考える上で、各生合成反応を触媒する酵素（生体触媒）の理解と応用が不可欠である。二次代謝酵素の中には、微妙な構造の違いで基質や反応様式が大きく変化するものがあり、これが天然物分子多様性を生み出す大きな要因の一つとなっている。一方で、高効率の遺伝子発現、代謝工学など、大量生産系構築のための革新的な手法の開発により、稀少有用物質の大量安定供給が可能になる。さらに、生合成システムの合理的再構築により、狙ったものを正確に作る、天然物を凌ぐ新規複雑骨格機能分子の大量安定供給が実現する。これを達成するため、A01 天然にないものをつくる、A02 稀少なものを大量につくる、A03 マシナリーの構造と機能の3つの研究項目を新たに設定した。これらはいずれも、本領域が、生合成工学、合成生物学の革新的技術基盤の確立、飛躍的展開を図る上で欠かせないものであり、三者が互いに密接に連携し、有機的かつ補完的な共同研究を組織することで、領域全体の、次世代天然物化学研究を強力に推進した。

4. 研究の成果

いずれの研究課題も概ね計画通り順調に進捗した。中には予想以上の大きな進展を見せるものもあり、質、量ともに充実した成果を挙げることができた。応募時、具体的な数値目標として、領域全体で5年間に、Nature/Science 3報、Nature 姉妹誌/PNAS 30報、JACS/ACIE 30報、論文総数 500報（先の「生合成マシナリー」では5年間で Nature 2報、Nature 姉妹誌/PNAS 20報、JACS/ACIE 22報、論文総数 440報）を目標としたが、大幅に上回るペースで印刷公表を重ね、Nature/Cell 2報、Nature 姉妹誌/PNAS 49報、JACS/ACIE 93報、論文総数 879報を達成した。また、領域内での共同研究は、現在進行中のものを含め 210件あり、着実に多くの優れた共著論文として結実した。スペースの都合上、計画研究を中心に、以下に概要を記述する。

研究項目 A01:天然にないものをつくる

本項目は、生合成システムを合理的に再構築し、狙ったものを正確につくる、非天然型新規機能性分子人工生合成のための革新的な手法の確立を目的とした。生合成工学や合成生物学の世界最先端革新的な技術基盤を確立し、次世代天然物化学を強力に展開することをめざした。

阿部らは、糸状菌由来メロテルペノイドの生合成において、多段階の劇的な骨格変換反応を触媒しその構造複雑化に決定的な役割を演じる、多機能型酵素の X 線結晶構造解析に成功し、酵素反応の立体構造基盤を明らかにした。また、立体構造に基づく合理的な部位特異的変異導入により、酵素触媒機能を拡大することで、一連の非天然型新規化合物の創出に成功し、複雑骨格天然物生合成の鍵となる酸化反応の再設計のために重要な知見を与えた。これ以外にも、ステロイド系抗生物質、ポリエン系ポリケタイド、インドールテルペノイド、デブシペプチド、スルホンアミド化合物など、複雑骨格天然物の構造多様化に重要な役割を演じる他の生合成酵素についても、同様に、酵素反応立体構造基盤の解明や生合成リデザインに成功した。

菅らは、非蛋白質性アミノ酸を導入できる人工改変無細胞翻訳系を用いて多様な擬天然ペプチド骨格を生成し、さらに、ペプチド修飾酵素等を触媒させることにより、既存の化合物ライブラリーの多様性をも凌駕する（1兆）、多彩な擬天然物骨格の創製を実現、無細胞翻訳系と異種由来ペプチド修飾酵素の融合による、簡便かつ高汎用性の、画期的な天然ペプチド骨格の合理的な設計手法を開発した。また、共同研究者の尾仲は微生物由来天然ペプチドの新規修飾酵素の発掘、生合成マシナリーの解明に成功した。

濱野らは、ポリカチオン修飾によって生体膜透過性と水溶性の相反する特徴を一挙に改善させることを目的として、これまでに、クリック官能基導入ポリリジンによる機能性低分子のポリカチオン化修飾の生合成リデザインと、微生物ゲノムマイニングと機能解析による新規抗生物質の創製に成功し、低分子および高分子の生理活性分子の生体膜透過性と水溶性を一挙に改善する基盤技術を確立した。生合成リデザインで創出する新規ポリカチオンおよび新規機能性低分子については、各種ペプチド化合物の生合成機構を解明した。

