

住木・梅澤記念賞受賞講演会記録

2013年10月3日, 学士会館320号室

【2013年度受賞講演, 座長: 中田雅也】

微生物二次代謝産物生合成の精密解析

江口 正 (東京工業大学大学院理工学研究科物質科学専攻)

天然由来の低分子有機化合物, いわゆる天然有機化合物は, 医薬・農薬・香料等として人類の繁栄に大きく貢献してきた。その中でも, 微生物や植物の二次代謝による産物は, 構造の多様性に富んでいるがゆえに様々な生理活性を示すものも多く, 抗生物質, 抗がん剤, 酵素阻害物質などとして利用されている。

現在では, 多くの生物種のゲノムDNA配列の解読が達成され, ポストゲノム研究が盛んに行われるようになり, プロテオーム等の網羅的解析が行われる一方で, 遺伝子やタンパク質の本質的な機能解明は困難なことも多い。このことは裏を返すと, 自然界にはまだ多くの未知の反応場が隠されていることを意味し, 化学と生物にまたがる研究領域は, 学術的にも産業的にも重要性を益々増している。二次代謝産物生産に関わる自然界における反応場, すなわち生合成は, 一般に複雑で多段階に渡る酵素反応により行われている。現在では, 遺伝子組換え技術の発展に伴い, 二次代謝産物の生合成研究に於いても遺伝子レベルの研究が盛んに行われ, 代表的な抗生物質に関しては解析しつくされたといえる状況になった。しかしなが

ら, 現在でもなおゲノムDNA配列からだけでは遺伝子機能の予測が困難であることは多く, 生合成遺伝子が解読されても, そのコードするタンパク質が触媒する反応場は未解明な部分が多々あり, 天然有機化合物の生合成反応から学ぶべき化学はまだ多い¹⁾。すなわち, ゲノム万能とも見える今の生命科学の流れの中で, セントラルドグマの下流に位置する酵素タンパク質とその酵素が担う触媒反応との対応づけに明確な指針がない状況である。

我々は, この様な状況の下, 微生物二次代謝産物生合成を化学的な精密さを持って解析することを目指し, 先端的分析法を駆使して種々の二次代謝系を有機化学的に追究し, 特徴ある抗生物質の生合成酵素及び生合成遺伝子を世界に先駆けて解明するなど分子生物学的視点からの研究を展開した。本稿では, 紙面の都合上その中でもアミノグリコシド系抗生物質, 特にプチロシンおよびネオマイシンの生合成に於ける興味ある酵素反応に着目した反応解析について紹介する。

1. アミノグリコシド系抗生物質

アミノグリコシド系抗生物質とはアミノサイクリトールをアグリコンとするオリゴ配糖体である。その多くが細菌のリボソームへの結合によるタンパク質合成阻害を作用機序としており、真核生物のタンパク質合成系には作用しないことから有意な選択毒性を示す。

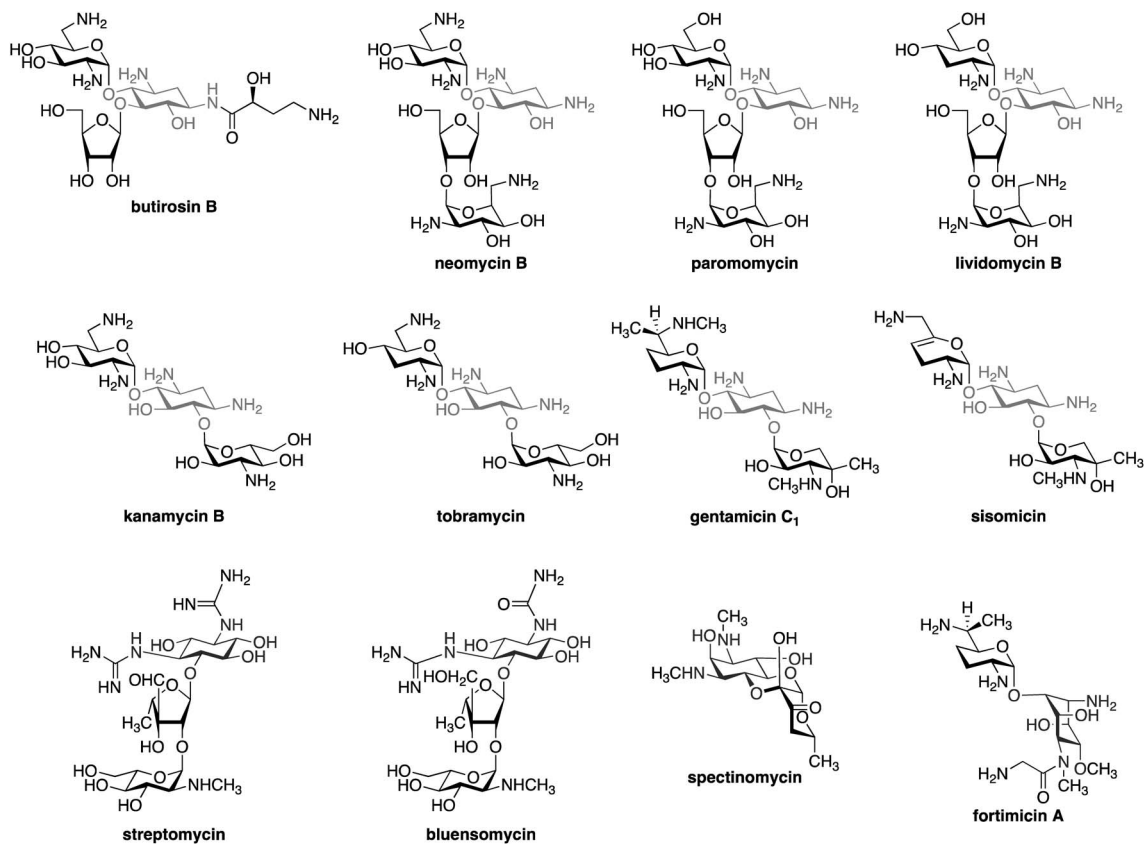
アミノグリコシド系抗生物質は、そのアグリコンの構造から大きく2種に分類される²⁾。1つは *myo*-イノシトールを前駆体として生合成される炭素6員環アグリコンを有し、ストレプトマイシンを代表とする環炭素すべてにヘテロ原子が結合している一群である。もう一群は、ヘテロ原子が結合しない炭素を含む6員環化合物2-デオキシス

