

## 〈総 説〉

# 創薬を志向した微生物の生合成工学

大 利 徹

北海道大学大学院工学研究院応用化学部門応用生物化学研究室

(2017年11月7日受付)

アミノ酸発酵に代表されるように、日本では微生物が持つ代謝活性を物造りに有効活用してきた。古くは望む代謝活性を持つ微生物のスクリーニングが主であったが、近年はメタゲノムも含めゲノム情報からのアプローチが可能となった。筆者は本手法を用い、一次代謝ではメナキノンやペプチドグリカンの新規生合成経路を発見し、二次代謝では放線菌や糸状菌が生産する生理活性物質の詳細な生合成機構の解明を行ってきた。さらに前者では新規経路特異的阻害剤の探索による抗ピロリ菌剤への展開、後者では半合成に適した生合成中間体蓄積株の育種と応用へも発展させてきた。本総説では、これらの詳細について紹介する。

### 1. 序文

筆者は、ゲノム情報が活用できつつあった20年ほど前から、放線菌が生産する生理活性物質、特にイソプレノイド化合物の生合成研究を行ってきた。当時、放線菌が生産するポリケチド系やペプチド系の化合物の生合成研究が精力的に行われていたが、テルペノイド化合物に関しては、ジベレリンや天然ゴムなどに代表される植物が生産する化合物の研究が中心であった。筆者は報告例が少ないものの多くの二次代謝産物を生産する放線菌からもイソプレノイド化合物が単離されていたことに着目し、原核生物である放線菌が生産するイソプレノイド化合物の生合成研究を他に先駆けて行ってきた。これら一連の研究により、2004年に「放線菌が生産するイソプレノイド抗生物質の生合成研究」のタイトルで住木・梅澤記念賞を受

賞した。これらの詳細は住木・梅澤記念賞受賞講演会記録<sup>1)</sup>で紹介したので、本総説ではその後に得られた新たな研究成果について紹介したい。

微生物の代謝経路は、主に大腸菌や出芽酵母を用いて明らかにされ、生育に必須な化合物を供給する一次代謝経路の生合成経路は全菌株で同じであると考えられてきた。しかし個々の菌株のゲノム配列が明らかになるにつれ、一次代謝経路であっても多様性があることが分かってきた。例えばイソプレノイド化合物の出発原料であるイソペンテニル2リン酸の生合成経路は主に発芽酵母を用いて明らかにされ、メバロン酸経路として知られていたが、大腸菌では2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) 経路を用いることが明らかにされた<sup>2,3)</sup>。筆者は当時MEP経路の解明を精力的に行っていた東京大学の葛山・瀬戸先生と共同研

究する機会を得たことを契機に、微生物が持つ多様な一次・二次代謝経路に興味を持ち、その後の研究を展開してきた。具体的には一次代謝ではメナキノンとペプチドグリカンの生合成に関与する新規生合成酵素・経路を発見し、二次代謝では放線菌や糸状菌が生産する生理活性物質の詳細な生合成機構の解明を行ってきた。さらに新規経路特異的阻害剤の探索による抗生剤開発への展開や実用医薬品開発のための半合成に適した生合成中間体蓄積株の育種など応用へも発展させてきた。以下、これらの詳細について紹介したい。