南らは、ポリケタイド関連化合物の生合成系リデザインによる新規生体機能分子の創製をめざし、骨格構築酵素の機能解析にはドメイン交換実験が有効であることを示し、従来法を利用する過程で顕在化した遺伝子導入における課題を一挙に解決する Hot spot-Knock-in 法を確立し、これを用いて、アブシジン酸、インドールジテルペノイド、キノコ由来天然物などの生合成にかかわる特徴的な酵素の同定・機能解析に成功した。また、テルペン環化酵素の遷移状態モデルを計算化学により設計し、酵素反応の遷移状態制御に成功した。

研究項目 A02:稀少なものを大量につくる

本研究項目は、大量生産系構築のための、物質生産過程の包括的解析、二次代謝経路の一次代謝化、革新的な手法の開発などを目的とした。いずれの研究課題も概ね計画通り順調に進捗した。

池田らは、汎用性の高い異種遺伝子群の効率的発現のためのモデル放線菌宿主を用いて、代謝フラックスや一次代謝改変による物質生成過程の包括的な解析を行い、合成生物学的な代謝改変による効率化生物を創成した。二次代謝産物の前駆物質の生成に最も関連のある中心代謝経路(解糖系、ペントースリン酸経路、TCA 回路)の改変による影響を包括的に検討した結果、培養後期に著量の 2-oxoglutarate を蓄積することを見出した。一方、ポリケチド及びペプチド化合物の生成過程では生合成酵素の翻訳後修飾に関与する酵素の性状の網羅的解析を行った結果、画期的な有用二次代謝産物生合成遺伝子の異種発現手法を開発し、生合成リデザインに成功した。

脇本らは、稀少有用海洋天然物など、高機能性物質の大量安定供給の実現をめざしている。多様な医薬品資源の生産能を有する海綿共生微生物に着目し、その遺伝子資源を利用した二次代謝産物の大量安定供給法の確立を目的とした。これまでに、海綿メタゲノムから数種のポリケチドおよびペプチド生合成遺伝子の同定に成功した。さらに、海洋放線菌由来の非リボソーム環状ペプチド類の生合成経路の解析を進め、新規ヘテロキラルペプチド環化酵素を同定し、その基質認識に関わる構造情報を明らかにし、ペプチド環化酵素のエンジニアリングへの礎を築いた。

渡辺らは、ゲノム情報に基づき、プロモーター置換や転写因子の活性化等により、休眠型未利用新規生合成システムの機能を覚醒させる新たな技術基盤の確立と、新規機能分子の生合成デザインの実現をめざした。キノコのモデル生物であるウシグソヒトヨタケに導入する天然物生合成遺伝子と、それに付与するプロモータ配列の検討を行った結果、キノコ由来の休眠型生合成遺伝子の強制発現と新規天然物の獲得に成功した。これ以外にも、糸状菌二次代謝生合成経路からのメチルイソシアネートの脱離を伴い新規骨格形成を触媒する新奇酵素の発見、S-アデノシルメチオニン依存性酵素により触媒されるペリ環状反応の発見、オレフィンの二重結合の異性化に関わる新規生合成経路の同定、発ガン性大腸菌代謝産物の中間体同定、Diels-alderase の endo-exo 選択性の構造機能解明、など数多くの優れた研究成果を挙げた。

梅野らは、宿主細胞に導入した人工生合成経路と宿主の代謝ネットワークとの融和的な生合成リデザイン、「二次代謝経路の一次代謝化」による機能性分子の高汎用性、高効率の生産系構築のための革新的な技術基盤の確立に挑戦した。これまでに、微生物内在経路とテルペノイド合成経路を共進化させることにより、テルペン生産量の拡大に成功した。さらなる最適化と、人工生合成経路への自律制御機能を賦与した生物生産系の開発や、細胞増殖と生産性を高度に両立した経路の確立を行い、細胞の中の様々な代謝物に応答するバイオセンサーをオンデマンドにつくる新技術、超天然色素合成経路の開発につなげた。