トレプタミン (DOS) をアグリコンとするもので、ネオマイシン、カナマイシン、ゲンタマイシン、リボスタマイシン、プチロシン等々多くの抗生物質が知られている (図1)。

我々は、DOS の炭素環形成反応を触媒する2-デオキシ-*scyllo*-イノソース合成酵素の単離と遺伝子クローニングを機に *Bacillus circulans* 由来プチロシン生合成遺伝子クラスターと *Streptomyces fradiae* 由来ネオマイシン生合成遺伝子クラスターを特定した^{3~5)}。その後、諸外国の研究グループも類似DOS含有型アミノグリコシド系抗生物質遺伝子クラスターを特定し、現在では10以上の遺伝子クラスターが公共データベースに登録されている⁶⁾。

我々は、共通に見出される化学構造と生合成遺伝子との比較から翻訳産物の酵素機能を推定し、

図1. アミノグリコシド系抗生物質の構造



組換えタンパク質を用いた酵素反応解析を進めてきたおり、これまでに、我々と英国のグループによる研究から、グルコース-6-リン酸からブチロシン及びネオマイシンへと至る全ての生合成酵素機能が酵素反応レベルで解明されている(図2)⁷⁾。以下に興味ある酵素反応に着目した反応解析について述べる。

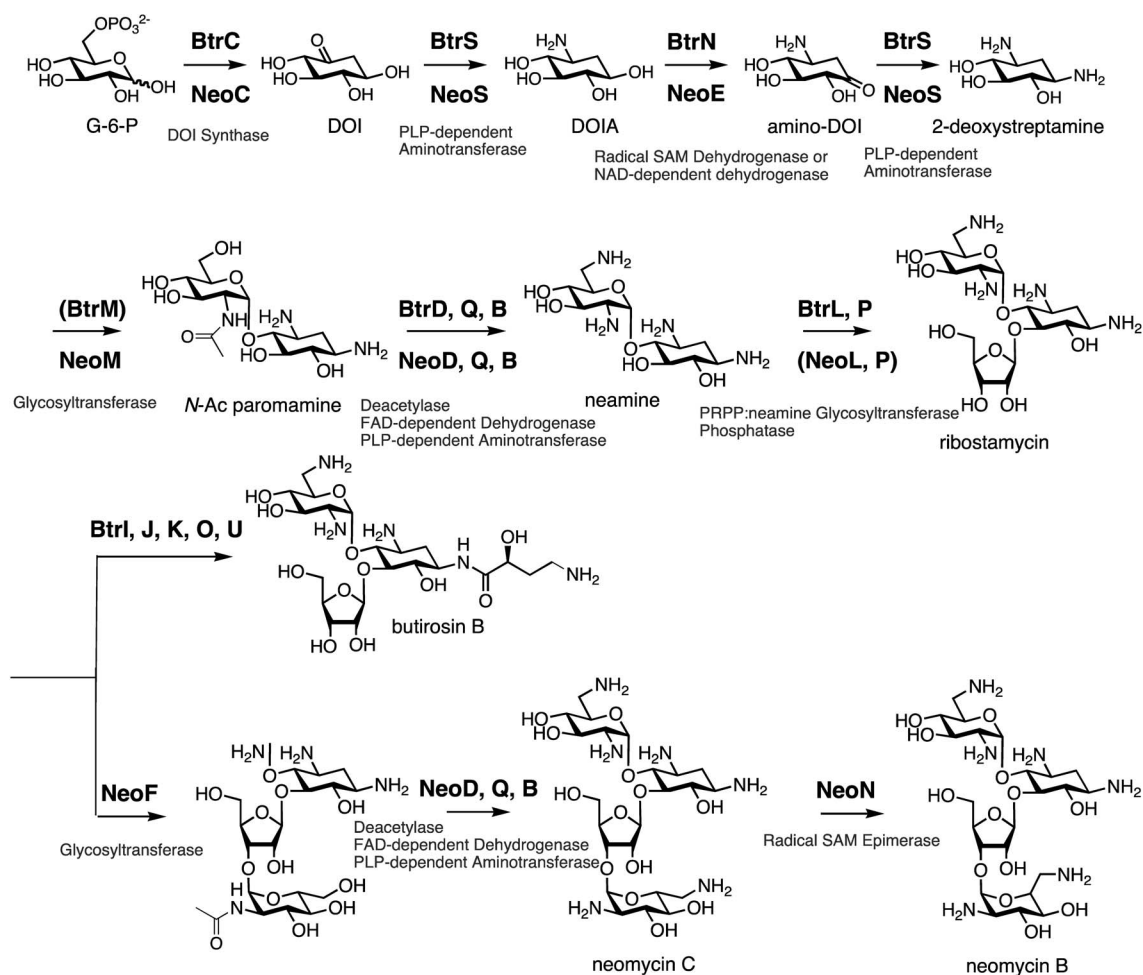
1.1 2-デオキシ-scyllo-イノソース合成酵素 BtrC

2-デオキシ-scyllo-イノソース合成酵素(DOI合成酵素)は、DOS含有型アミノグリコシド系抗生物質生合成の初発反応を触媒する酵素であり、グルコース-6-リン酸を基質とし、直接炭素六員環へ