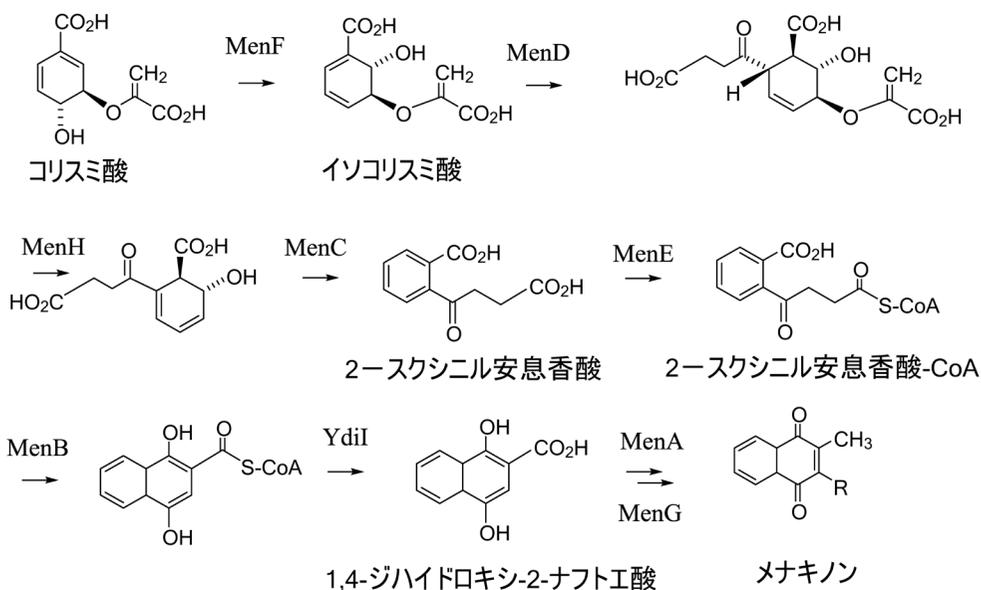
### 2-1. メナキノン新規生合成経路

メナキノン (Menaquinone ; MK) は、微生物の呼吸の際の電子伝達系成分として生育に必須である。MKの生合成は1970-80年代に主に大腸菌を用いて研究され、コリスミ酸からスクシニル安息香酸を経る経路が明らかにされた(図1)<sup>4)</sup>。しかし筆者はゲノム解析が終了していた放線菌 *Streptomyces coelicolor* と *Streptomyces avermitilis* は、呼吸の際MKを使うにもかかわらず、大腸

菌で同定された生合成遺伝子 *menF*, *menD*, *menC* (図1) を全く持たないことに気づいた。他方ナフトキノン骨格にプレニル側鎖とメチル基を付ける *menA* と *menE* 遺伝子は存在したことから、MKのナフトキノン骨格のみが既知経路とは異なる経路で生合成されると考えられた。さらにMKを作ることが知られており、かつゲノム解析が終了していた微生物のうち、胃潰瘍・胃がんの原因菌として知られている *Helicobacter* 属細菌、食中毒原因菌として知られている *Campylobacter* 属細菌、高度好熱菌である *Thermus* 属細菌でも *menF*, *menD*, *menC* 遺伝子を見いだせなかったことから、これら微生物でもMKのナフトキノン骨格は全く新規な経路により生合成されると考えられたことから、その解明を試みた。

詳細は紙面の都合で省略するが、最初に<sup>13</sup>Cでラベルされたグルコースを用いたトレーサー実験を行い、*S. coelicolor* ではMKが大腸菌とは異なるラベルパターンを示すことを確認した<sup>5)</sup>。次に、本新規経路に関与する遺伝子をゲノム情報を活用して推定した。ゲノム解析が終了していた微生物

図1. 大腸菌を用いて明らかにされたメナキノン既知生合成経路



の中から、既知MK生合成経路を持つ微生物に存在せず、新規経路を持つ微生物にのみ存在する遺伝子を探索し、最終的に*S. coelicolor*のSCO4506 (MqnA), SCO4326 (MqnD), SCO4327 (MqnB), SCO4550 (MqnC) の4遺伝子を新規経路に関与する候補として選抜した<sup>6)</sup>。

次いでこれら遺伝子の破壊実験を行った。候補遺伝子を2点交差の相同組換えにより抗生物質耐性遺伝子に置換した結果、何れの破壊株も培地にMKを添加した時のみ生育可能であり、4つの遺伝子が新規経路に関与することを証明した。またこの事実はMKの生合成は微生物の生育に必須であり、さらに破壊株が生育するためには、ヒトが食事では摂取できない大量のMK (100–200 µg/ml) を培地に添加する必要があることから、本新規経路は抗ピロリ菌剤開発のためのターゲットになり得ると考えられた<sup>6)</sup>。

