

論文の内容の要旨

論文題目 放線菌が生産する translocase I 阻害剤の生合成に関する研究
氏名 舟橋 賢記

微生物が生産する二次代謝産物は、抗バクテリア、抗カビ、抗ガン、免疫抑制など様々な生物活性を有し、医薬品資源として重要な位置を占めている。二次代謝産物はその化学構造に規則性が見出され、ポリケタイド、テルペノイド、 β -ラクタム系、アミノグリコシド系、ペプチド系、ヌクレオシド系などに分類される。これら二次代謝産物の生合成機構の解明は、目的代謝産物の生産性向上や菌株ライブラリーの充実、さらにはコンビナトリアル生合成による非天然型化合物の創製につながるものと考えられ、これまで数多くの研究がなされてきた。特にポリケタイドや非リボソーム型ペプチドの生合成研究が盛んに行われ、多くの成果が得られている。一方、ヌクレオシド系化合物は、その構造のユニークさや医薬品としての潜在的価値があるにも拘らず、これまで生合成研究はほとんど行われていなかった。

ヌクレオシド系抗生物質の中でもウラシル含有ヌクレオシド系化合物、mureidomycin、liposidomycin、capuramycin などは細菌の細胞壁構成成分であるペプチドグリカン生合成の最初のステップを担う translocase I に対する阻害活性を有している。これまでに、ペプチドグリカン生合成を標的とした抗菌剤が数多く開発されてきたが、translocase I を標的とするもので上市された薬剤は未だない。昨今、MRSA や VRE など、既存の薬剤に対する耐性菌の問題から、translocase I は魅力的な創薬標的として期待されている。そこで、translocase I 阻害剤スクリーニングの過程で見出された capuramycin-type 化合物である A-500359 類及び A-503083 類、liposidomycin-type 化合物である A-90289 類の生合成に関して研究を行った。本研究の目的は、これまで未知であったウラシル含有ヌクレオシド系化合物の生合成遺伝子を単離し、その生合成

機構を分子レベルで解明することにより、生産性向上、微生物ライブラリーの充実や非天然型化合物創製の基盤を構築することにある。

1) *Streptomyces griseus* SANK 60196 の A-500359 類生合成遺伝子クラスターの取得

A-500359 類 (図 1) の高生産株及び非生産株を用いた遺伝子発現解析から、A-500359 類の生合成遺伝子クラスターを見出した。Aminoglycoside 3'-phosphotransferase ホモログをコードする *orf21* を *Streptomyces albus* 及び *Escherichia coli* $\Delta tolC$ 株において異種発現させたところ、両株共に A-500359 B に対する耐性を獲得した。この結果より、*orf21* が A-500359 類に対する自己耐性に関与していることが示唆された。さらに、A-500359 類の生産制御には巨大線状プラスミド SGF180 及び、低分子シグナリング化合物様の物質が関与していることを示唆するデータを得た。

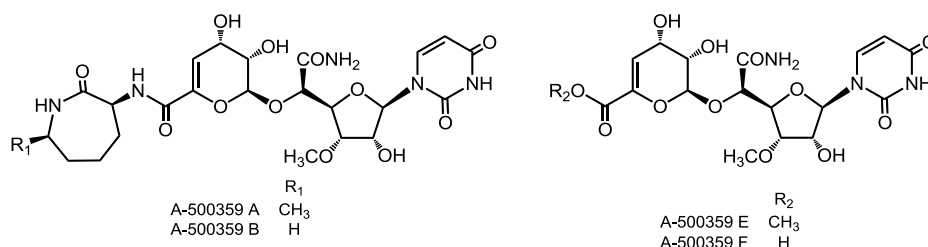


図 1. A-500359 類の構造

2) *Streptomyces* sp. SANK 62799 の A-503083 類生合成遺伝子クラスターの取得と CapB および CapU の機能解析

A-503083 類は図 2 に示すように A-500359 類の 2'-hydroxyl 基に carbamoyl 基が付加した capuramycin-type 化合物である。そこで、A-500359 類生合成遺伝子の一部をプローブとして使い、A-503083 類の生合成遺伝子クラスターを取得し、遺伝子クラスター中に見出された carbamoyltransferase ホモログをコードする *capB* および non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) をコードする *capU* について機能解析を行った。組換え CapB は予想通り、carbamoyl phosphate を carbamoyl 基供与体として、A-500359 A、A-500359 B をそれぞれ A-503083 A、A-503083 B に変換した。一方、ATP-PPi 交換アッセイの結果、組換え CapU は A-500359 F を基質とせず L-lysine を基質として最も好むことが明らかになった。このことから CapU は A-503083 A および A-503083 B がもつ caprolactam 環の形成に関与することが示唆された。

