

7. ヌクレオシド系抗菌剤開発を指向した生合成機構の解明

葛山 智久

東京大学 生物生産工学研究センター 細胞機能工学研究部門

Key words : 抗生物質, ヌクレオシド, 生合成, アシル化, 放線菌

緒言

ペニシリンの発見以来、天然化合物は薬剤の重要な供給源として広く利用されている。実際に、バンコマイシンや半合成のメチシリンに代表される抗菌剤が医療機関などで使用されてきた。しかしながら、このような抗菌剤の使用に際して問題となるのが、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) やメチシリン耐性ブドウ球菌 (MRSA) に代表される薬剤耐性菌の出現である。人類がこれらの耐性菌に打ち勝つためには、既存の薬剤とは交叉耐性が出ないよう作用機序が異なる新たな抗菌剤の開発が必要である。

ヌクレオシド系抗生物質は、バクテリアのペプチドグリカン生合成における鍵酵素である Translocase I を阻害することで抗菌作用を示す。これまでに Translocase I を作用標的とした医薬品は上市されていないため、ヌクレオシド系抗生物質は既存の薬剤耐性菌にも効果を示す天然物として広く注目されている。カプラザマイシン (CPZ, caprazamycin) は Translocase I 阻害活性スクリーニングにより放線菌、*Streptomyces* sp. MK730-62F2 の培養液より単離された日本オリジナルのヌクレオシド系抗生物質である (図 1) [1]。近年 CPZ の化学修飾で合成される CPZEN-45 が高い選択性をもつ優れた抗結核菌活性を示すことが報告された [2]。さらにその詳細な作用機序も解明され、実際に医薬品への応用が期待されている [3]。つい最近、CPZ B の全合成が達成されたものの [4]、CPZ の化学構造の複雑さから、全合成には複雑な 23 段階の反応ステップが必要であり、現状では化学合成法による CPZ の大量調製は困難と考えられる。他方、発酵法による CPZ 類の調製方法は確立している [1]。しかしながら、培養方法の検討によって改良された発酵法においては、生産性向上を指向した方法論には開拓の余地がまだ十分にある。そこで我々は、CPZ 生合成遺伝子の改変による生産性の向上に向けた CPZ の生合成研究を行っている。また、これまでに CPZ の生合成遺伝子クラスターがクローニングされ、uridine monophosphate (UMP) から 5'-(β -O-aminoribosyl)-glycyuridine までの生合成経路と生合成酵素遺伝子 (*cpz14*~*19*) が明らかにされている (図 1) [5]。しかしながら、特徴的なジアゼパノン環の生合成やアシル化修飾の生合成機構を含めて CPZ の生合成経路の全容に関しては未解明のままである。

天然化合物の中でも、テルペノイドやポリケタイド化合物の生合成研究に関しては、これまでも精力的に研究されており、近年では、蓄積してきた生合成マシナリー (骨格合成と修飾反応に関わるすべての生合成酵素をこのように呼ぶ) の研究から得られた知識を活用して、有用な天然化合物を大量に調製するための方法が研究されている。これに対して、ヌクレオシド系化合物の生合成研究は未だ盛んに行われてはならず、未解明な部分が多い。言い換えれば、ヌクレオシド系化合物の生合成研究は、天然化合物を対象にした新たな研究分野であり、これまでにはない新たな反応機構を有する生合成酵素の発見も大いに期待できる。このように、本研究課題は、ヌクレオシド系化合物の抗菌剤開発という応用研究の側面のみならず生合成研究という基盤研究の側面からも新たな研究分野の確立に貢献できるとともに、ひいては、新たな抗菌剤が開発されることで治療を行うための新たな手段を提供できる可能性がある。

以上の背景から、我々は CPZ の生合成マシナリーの全容を解明し、より優れた CPZEN-45 生産系の構築に資する知見を得ることを目指している。CPZEN-45 は種々のアシル側鎖からなる CPZ 類縁体を加水分解することで得られる caprazen をさらに化学修飾することで調製されている。しかしながらこの方法には、①CPZ 類のアシル側鎖による脂溶性のため、発酵培養液からの精製には多量の有機溶媒が必要であり、②加水分解の際に強酸を使用しなければならない、という生産現場における 2 つの大きな問題点がある。アシル化修飾の生合成機構を解明し、アシル側鎖を有さない

caprazene 様類縁体の生産菌を構築することで、これらの問題点を解決することができ、より優れた発酵培養系や生産菌の論理的な改変に関する方法論の構築も可能となる。