と変換する。本酵素は、酸化、リン酸基の脱離、還元、開環、アルドール型反応といった多段階反応を単一酵素で触媒している。このような反応を行う酵素としては、芳香族アミノ酸生合成経路中のデヒドロキナ酸合成酵素(DHQ合成酵素)が知られており、DOI合成酵素は、デヒドロキナ酸合成酵素と相同性を持つことが知られているが、厳密な反応機構は異なることが明らかにされている^{8,9)}。

我々は*B. circulans*由来の本酵素(BtrC)の阻害剤との共結晶化に成功し、原子レベルでの基質認識機構、触媒機構を解明することに成功した¹⁰⁾。BtrCは、ダイマー構造を有し、活性に必須なコバルトイオンを中心としたN末端ドメインとC末端

図2. ブチロシンとネオマイシンの生合成経路と関与する生合成酵素



ドメインから構成されていた。前者は NAD^+ 結合ドメイン特有のRossmann-foldを示し、後者はDHQ合成酵素特有の α -ヘリックスから成るドメインに似た構造であることが明らかになった。

BtrCと阻害剤である β -D-カルバグルコース-6-リン酸および NAD^+ 補酵素との複合体の構造では、活性部位における基質周辺のアミノ酸残基が明らかとなり、基質認識および触媒に関与するアミノ酸残基が明らかとなった。

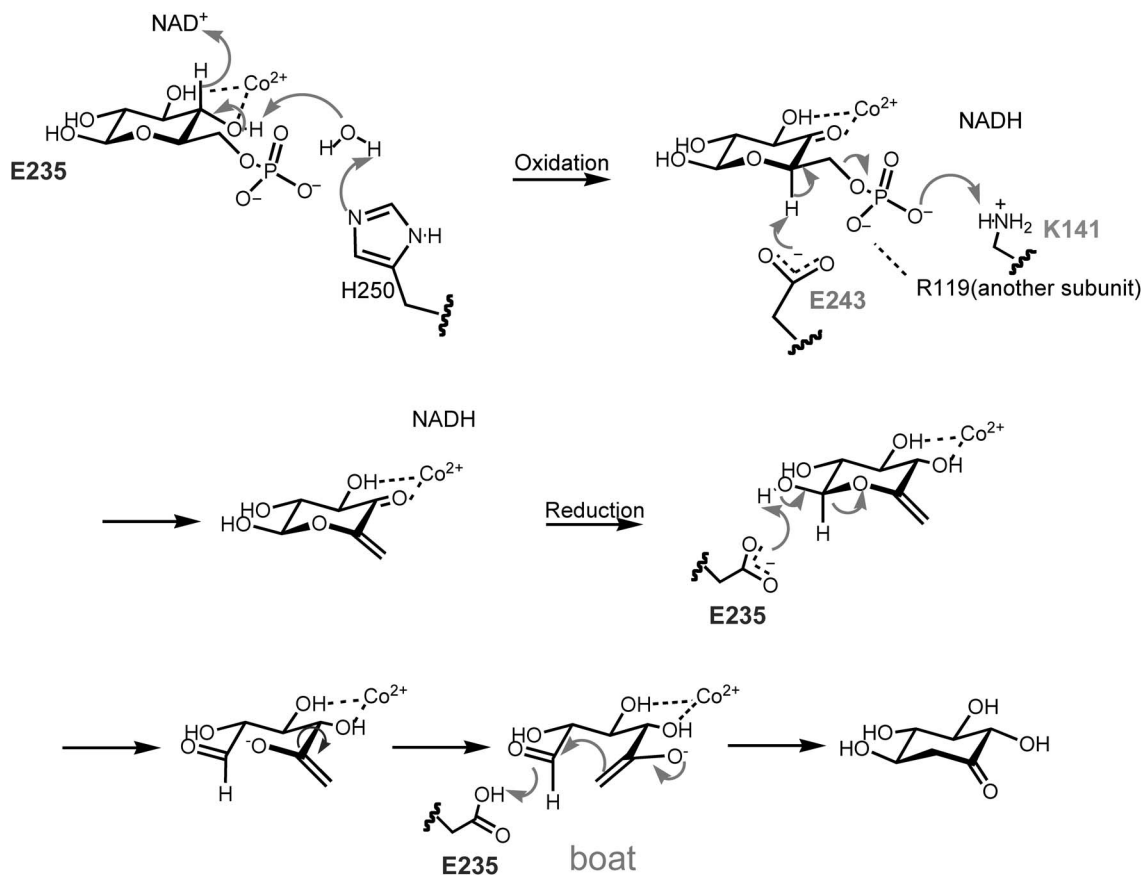
これら得られた知見より、反応機構の詳細は以下の様に考えられる(図3)。まず、4位水酸基のプロトンは、水分子を介してヒスチジン残基(His 250)によって引き抜かれ、基質は NAD^+ により酸化される。次に、Glu 243によって、5位プロトンの引き抜きが生じ、リン酸基の*syn*脱離が起き