研究項目 A03: マシナリーの構造と機能

本研究項目は、有用二次代謝産物の生合成に関わる、新奇な反応を触媒する酵素群の網羅的に発掘し、その反応機構を解明するとともに、これら新規酵素群を組み合わせることで、分子多様性の創出と新規有用物質の生合成リデザインの実現をめざした。

江口らは、特徴ある化学構造と有用な生理活性を持つアミノグリコシド系抗生物質およびポリケチド系抗生物質を中心とした生合成系に焦点を絞り、その生合成マシナリーの解明とリデザインによる非天然型天然物生産への応用を最終的な目的とする。現在までに、数種の生合成酵素の結晶構造解析と酵素反応の立体構造基盤の解明に成功し、その生合成リデザインへの基盤を確立した。加えて、長年懸案となっていた、モジュール型ポリケチド合成酵素における transAT と ACP のタンパク間相互作用と動的構造変化を結晶構造解析により解明した点は特筆に値する。

大利らは、多価不飽和脂肪酸生合成に関与する反復型ポリケチド合成酵素と新規アミド結合形成酵素を中心にそのマシナリーの詳細の解明と応用に取り組んだ。酵素のキャリアープロテインの解析を行い、そのエンジニアリングにより 250%以上の収量の不飽和脂肪酸合成系の構築に成功した。また、細菌の細胞壁成分合成に関わる新規異性化酵素を同定した。ペプチドの不安定性を解決するペプチド結合の置換技術の一例として大変興味深い疑似ペプチドを放線菌から見出し、その生合成マシナリーの詳細を初めて明らかにするなど、画期的な成果を挙げた。

葛山らは、「抗生物質ホルミシス」現象に基づく休眠遺伝子の覚醒法を多様な放線菌に適用して休眠遺伝子を覚醒させることで、これまでに人類が手にすることができなかった革新的な生合成マシナリーの開拓を目的とした。これまでに本現象に基づく休眠遺伝子の覚醒法を用いて、新規骨格であるイソインドリノン骨格を含むポリケチド化合物の同定に成功した。また、特異なプレニル環であるシクロラバンデュリルジリン酸を構築する酵素の X 線結晶構造解析とマシナリーの解明、さらに、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるポリケチド化合物トリコスタチン A の構成単位であるヒドロキサム酸基の生合成機構などを世界に先駆けて解明した。その他にも、テルペン合成酵素の精密機能解析、ヌクレオシド系抗生物質、ジアルキルベンゼン、カルバゾールアルカロイドの生合成機構解明など、新規性の高い天然化合物の生合成機構を多数解明した。

山崎らは、植物アルカロイドの生合成系のゲノム進化を解明し、その知見を新規なゲノム編集および合成生物学的な生合成デザインへ展開した。カンプトテシン生産植物のゲノム解析を完了させ、チャボイナモリのゲノム編集、ならびにイオンビーム照射による変異体作出系を確立することで、今後のポストゲノム解析の基盤を構築した。また、生合成の初段階を触媒する二機能性酵素について結晶構造を取得した。リジン由来アルカロイド生合成の鍵反応リジン脱炭酸反応の分子基盤解明と代謝工学を達成し、新規酵素を創出するなど、順調に研究を進捗させた。

5. 主な発表論文 全879報のうち主要なものを記載

研究項目 A01: 天然にないものをつくる

1. Mori, T., Zhai, R., Ushimaru, R., Matsuda, Y., *[Abe, I.](#) “Molecular insights into the endoperoxide formation by Fe(II)/ α -KG-dependent oxygenase NvfI” *Nature Commun.*, 12, in press (2021).
2. He, F., Mori, T., Morita, I., Nakamura, H., Alblova, M., Hoshino, S., Awakawa, T., *[Abe, I.](#) “Molecular basis for the P450-catalyzed C–N bond formation in indolactam biosynthesis”, *Nature Chem. Biol.*, 15, 1206-1213 (2019).
3. Hu, Z., *Awakawa, T., Ma, Z., *[Abe, I.](#) “Aminoacyl sulfonamide assembly in SB-203208 biosynthesis” *Nature Commun.*, 10, Article number: 184 (2019).