本研究では、CPZ の抗菌活性に必須であるアシル側鎖が、68 個からなる小タンパク質が関与する前例のない生合成機構によってアルコール生合成中間体に付加されることを明らかにした。

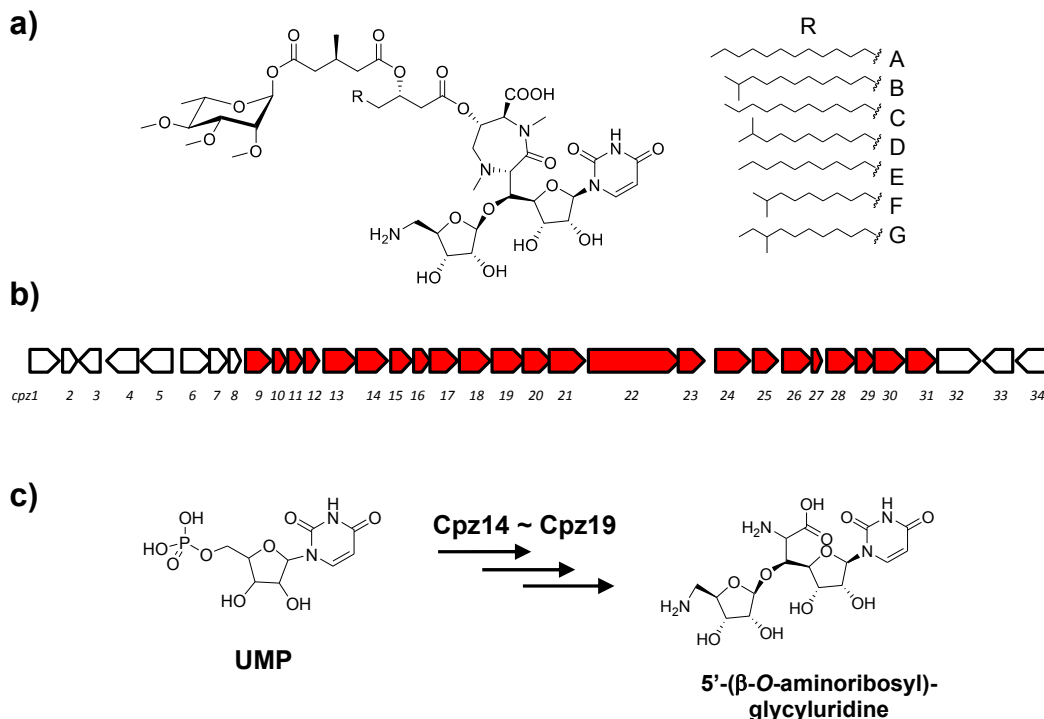


図 1. CPZ の構造とその生合成遺伝子クラスター

a) CPZ 類縁体 (CPZ A ~ CPZ G) の化学構造。b) *cpz* 遺伝子クラスターの構造。矢印は遺伝子の長さや転写方向を示している。これまでの研究で、赤で示した遺伝子が CPZ の生合成に関与することが報告されている。これまでの研究では、*cpz23* と *cpz24* の間には *cpzX* は見出されてはならず、本研究で初めて発見された。c) これまでの研究で、UMP から 5'-(β-O-aminoribosyl)-glycyluridine までの生合成には *cpz14* ~ *19* が関与することが明らかになっていた。

方法

1. 各種遺伝子破壊株の構築とそれらが生産する生合成中間体の単離精製・構造決定

先行研究により CPZ の生合成遺伝子の最小単位は *cpz9* ~ *cpz31* の 23 遺伝子であることが示唆されている。そこで、各遺伝子の機能を明らかにするため、まず遺伝子破壊株の構築方法を確立した。各種遺伝子破壊株の培養液には、その遺伝子産物の基質となる生合成中間体が蓄積していると推測された。そこで、これらの中間体を単離精製し、NMR 解析に供することで構造決定を行った。中間体の精製は、イオン交換カラムを中心に活性炭カラム、逆相 HPLC を利用して行った。一方、バイオインフォマティクスによる解析結果からは、Cpz23 が CPZ のアシル側鎖の生合成に関与することが強く推測されたため、その遺伝子破壊株の構築を優先的に進めた。決定した中間体の構造情報をもとに生合成経路の推測を行った。