る。その後の開環反応では、アノマー位を認識するGlu 235がプロトンを受容し、反応を促進していると考えられ、舟型遷移状態を経て環化反応が進行し、2-デオキシ-*scyllo*-イノソースが生成する。最後に、水分子を介して、Lys 141とGlu 243の間でプロトン移動が生じ、最初の状態に戻ると思われる。

DHQ合成酵素(*Aspergillus nidulans*由来)と構造を比較したところ、活性部位に存在するアミノ酸残基は非常に類似しており、違いは二つの残基のみであった(図4)。一つはBtrCにおけるGlu 235がアルギニン残基(Arg 264)に相当しており、この残基は両者の基質が異なる部分の認識に関与していた。

もう一つは、Glu 243であり、DHQ合成酵素で

図3. DOI合成酵素の反応機構



は、アスパラギン残基 (Asn 268) に相当していた。アスパラギン残基は中性残基であるため、プロトンの引き抜きは起こらず、結果として BtrC の Lys 141 に相当するリシン残基 (Lys 152) は、アンモニウム型 (NH_3^+) のまま存在していると考え

えられる。このリシン残基は炭素六員環形成の際、負電荷を持つエノラート中間体と静電的相互作用していると考えられており、リシン残基が酵素反応中にアミン型 (NH_2) へと変換される BtrC の場合は、このような静電的相互作用が生じないために、エノラートの最小回転で生成することができ、DHQ 合成酵素ではアルドール型環化反応が椅子型遷移状態を取るのに対し、DOI 合成酵素では舟型遷移状態を経由しているのではないかと考えられる。このように、両酵素間で一つの残基の違いにより酵素反応中の立体化学が大きく異なるということは大変興味深い。

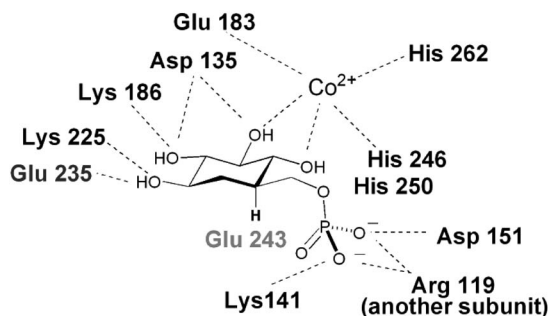
さらに両者の全体構造は、基本的には DHQ 合成酵素フォールドといわれる類似した構造を取っているが、基質 1 位を認識する残基を含むループ構造が異なっていた (図 5)。一般に二次代謝酵素は、一次代謝酵素から進化して生じるものと考えられており、一次代謝系にある DHQ 合成酵素と典型的な二次代謝酵素である DOI 合成酵素とのこのようなループ構造の違いがどの様に形成されてきたか、進化論的な興味も持たれる。

1.2 ラジカル SAM 脱水素酵素 BtrN

ブチロシン生合成遺伝子クラスター中にコードされる BtrN は、そのアミノ酸一次配列の相同性

図 4. DOI 合成酵素と DHQ 合成酵素の活性部位の比較

DOI synthase



DHQ synthase

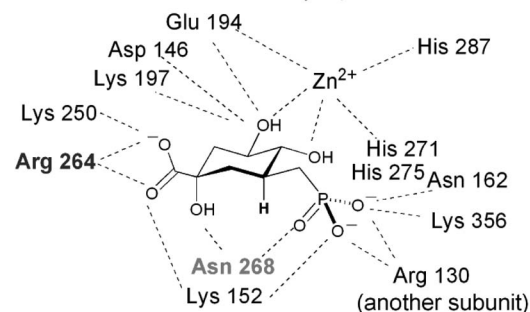
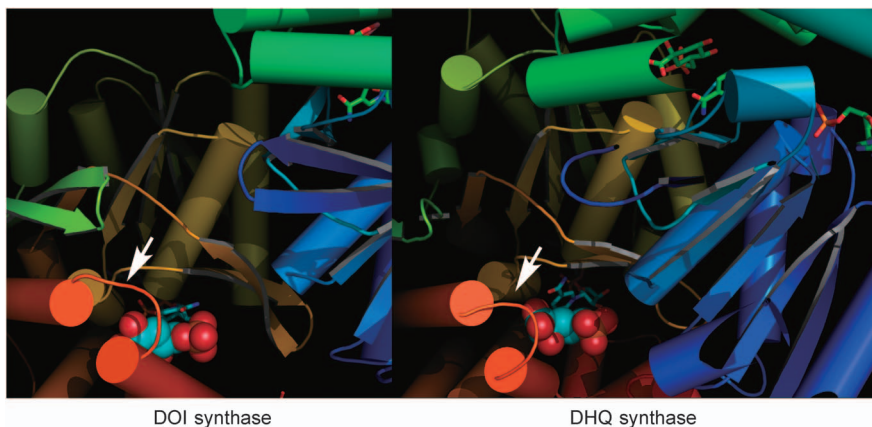