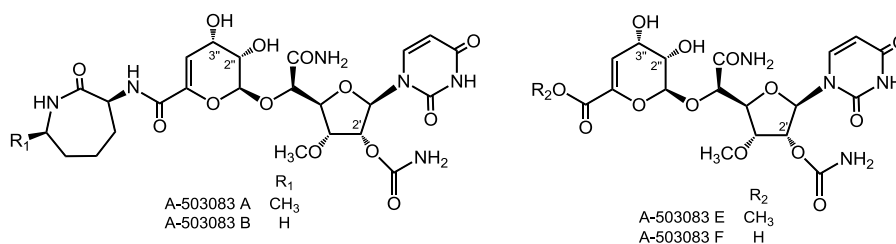


図 2. A-503083 類の構造

3) A-503083 A および A-503083 B の生合成における新規アミド結合形成反応

A-503083 A および A-503083 B の生合成において、hexaurinic acid と caprolactam 環を繋ぐアミド結合を触媒する酵素に興味もたれた。生合成遺伝子クラスターのインフォマティクス解析では本酵素は見出せなかったが、当初、caprolactam 環の加水分解を触媒し自己耐性に関与する考えられた CapW (class C β -lactamase と相同性を有する) が ATP 非依存的に A-503083 E と amino caprolactam 環間のアミド結合形成を触媒し、A-503083 B を生成することを見出した。通常アミド結合形成は ATP によって基質が活性化された後に起きるが、今回見出された機構は methyl ester 化を介して ATP 非依存的に起こるという全く新規なものであった。CapW が触媒する反応はそのメカニズムだけでなく、応用の観点からも非常に興味深い。CapW を利用した chemoenzymatic アプローチにより、非天然型 capuramycin の創出も可能になると考えられる。

4) リン酸化を介した A-503083 類に対する耐性機構

A-503083 類生合成遺伝子クラスター中の *capP* は、A-500359 類に対する自己耐性に関与 *orf21* のホモログである。組換え CapP は 予想通り、ATP 依存的に A-503083 B の 3'-hydroxyl 基にリン酸基を転移した。さらに、生成された 3'-phospho-A-503083 B は *Mycobacterium smegmatis* に対する抗菌活性を示さず、translocase I 阻害活性も A-503083 B に比べて著しく減少していた。このことから、CapP によるリン酸化は A-503083 類に対する自己耐性化機構の一つであることが示唆された。また、A-503083 類の 3' 位は translocase I 阻害活性に重要な部位であるということが強く示唆された。

5) *Streptomyces* sp. SANK 60405 が生産する A-90289 類の生合成研究

Streptomyces sp. SANK 60405 のドラフトゲノム配列を決定し、A-90289 類 (図 3) の生合成遺伝子クラスターを見出した。aryl sulfotransferase (ASST) ホモログをコードする *lipB*、glycosyltransferase ホモログをコードする *lipB1* 及び diazepamone 母核の合成に関与されると予想される serine hydroxymethyltransferase ホモログをコードする *lipK* の遺伝子破壊株をそれぞれ作製し、代謝産物を解析した。*lipB* 破壊株では sulfate 部位が、*lipB1* 破壊株では permethylated rhamnose 部位がそれぞれ脱離した代謝産物が同定され、LipB、LipB1 がそれぞれ sulfate、permethylated rhamnose の転移に関与することが示された。一方、*lipK* 破壊株では 予想通り、A-90289 類は検出されなかった。さらに、組換え LipB を用いた *in vitro* 解析により、LipB は 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate ではなく *p*-nitrophenylsulfate を硫酸基供与体とすること、desulfo-A-90289 A、uridine 及び 3'-deoxyuridine へは硫酸基を転移できるが、リン酸化 uridine や cytidine は基質とならないことが明らかになった。LipB はそのアミノ酸配列および基質特異性から、既知の ASST とは異なる反応を触媒していると推察される。硫酸基転移は化合物への水溶性付与や薬物代謝の面からも重要な反応であることから、LipB の硫酸基転移反応機構の解明と応用展開は興味深い。

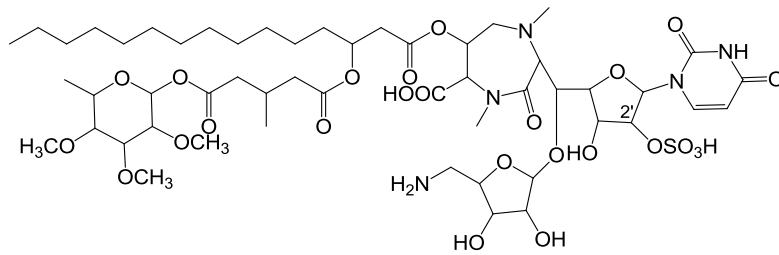


図 3. A-90289 A の構造

これまでウラシル含有ヌクレオシド化合物の生合成遺伝子に関する知見はほとんどなかったが、本研究により A-500359 類、A-503083 類及び A-90289 類の 3 種類の生合成遺伝子クラスターが同定された。得られた生合成遺伝子の分子レベルでの解析から、**capuramycin-type** 化合物における新規アミド結合反応を発見し、リン酸化による耐性機構を明らかにした。また、**liposidomycin-type** 化合物における新規硫酸基転移酵素を見だし、機能解析を実施した。これらの研究成果はヌクレオシド系生理活性物質の生合成に新たな知見を与えると共に生産量向上、菌株ライブラリーの充実や新規物質創製系構築などの応用展開への足がかりになるものである。