2. 組換え酵素を用いた *in vitro* アッセイ

上記の単離精製によって得られた生合成中間体を基質として各種組換え酵素を用いた変換実験を行った。各遺伝子をクローニングし、大腸菌での組換え酵素の発現系を構築して精製した。これらの手法で得られた組換え酵素を用いて *in vitro* の活性検出を行い、これにより CPZ の生合成の各段階の反応を提唱した。

結果および考察

1. 遺伝子破壊株の構築とそれらが生産する生合成中間体の単離精製・構造決定

CPZ 生産菌である *Streptomyces* sp. MK730-62F2 の各種遺伝子破壊株を作製するため、培養条件、形質転換の条件を種々検討することにより、polyethylene glycol を用いる遺伝子破壊の方法を確立した。

次に、CPZ の生合成遺伝子クラスター中の各遺伝子の破壊株を作製し、その培養抽出液を解析することで生合成中間体と推測される化合物の同定を試みた。ついで、同定した生合成中間体候補化合物と、破壊した遺伝子産物の組換え酵素を用いて *in vitro* 活性試験を行うことで各種酵素の機能同定と生合成経路の同定を試みた。

これまでに我々は、*cpz23* の遺伝子破壊株が CPZ にアシル側鎖が付加しておらずアミノ糖にリン酸基が付加した caprazol-3''-phosphate (C3P) を蓄積することを報告していた [6]。そこで、*cpz23* の下流に位置する *cpz24* と、*cpz23* と *cpz24* の両遺伝子間に新たに見出した 204 bp (68 aa) の酸性アミノ酸に富んだ読み枠 (*cpzX*) の各遺伝子破壊株を作製した。ついで、これら遺伝子破壊株のそれぞれの培養抽出液を解析した結果、いずれの破壊株においても、C3P が蓄積することを見出した。これらの結果から、*cpz23*、*cpz24*、*cpzX* のいずれの遺伝子も C3P のアシル化反応に関与すると推測した。

2. 組換え酵素を用いた *in vitro* アッセイ

上記の各種遺伝子破壊株の形質から考察して、Cpz23、Cpz24、CpzX の組換え酵素を調製し、ついで、C3P を基質に *in vitro* アッセイを行って反応産物を LC-MS で解析したところ、三つの酵素が揃った場合にのみ、3-hydroxymyristyl 基が付加した 3-hydroxymyristyl-C3P と推測される化合物が検出された (図 2)。

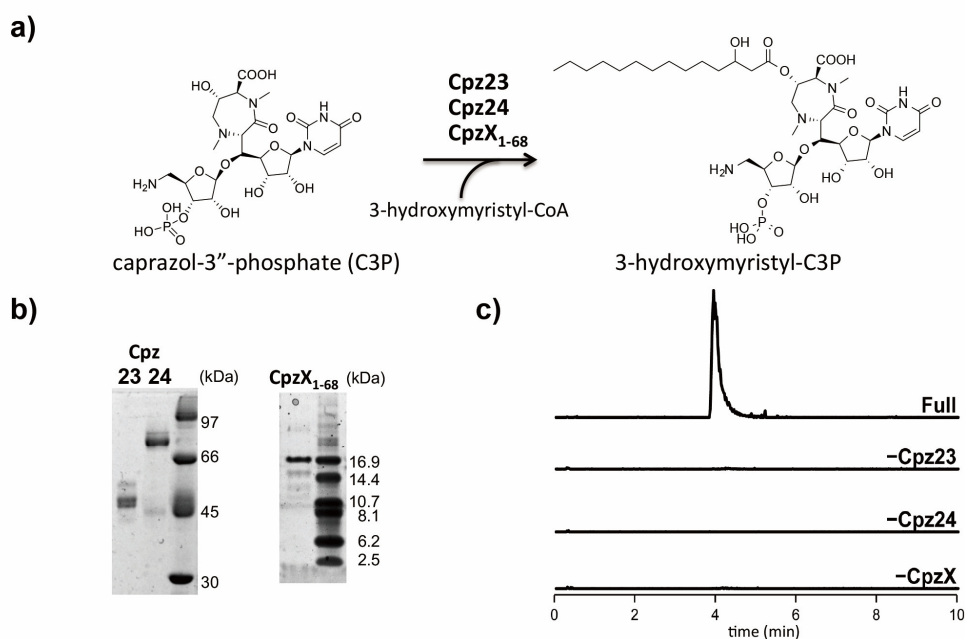


図 2. 組換え CPZ23、CPZ24、CPZ X タンパク質を用いた *in vitro* アッセイ

a) CPZ23、CPZ24、CPZ X が触媒する酵素反応。C3P をアシル基受容体、3-hydroxymyristyl-CoA をアシル基供与体とした場合に反応が進行して 3-hydroxymyristyl-C3P が生成する。b) 精製した組換え CPZ23、CPZ24、CPZ X タンパク質の SDS-PAGE の図。c) CPZ23、CPZ24、CPZ X を用いた *in vitro* 反応液を LC-MS で分析した図。CPZ23、CPZ24、CPZ X の全てが揃ったとき (Full) のみ、反応産物である 3-hydroxymyristyl-C3P が検出された。