図 5. DOI 合成酵素と DHQ 合成酵素の基質 1 位の認識に関わるループ構造の比較



検索からラジカルSAM (*S*-アデノシル-L-メチオニン) 酵素と予想された。ラジカルSAM酵素は、4Fe-4Sクラスターを補因子として、SAMの還元的開裂によって生じる5'-デオキシアデノシルラジカルを用いて種々のラジカル反応を触媒する酵素の一群である。酵素間での相同性は高いものの、一般的にN末端側に共通の4Fe-4Sクラスター結合モチーフであるCXXXCXXCを有している。これまでの研究によってこれら3つのシステイン残基が3つの鉄原子に直接配位し、残る鉄原子にはSAMのカルボキシル基とアミノ基が配位していることが明らかとなっている。このことからSAMの開裂の反応機構に関して以下のように提唱されている。すなわち、活性型クラスターは1価の $[4\text{Fe-4S}]^+$ で、SAMに1電子与えることによって、SAMを還元的に開裂させて5'-デオキシアデノシルラジカルとL-メチオニンを生じる。この5'-デオキシアデノシルラジカルが様々なラジカル反応を引き起こすと考えられている(図6)^{11,12)}。

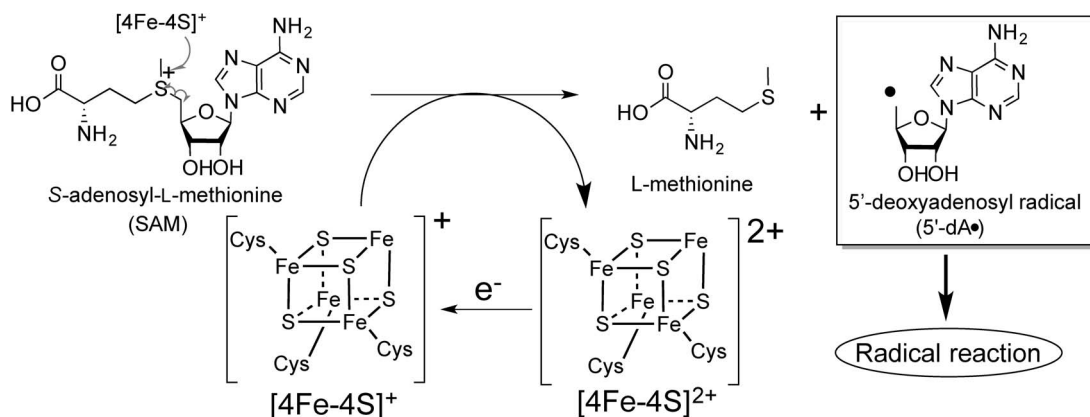
しかし、このようなラジカル反応を触媒すると予想される酵素がどのようにブチロシン合成に関わるかは不明であり、非常に興味深い問題であった。そこで我々は *B. circulans* の *btrN* 遺伝子欠損型破壊株 ($\Delta btrN$) を構築したところ、得ら

れた破壊株はブチロシン生産能を失っており、本遺伝子がブチロシン合成に関わっていることが分かった。さらに $\Delta btrN$ に対して生合成中間体の投与実験を行ったところ、DOSを投与した場合には抗生物質の生産が回復したが、2-デオキシ-scyllo-イノサミン (DOIA) 投与では抗生物質の生産を確認することができなかった。このことはブチロシン合成においてDOIA酸化反応にBtrNが関与することを示す結果である。

そこで次にBtrNが酵素として実際に酸化反応を触媒しているかを明らかにするために、大腸菌にて異種発現させ、その酵素活性の検出を試みた。ラジカルSAM酵素は一般に酵素に対して極めて不安定であることが知られていたため、BtrNを発現させた大腸菌の無細胞抽出液を嫌氣的に調製し、活性測定を行った。その結果、BtrNとSAM、DOIAを嫌気条件下で反応させたところ、DOIAからの酸化反応が進行した。以上の結果より、ブチロシン生産菌 *B. circulans* においてはネオマイシン生産菌 *S. fradiae* とは異なり、SAMをその活性に必要とする新規ラジカルSAM脱水素酵素BtrNがDOIA酸化反応を触媒していることが明らかになった。