4. [Awakawa, T.](#), [Fujioka, T.](#), [Zhang, L.](#), [Hoshino, S.](#), [Hu, Z.](#), [Hashimoto, J.](#), [Kozone, I.](#), [*Ikeda, H.](#), [*Shin-ya, K.](#), [Liu, W.](#), [*Abe, I.](#) “Reprogramming of the antimycin NRPS-PKS assembly lines inspired by gene evolution” *Nature Commun.* 9, Article number: 3534 (2018).
5. [Mori, T.](#), [Iwabuchi, T.](#), [Hoshino, S.](#), [Wang, H.](#), [Matsuda, Y.](#), [*Abe, I.](#), “Molecular basis for the unusual ring reconstruction in fungal meroterpenoid biogenesis”, *Nature Chem. Biol.*, 13, 1066-1073 (2017).
6. [Nagano, M.](#), [Huang, Y.](#), [Obexer, R.](#), [*Suga, H.](#), “One-pot in vitro ribosomal synthesis of macrocyclic depsipeptides”, *J. Am. Chem. Soc.*, 143, 4741-4750 (2021).
7. [Imanishi, S.](#), [*Kato, T.](#), [Yin, Y.](#), [Yamada, M.](#), [Kawai, M.](#), [*Suga, H.](#), “In Vitro selection of macrocyclic D/L-hybrid peptides against human EGFR”, *J. Am. Chem. Soc.*, 143, 5680–5684 (2021).
8. [*Kato, T.](#), [Sengoku, T.](#), [Hirata, K.](#), [Ogata, K.](#), [*Suga, H.](#), “Ribosomal synthesis and de novo discovery of bioactive foldamer peptides containing cyclic β -amino acids”, *Nature Chemistry*, 12, 1081 (2020).
9. [Ishida, S.](#), [Terasaka, N.](#), [Kato, T.](#), [*Suga, H.](#), “An aminoacylation ribozyme evolved from a natural tRNA-sensing T-box riboswitch”, *Nature Chem. Biol.*, 16, 702-709 (2020).
10. [Kozakai, R.](#), [Ono, T.](#), [Hoshino, S.](#), [Takahashi, H.](#), [Katsuyama, Y.](#), [Sugai, Y.](#), [Ozaki, T.](#), [Teramoto, K.](#), [Teramoto, K.](#), [Tanaka, K.](#), [Abe, I.](#), [Asamizu, S.](#), [*Onaka, H.](#) “Acytransferase that catalyses the condensation of polyketide and peptide moieties of goadivonin hybrid lipopeptides”. *Nature Chemistry*, 12, 869-877 (2020).
11. [Ozaki, T.](#), [Yamashita, K.](#), [Goto, Y.](#), [Shimomura, M.](#), [Hayashi, S.](#), [Asamizu, S.](#), [Sugai, Y.](#), [Ikeda, H.](#), [*Suga, H.](#), [*Onaka, H.](#), “Dissection of goadsporin biosynthesis by in vitro reconstitution leading to designer analogues expressed in vivo”, *Nature Commun.*, 8, Article number: 14207 (2017).
12. [Jiang, Y.](#), [Ozaki, T.](#), [Harada, M.](#), [Miyasaka, T.](#), [Sato, H.](#), [Miyamoto, K.](#), [Kanazawa, J.](#), [Liu, C.](#), [Maruyama, J.](#), [Adachi, M.](#), [Nakazaki, A.](#), [Nishikawa, T.](#), [Uchiyama, M.](#), [*Minami, A.](#), [*Oikawa, H.](#) “Biosynthesis of indole diterpene lolitrems: Radical-induced cyclization of an epoxyalcohol affording a characteristic lolitremane skeleton”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 59, 17996-18002 (2020).