3. Cpz23の基質特異性の検討

次に、Cpz23、Cpz24、CpzXの組換え酵素によるアシル化反応の基質特異性について検討を行った。

その結果、アシル化反応のアシル基供与体は、CoA体であることが必要であることが判明した。一方で、CoA体であれば、3'位の水酸基は無くても反応は進行することが分かった。さらには、興味深いことに、このアシル化反応のアシル基受容体としてcaprazolは受け入れられなかったことから、3'位のリン酸基が必須でありC3Pが真の生合成中間体であることが判明した。

また、プルダウンアッセイの結果からCpz23とCpzXは相互作用していることが明らかになった。

以上の結果から、Cpz23はCpzXと相互作用している場合にのみ活性型になりアシル化反応を触媒すると考えた。しかしながら、これまでの結果からCpzXのC末端の11個のアミノ酸を除去したCpzX₁₋₅₇を用いたアッセイ系ではC3Pをアシル化することはできなかった。これはC末端のロイシンのカルボキシル基がC3Pの活性部位への侵入を阻害しているためと考え、さらにペプチド長の短いCpzX₁₋₅₆を作製しC3P及びカプラゾールを基質に反応を行なったが、いずれの基質を用いた際にもアシル化反応の進行は検出されなかった。以上の結果から、Cpz23のアシル基受容体の基質特異性はきわめて厳密であると考えている。

4. CPZ生合成におけるアシル化機構

以上の結果から、CPZ生合成におけるアシル化の反応機構を図3のように提唱した。このアシル化修飾機構においてCpzXは、C3Pのような親水性の生合成中間体を疎水性のアシル化中間体3-hydroxymyristy-C3Pへ変換する反応を媒介する一種のキャリアタンパク質として作用していることが推測される。このようなキャリアタンパク質が重要な役割を担っているアシル化機構は前例がないことから、X線結晶構造解析などによってより詳細な反応機構の解明を目指す。