ラジカルSAM酵素によるこのような水酸基の酸化反応は知られていなかったため、本酵素の反

図6. ラジカルSAM酵素のラジカル発生機構



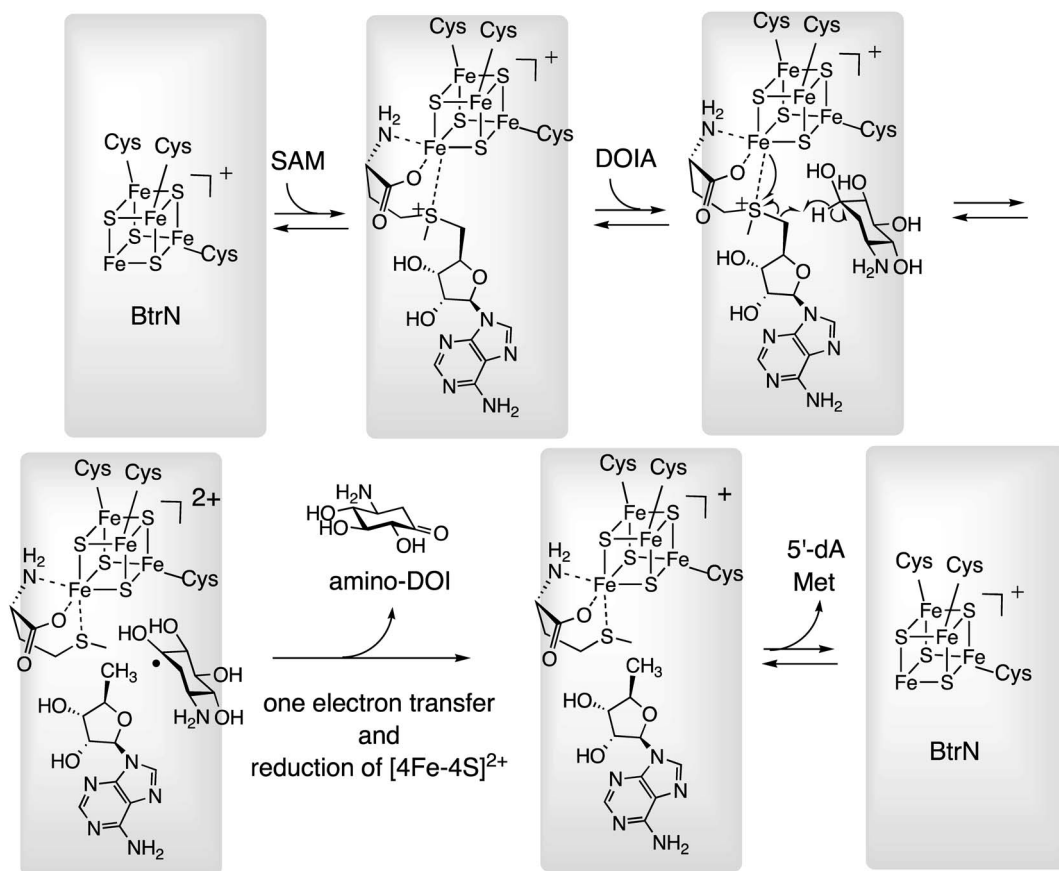
応機構解明に向けてさらに詳細な解析を進めた。まず、酵素反応生成物の解析を行ったところ、本反応ではDOIAの酸化に伴い、メチオニンと5'-デオキシアデノシンが生成していた。そこで、反応の当量関係を明らかにするために、酵素反応生成物と5'-デオキシアデノシンの生成量およびSAMの消費量の時間変化を追跡した。その結果、本反応では基質を酸化するために1当量のSAMが消費され、酵素反応生成物、5'-デオキシアデノシンおよびメチオニンが等量生成することが明らかになった。

さらに基質の重水素置換体による実験の結果、本反応は酵素活性部位内で生じた5'-デオキシアデノシルラジカルがタンパク質アミノ酸側鎖などを介さず直接基質3位の水素原子を可逆的に引き

抜くラジカル機構で進行することが明らかになった。

さらにEPR測定や反応速度論の実験から、BtrNの反応機構は次のように考えられる(図7)。すなわち、SAMの還元的解裂によって生じた5'-デオキシアデノシルラジカルが基質3位の水素原子を直接引き抜くことでラジカル中間体を与える。この後、ラジカル中間体がケトンへと酸化されるが、反応系中に電子受容体が存在しないことから、BtrN自身の酸化型 $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ クラスターを還元することによって反応が進行するものと思われる。今回の結果は酵素反応において5'-デオキシアデノシルラジカルのような有機ラジカル種が水酸基の酸化反応を引き起こすことを示すことができた初めての例である。また、このような反応