13. [Liu, C.](#), [*Minami, A.](#), [Ozaki, T.](#), [Wu, J.](#), [Kawagishi, H.](#), [Maruyama, J.](#), [*Oikawa, H.](#) “Efficient reconstitution of Basidiomycota diterpene erinacine gene cluster in Ascomycota host *Aspergillus oryzae* based on genomic DNA sequences”, *J. Am. Chem. Soc.*, 141, 15519-15523 (2019).
14. [Ozaki, T.](#), [Shinde, S. S.](#), [Gao, L.](#), [Okuizumi, R.](#), [Liu, C.](#), [Ogasawara, Y.](#), [Lei, X.](#), [Dairi, T.](#), [*Minami, A.](#), [*Oikawa, H.](#), “Enzymatic formation of a skipped methyl-substituted octaprenyl side chain of longestin (KS-505a): Involvement of homo-IPP as a common extender unit”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 57, 6629-6632 (2018).
15. [Wang, W.](#), [Wang, H.](#), [Du, L.](#), [Li, M.](#), [Chen, L.](#), [Yu, J.](#), [Cheng, G.](#), [Zhan, M.](#), [Hu, Q.](#), [Zhang, L.](#), [*Yao, M.](#), and [Matsuda, Y.](#) “Molecular basis for the biosynthesis of an unusual chain-fused polyketide, gregatin A”, *J. Am. Chem. Soc.*, 142, 8464-8472 (2020)
16. [*Fujii, I.](#), [Hashimoto, M.](#), [Konishi, K.](#), [Unezawa, A.](#), [Sakuraba, H.](#), [Suzuki, K.](#), [Tsushima, H.](#), [Iwasaki, M.](#), [Yoshida, S.](#), [Kudo, A.](#), [Fujita, R.](#), [Hichiwa, A.](#), [Saito, K.](#), [Asano, T.](#), [Ishikawa, J.](#), [Wakana, D.](#), [Goda, Y.](#), [Watanabe, A.](#), [Watanabe, M.](#), [Masumoto, Y.](#), [Kanazawa, J.](#), [Sato, H.](#), [*Uchiyama, M.](#) “Shimalactone biosynthesis involves spontaneous double bicyclo-ring formation with 8π - 6π electrocyclization”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 59, 8464–8470 (2020).
17. [*Sato, H.](#), [Mitsubishi, T.](#), [Yamazaki, M.](#), [*Abe, I.](#), [*Uchiyama, M.](#), “Computational studies on biosynthetic carbocation rearrangements leading to quiannulatene: Initial conformation regulates biosynthetic route, stereochemistry, and type of skeleton” *Angew. Chem. Int. Ed.*, 57, 14752-14757 (2018).
18. [*Kato, N.](#), [Nogawa, T.](#), [Takita, R.](#), [Kinugasa, K.](#), [Kanai, M.](#), [Uchiyama, M.](#), [Osada, H.](#), [Takahashi, S.](#), “Control of the stereochemical course of [4+2] cycloaddition during trans-decalin formation by Fsa2-family enzymes” *Angew. Chem. Int. Ed.*, 57, 9754–9758 (2018).
19. [Nagata, R.](#), [*Fujihashi, M.](#), [Sato, T.](#), [Atomi, H.](#), [*Miki, K.](#) “Identification of a pyrophosphate-dependent kinase and its donor selectivity determinants”, *Nature Commun.*, 9, 1765 (2018).