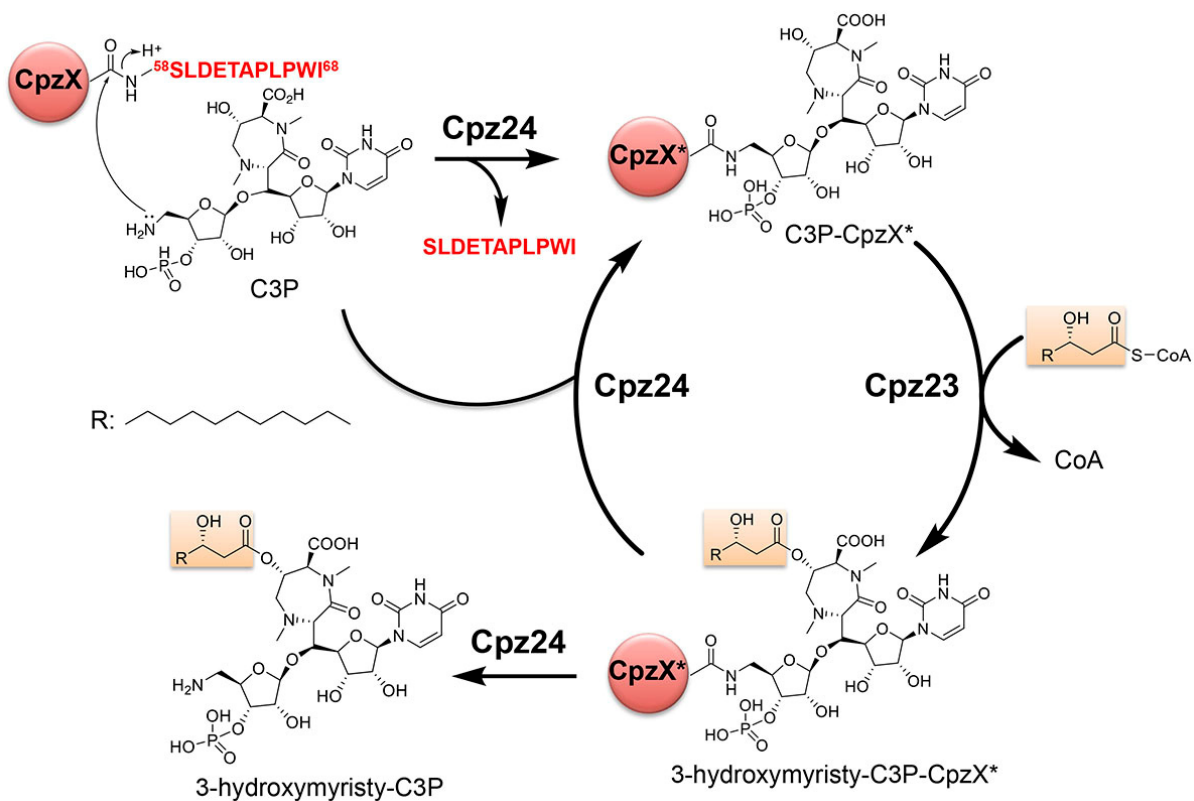


図3. CPZ生合成におけるアシル化機構

まずCpz24の基質となるC3Pのアミノ基が、CpzX₁₋₆₈の⁵⁷Leu-⁵⁸Ser間のペプチド結合を求核攻撃し、CpzX₁₋₆₈のC末端11アミノ酸 (⁵⁸SLDETAPLPWI⁶⁸) の脱離を伴いCpzX₁₋₅₇ (CpzX*) がアミド結合でC3Pに付加したC3P-CpzX*が形成される。次に、このC3P-CpzX*を基質にCpz23によるエステル化反応が進行して3-hydroxymyristy-C3P-CpzX*が生成し、最後に再びCpz24の作用により新たなC3Pと3-hydroxymyristy-C3P-CpzX*との間でアミド交換反応がおこり、C3P-CpzX*が再形成されると同時に3-hydroxymyristy-C3Pが生成する。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学生物生産工学研究センター細胞機能工学研究部門の白石太郎助教である。

文献

- 1) Igarashi M, Nakagawa N, Doi N, Hattori S, Naganawa H, Hamada M. Caprazamycin B, a novel anti-tuberculosis antibiotic, from *Streptomyces* sp. *J Antibiot*. 2003 Jun;56(6):580-3. PMID: 12931868
- 2) Takahashi Y, Igarashi M, Miyake T, Soutome H, Ishikawa K, Komatsuki Y, Koyama Y, Nakagawa N, Hattori S, Inoue K, Doi N, Akamatsu Y. Novel semisynthetic antibiotics from caprazamycins A-G: caprazene derivatives and their antibacterial activity. *J Antibiot (Tokyo)*. 2013 Mar;66(3):171-8. PMID: 23532021 doi: 10.1038/ja.2013.9
- 3) Ishizaki Y, Hayashi C, Inoue K, Igarashi M, Takahashi Y, Pujari V, Crick DC, Brennan PJ, Nomoto A. Inhibition of the first step in synthesis of the mycobacterial cell wall core, catalyzed by the GlcNAc-1-phosphate transferase *WecA*, by the novel caprazamycin derivative CPZEN-45. *J Biol Chem*. 2013 Oct 18;288(42):30309-19. Epub 2013 Aug 28. PMID: 23986448 doi: 10.1074/jbc.M113.492173
- 4) Nakamura H, Tsukano C, Yasui M, Yokouchi S, Igarashi M, Takemoto Y. Total synthesis of (-)-caprazamycin A. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2015 Mar 2;54(10):3136-9. Epub 2015 Jan 22. PMID: 25613457 doi: 10.1002/anie.201411954
- 5) Kaysser L, Lutsch L, Siebenberg S, Wemakor E, Kammerer B, Gust B. Identification and manipulation of the caprazamycin gene cluster lead to new simplified liponucleoside antibiotics and give insights into the biosynthetic pathway. *J Biol Chem*. 2009 May 29;284(22):14987-96. Epub 2009 Apr 7. PMID: 19351877 doi: 10.1074/jbc.M901258200
- 6) Shiraiishi T, Hiro N, Igarashi M, Nishiyama M, Kuzuyama T. Biosynthesis of the antituberculous agent caprazamycin: Identification of caprazol-3"-phosphate, an unprecedented caprazamycin-related metabolite. *J Gen Appl Microbiol*. 2016 Jul 14;62(3):164-6. doi: 10.2323/jgam.2016.01.002