図7. ラジカルSAM脱水素酵素BtrNの反応機構



の存在から、嫌気的な条件下では、SAMが従来知られていたようなメチル化の他に、酸素に代わる酸化剤としての役割を果たしていると考えられる^{13,14)}。

1.3 ラジカルSAM異性化酵素 NeoN

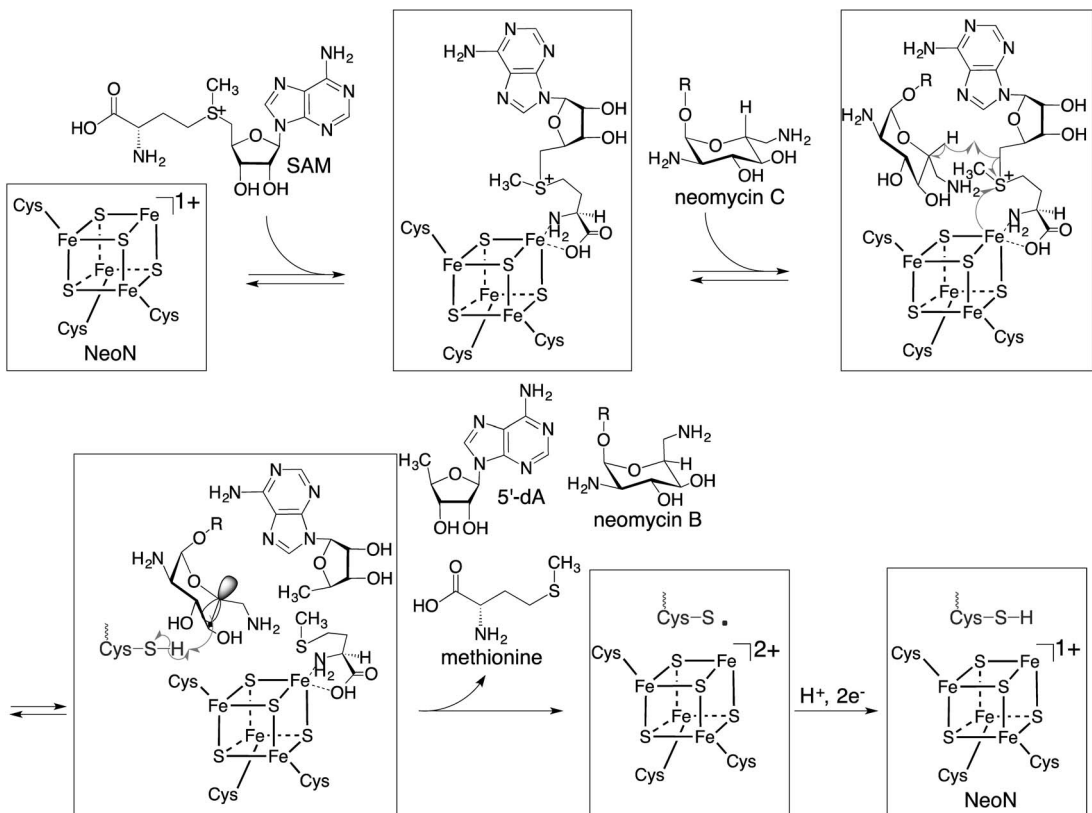
ネオマイシン生合成における最終段階は、ネオマイシンCからネオマイシンBへと至る5'''位のエピメリ化反応である。この反応は、遺伝子クラスターの情報からラジカルSAM酵素 NeoN が担うものと考えられた⁶⁾。

先にも述べたように、一般にラジカルSAM酵素は酸素に非常に不安定で、酸素存在下では不活性型であるアポ型へと変換されてしまうことが知られている。そこで我々は、高い活性を有する精製酵素 NeoN を得るべく検討し、酵素反応機構解

析を行った。

NeoNの反応は、BtrNの反応と同様にSAMを1当量必要とする化学量論反応であることが明らかとなった。さらに、重水で調製した緩衝液中での酵素反応解析を行い、ネオマイシンBのC-5'''位に重水素が導入されることが分かった。すなわち、本反応で生じたラジカル中間体がシステイン残基等のプロトン交換可能な水素を引き抜き反応が完結することが明らかとなった。さらに酵素の変異実験、ESR解析等の実験から、次の様なNeoNによるラジカル異性化反応機構を提唱できた。すなわち、5'-デオキシアデノシルラジカルが基質5'''位の水素原子を直接引き抜くことでラジカル中間体を与える。その後、ラジカル中間体が酵素内のシステイン残基によって、水素原子が供与され、エピメリ化反応が完結する(図8)。生じ

図8. ラジカルSAMエピメリ化酵素NeoNの反応機構



たチイルラジカル種およびクラスターは、何らかの還元剤により還元され最初の状態に戻るものと思われる。本例はラジカルSAM酵素が触媒するエピメリ化反応の機構を初めて明らかにしたものである。

我々は、この様にラジカルSAM酸化酵素BtrNとネオマイシンCエピメリ化酵素NeoNの2つのDOS含有型アミノグリコシド系抗生物質生合成中のラジカルSAM酵素の機能を明らかにしてきた。またLiuらによりゲンタマイシン生合成におけるラジカルSAM依存C-メチル化酵素GenKの解析がなされており¹⁵⁾、アミノグリコシド生合成中のラジカルSAM酵素の機能が明らかとなりつつある。この他にも、アミノグリコシド生合成遺伝子中には、様々なC-メチル化やデオキシ化など化学的にも興味深い反応を触媒すると考えられるラジカルSAM酵素が多数コードされており、なぜ多くラジカルSAM酵素がアミノグリコシド生合成遺伝子中に含まれているのかは不明であるが、今後のさらなる酵素機能解明により、その答えを導き出したいと考えている。

2. 終わりに

以上のようにアミノグリコシド系抗生物質に関する研究では、我々は世界で初めてプチロシン、ネオマイシンの生合成経路を遺伝子・酵素レベルで明らかにした。これらの生合成遺伝子クラスター内に存在する遺伝子のアミノ酸配列相同性検索などの生物情報学的手法に加え、類似化合物の生合成遺伝子の比較から、各反応を触媒する酵素を予想し、発現酵素を用いて酵素活性を調べた。その結果、プチロシンおよびネオマイシン生合成に必要なほとんどの酵素の機能を*in vitro*で明らかにした。各アミノグリコシド系抗生物質の生合成について、それぞれの糖部分の修飾された構造に特化した特異な酵素遺伝子がコードされている