研究項目 A02: 稀少なものを大量につくる

20. [Kudo, K.](#), [Hashimoto, T.](#), [Hashimoto, J.](#), [Kozone, I.](#), [Kagaya, N.](#), [Ueoka, R.](#), [Nishimura, T.](#), [Komatsu, M.](#), [Suenaga, H.](#), [*Ikeda, H.](#), [*Shin-ya, K.](#) “In vitro Cas9-assisted editing of modular polyketide synthase genes to produce desired natural product derivatives”. *Nat. Commun.*, 11, 4022 (2020).
21. [Kim, J.](#), [Komatsu, M.](#), [Shin-ya, K.](#), [Omura, S.](#), [*Ikeda, H.](#) “Distribution and functional analysis of the phosphopantetheinyl transferase superfamily in *Actinomycetales* microorganisms”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 115, 6828-6833 (2018).
22. [Matsuda, K.](#), [Zhai, R.](#), [Mori, T.](#), [Kobayashi, M.](#), [Sano, A.](#), [*Abe, I.](#), [*Wakimoto, T.](#), “Heterochiral coupling in non-ribosomal peptide macrolactamization”, *Nature Catalysis*, 3, 507-515 (2020).
23. [Kuranaga, T.](#), [Matsuda, K.](#), [Sano, A.](#), [Kobayashi, M.](#), [Ninomiya, A.](#), [Takada, K.](#), [*Matsunaga, S.](#), [*Wakimoto, T.](#), “Total synthesis of a non-ribosomal peptide surugamide B and Identification of a new offloading cyclase family”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 57, 9447-9451 (2018).
24. [Zhou, T.](#), [Hirayama, Y.](#), [Tsunematsu, Y.](#), [Suzuki, N.](#), [Tanaka S.](#), [Uchiyama, N.](#), [Goda, Y.](#), [Yoshikawa, Y.](#), [Iwashita, Y.](#), [Sato, M.](#), [Miyoshi, N.](#), [Mutoh, M.](#), [Ishikawa, H.](#), [Sugimura, H.](#), [Wakabayashi, K.](#), [*Watanabe, K.](#) “Isolation of new colibactin metabolites from wild-type *Escherichia coli* and in situ trapping of a mature colibactin derivative” *J. Am. Chem. Soc.*, 143, 5526-5533 (2021)
25. [Sato, M.](#), [Kishimoto, S.](#), [Yokoyama, M.](#), [Jamieson, C.S.](#), [Narita, K.](#), [Maeda, N.](#), [Hara, K.](#), [Hashimoto, H.](#), [Tsunematsu, Y.](#), [Houk, K.N.](#), [Tang, Y.](#), [*Watanabe, K.](#) “Catalytic mechanism and endo-to-exo

- selectivity reversion of an octalin-forming natural Diels–Alderase” *Nature Catalysis*, 4, 223-232 (2021)
26. Kishimoto, S., Hara, H., Hashimoto, H., Hirayama, Y., Champagne, P. A., *Houk, K. N., *Tang, Y., *Watanabe, K. “Enzymatic one-step ring contraction for quinolone biosynthesis”. *Nature Commun.*, 9, 2826-2833 (2018)
 27. Li, L., Tang, M.C., Tang, S., Gao, S., Soliman, S., Hang, L., Xu, W., Ye, T., *Watanabe, K., *Tang, Y. “Genome mining and assembly-line biosynthesis of the UCS1025A pyrrolizidinone family of fungal alkaloids” *J. Am. Chem. Soc.*, 140, 2067-2071 (2018).
 28. Ohashi, M., Liu, F., Hai, Y., Chen, M., Tang, M.-C., Yang, Z., Sato, M., *Watanabe, K., *Houk, K. N., *Tang, Y. SAM-dependent enzyme-catalysed pericyclic reactions in natural product biosynthesis. *Nature*, 549, 502-506 (2017).
 29. Tominaga, M., Nozaki, K., Umeno, D., *Ishii, J., Kondo, A., “Robust and flexible platform for directed evolution of yeast genetic switches”, *Nature Commun.*, 12, in press (2021)

研究項目 A03: マシナリーの構造と機能

30. Sato, S., *Kudo, F., Rohmer, M., *Eguchi, T., “Characterization of Radical SAM Adenosylhopane Synthase, HpnH, which Catalyzes the 5'-Deoxyadenosyl Radical Addition to Diploptene in the Biosynthesis of C₃₅ Bacteriohopanepolyols”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 59, 237-241 (2020).
31. *Ishikawa, F., Miyanaga, A., Kitayama, H., Nakamura, S., Nakanishi, I., Kudo, F., *Eguchi, T., *Tanabe, G., “An Engineered Aryl Acid Adenylation Domain with an Enlarged Substrate Binding Pocket”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 58, 6906-6910 (2019).
32. *Miyanaga, A., Ouchi, R., Ishikawa, F., Goto, E., Tanabe, G., Kudo, F., *Eguchi, T., “Structural basis of protein–protein interactions between a trans-acting acyltransferase and acyl carrier protein in polyketide disorazole biosynthesis”, *J. Am. Chem. Soc.*, 140, 7970–7978 (2018).
33. Feng, Z., Ogasawara, Y., *Dairi, T., “Identification of the peptide epimerase MslH responsible for D-amino acid introduction at the C-terminus of ribosomal peptides”, *Chem. Sci.*, 12, 2567-2574 (2021).
34. Hayashi, S., Naka, M., Ikeuchi, K., Ohtsuka, M., Kobayashi, K., Satoh, Y., Ogasawara, Y., Maruyama, C., Hamano, Y., Ujihara, T., *Dairi, T., “Control mechanism for carbon chain length in polyunsaturated fatty acid synthases”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 58, 6605-6610 (2019).
35. Hayashi, S., Satoh, Y., Ogasawara, Y., Maruyama, C., Hamano, Y., Ujihara, T., *Dairi, T., “Control mechanism for cis-double bond formation by polyunsaturated fatty acid synthases”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 58, 2326-2330 (2019).
36. Feng, R., Satoh, Y., Ogasawara, Y., Yoshimura, T., and *Dairi, T., “A glycopeptidyl-glutamate epimerase for bacterial peptidoglycan biosynthesis”, *J. Am. Chem. Soc.*, 139, 4243-4245 (2017).
37. Kawata, J., Naoe, T., Ogasawara, Y., and *Dairi, T., “Biosynthesis of the carbonylmethylene structure found in the ketomemycin class of pseudotripeptides”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 56, 2026-2029 (2017).
38. Zhang, J., Yuzawa, S., Thong, W. L., Shinada, T., Nishiyama, M., *Kuzuyama, T. “reconstitution of a highly reducing type II pks system reveals 6 π -electrocyclization is required for *o*-dialkylbenzene biosynthesis”, *J. Am. Chem. Soc.*, 143, 2962-2969 (2021).
39. Kobayashi, M., Tomita, T., Shin-ya, K., Nishiyama, M., *Kuzuyama, T., “An unprecedented cyclization mechanism in the biosynthesis of carbazole alkaloids in streptomyces”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 58, 13349-13353 (2019).
40. Tomita, T., Kobayashi, M., Karita, Y., Yasuno, Y., Shinada, T., Nishiyama, M., *Kuzuyama, T., “Structure and mechanism of the monoterpene cyclolavandulyl diphosphate synthase that catalyzes consecutive condensation and cyclization”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 56, 14913-14917 (2017).
41. Kudo, K., Ozaki, T., Shin-ya, K., Nishiyama, M., *Kuzuyama, T., “Biosynthetic origin of the hydroxamic acid moiety of trichostatin A: Identification of unprecedented enzymatic machinery involved in hydroxylamine transfer”, *J. Am. Chem. Soc.*, 139, 6799-6802 (2017).
42. *Rai, A., Hirakawa, H., Nakabayashi, R., Kikuchi, S., Hayashi, K., Rai, M., Tsugawa, H., Nakaya, T., Mori, T., Nagasaki, H., Fukushi, R., Kusuya, Y., Takahashi, H., Uchiyama, H., Toyoda, A., Hikosaka, S., Goto, E., Saito, K., *Yamazaki, M. “Chromosome-level genome assembly of *Ophiorrhiza pumila* reveals the evolution of camptothecin biosynthesis”. *Nature Commun.* 12, 405 (2021).
43. Kawai, S., Sugaya, Y., Hagihara, R., Tomita, H., *Katsuyama, Y., Ohnishi, Y. “Complete biosynthetic pathway of alazopeptin, a tripeptide consisting of two molecules of 6-diazo-5-oxo-L-norleucine and one molecule of alanine.” *Angew. Chem. Int. Ed.*, 60, 10319–10325 (2021).
44. Du, D., *Katsuyama, Y., Horiuchi, M., Fushinobu, S., Chen, A., Davis, T. D., *Burkart, M. D., Ohnishi, Y. “Structural basis for selectivity in a highly reducing type II polyketide synthase.” *Nat. Chem. Biol.* 16, 776-782 (2020).
45. Tsutsumi, H., *Katsuyama, Y., Izumikawa, M., Takagi, M., Fujie, M., Satoh, N., Shin-Ya, K., *Ohnishi, Y., “Unprecedented cyclization catalyzed by a cytochrome P450 in benzastatin biosynthesis.” *J. Am. Chem. Soc.*, 140, 21, 6631–6639, (2018).
46. Du, D., *Katsuyama, Y., Shin-Ya, K., *Ohnishi, Y., “Reconstitution of a type II polyketide synthase that catalyzes polyene formation” *Angew. Chem. Int. Ed.*, 57, 1954-1957 (2018).