ことが分かった。それに加えて予想外に、アミノグリコシド系抗生物質生合成においては、共通の糖部分の修飾反応は同一の酵素が二度ずつ繰り返し同じ反応を触媒していることを見出した^{16,17)}。本生合成経路の特徴は基質認識が寛容な酵素の反復利用である。一般に酵素は基質認識が厳しく、たとえ同一代謝経路中の同様の反応であっても異なる酵素が触媒することがほとんどである。それゆえ類縁体調製への応用も困難である。様々な基質類縁体との反応から、その特異な基質認識機構の解析を行い、酵素がいかに反応性や特異性を失わずに、基質一般性を広げることに成功しているかということについての知見を得ることができた。このような酵素の基質認識機構は分子認識のモデルと考えられ、化学の広い分野にとって有用な知見である。今後は基質認識の寛容なこれらの酵素を用いた類縁体調製が可能と考えられ、多様な抗生物質生合成酵素を用いた抗生物質ライブラリーの調製への道を開いたことになり、さらなる発展と多方面への波及効果が期待される。

謝辞

本研究は東京工業大学大学院理工学研究科で行われた成果であり、工藤史貴准教授を始めとする研究室のスタッフおよび学生諸君の努力の賜物であり、ここに深く謝意を示したいと思います。また、本研究は文部科学省科学研究費、上原記念生命科学財団の支援を受けたものであり、ここに感謝いたします。最後に本研究のきっかけを与えていただいた故 柿沼勝己教授に感謝したいと思います。

参考文献

- 1) CLARDY, J. & C. WALSH: Nature 432: 829~837, 2004
- 2) DAVIES, J.: in Aminoglycoside antibiotics. In the beginning there was streptomycin. (eds. ARYA,

- D. P.) 1~13 (John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, 2007).
- 3) OTA, Y.; H. TAMEGAI, F. KUDO, *et al.*: Butirosin-biosynthetic gene cluster from *Bacillus circulans*. *J. Antibiotics* 53: 1158~1167, 2000
- 4) KUDO, F.; M. NUMAKURA, T. HIDEYUKI, *et al.*: Extended sequence and functional analysis of the butirosin biosynthetic gene cluster in *Bacillus circulans* SANK 72073. *J. Antibiotics* 58: 373~379, 2005
- 5) KUDO, F.; Y. YAMAMOTO, K. YOKOYAMA, *et al.*: Biosynthesis of 2-deoxystreptamine by three crucial enzymes in *Streptomyces fradiae* NRBC 12773. *J. Antibiotics* 58: 766~774, 2005
- 6) KUDO, F. & T. EGUCHI: Biosynthetic genes for aminoglycoside antibiotics. *J. Antibiotics* 62: 471~481, 2009
- 7) KUDO, F. & T. EGUCHI: Biosynthetic enzymes for the aminoglycosides butirosin and neomycin. *Methods Enzymol.* 459: 493~519, 2009
- 8) KUDO, F.; H. TAMEGAI, T. FUJIWARA, *et al.*: Molecular cloning of the gene for the key carbocycle-forming enzyme in the biosynthesis of 2-deoxystreptamine-containing aminocyclitol antibiotics and its comparison with dehydroquinase synthase. *J. Antibiotics* 52: 559~571, 1999
- 9) NANGO, E.; F. KUDO, T. EGUCHI, *et al.*: Reaction stereochemistry of 2-deoxy-*scyllo*-inosose synthase, the key enzyme in the biosynthesis of 2-deoxystreptamine. *Chem. Lett.* 32: 438~439, 2003
- 10) NANGO, E.; T. KUMASAKA, T. HIRAYAMA, *et al.*: Structure of 2-deoxy-*scyllo*-inosose synthase, a key enzyme in the biosynthesis of 2-deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics, in complex with a mechanism-based inhibitor and NAD⁺. *Proteins* 70: 517~527, 2008
- 11) FREY, P. A.: Travels with carbon-centered radicals. 5'-Deoxyadenosine and 5'-deoxyadenosine-5'-yl in radical enzymology. *Acc. Chem. Res.* 47: 540~549, 2014
- 12) BRODERICK, J. B.; R. D. BENJAMIN, S. D. KAITLIN, *et al.*: Radical *S*-adenosylmethionine enzymes. *Chem. Rev.* 114: 4229~4317, 2014
- 13) YOKOYAMA, K.; M. NUMAKURA, F. KUDO, *et al.*: Characterization and mechanistic study of a radical SAM dehydrogenase in the biosynthesis of butirosin. *J. Am. Chem. Soc.* 129: 15147~15155, 2007
- 14) YOKOYAMA, K.; D. OHMORI, F. KUDO, *et al.*: Mechanistic study on the reaction of a radical SAM dehydrogenase BtrN by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 47: 8950~8960, 2008
- 15) KIM, H. J.; R. M. MCCARTY, Y. OGASAWARA, *et al.*: GenK-catalyzed C-6' methylation in the biosynthesis of gentamicin: isolation and characterization of a cobalamin-dependent radical SAM enzyme. *J. Am. Chem. Soc.* 135: 8093~8096, 2013
- 16) YOKOYAMA, K.; F. KUDO, M. KUWAHARA, *et al.*: Stereochemical recognition of doubly functional aminotransferase in 2-deoxystreptamine biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 5869~5874, 2005
- 17) YOKOYAMA, K.; Y. YAMAMOTO, F. KUDO, *et al.*: Involvement of two distinct *N*-acetylglucosaminyltransferases and a dual-function deacetylase in neomycin biosynthesis. *ChemBioChem* 9: 865~869, 2008