また、新規経路が一次代謝の何の化合物から分岐して生合成されるかの知見を得るため、変異剤によるMK生合成欠損株の取得と相補遺伝子の同定も行った。その結果、幾つかの変異株はコリスミ酸シンターゼ (SCO1496) で相補された。本酵素が触媒する反応は不可逆反応であることから、新規経路は既知経路同様コリスミ酸を出発基質とするがその後全く別経路を経ると考えられた<sup>6)</sup>。

次に生合成中間体の取得・同定を試みた。上述した破壊株はMKを外から添加しないと生育できない。しかし4つの破壊株をMK存在下で培養し、添加したMKを溶媒で抽出・除去後、残った水溶性画分を凍結乾燥し培地に添加後、他の3つの破壊株の生育が回復するか検討した結果、SCO4506破壊株から調製した抽出物を添加した際は、他の3株の生育は認められなかったが (このことはSCO4506が生合成上、最上流の反応に関与することを示唆する)、残りの3つの破壊株の抽出物を加えた際、少なくとも他の1つの破壊株の生育が認められた。従ってこれら破壊株培養液中には生合

成中間体が蓄積しており、さらに4つの遺伝子が関与する生合成上の相対位置もSCO4506 (MqnA) → SCO4327 (MqnB) → SCO4550 (MqnC) → SCO4326 (MqnD) と決定できた<sup>6)</sup>。

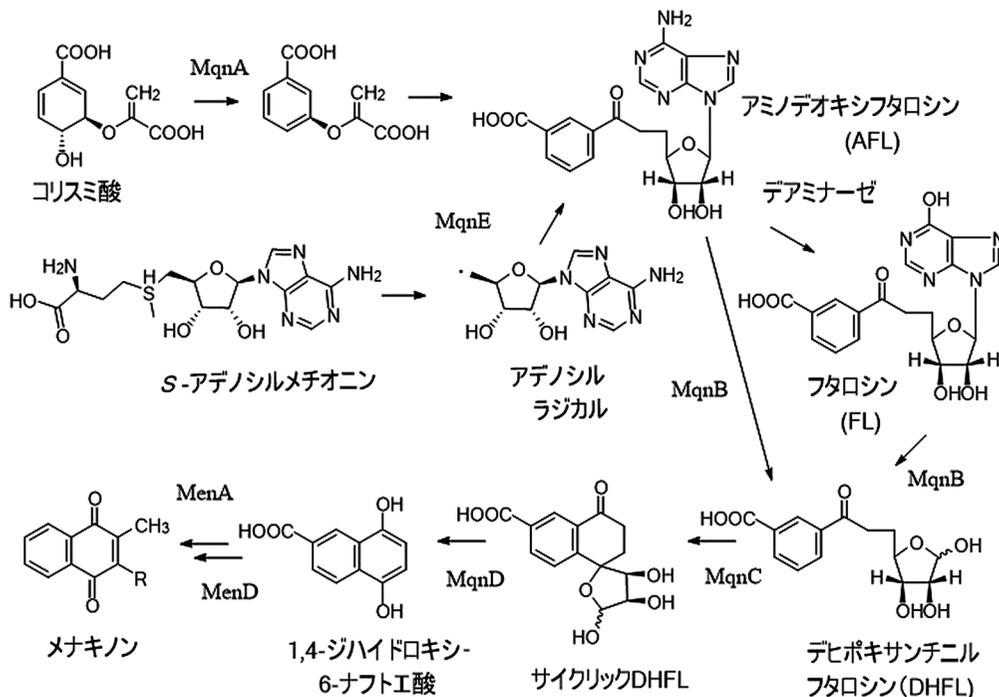
そこで本手法を用い生合成中間体の精製、構造決定を行った。SCO4327破壊株をMK存在下で大量培養後、溶媒による添加MKの除去、各種クロマトグラフィーによる分画、SCO4506破壊株を被検菌に用いたバイオアッセイを繰り返すことにより蓄積中間体を均一に精製することができた。構造解析の結果、本化合物は以前放線菌から単離報告のあるFutalosine (FL) であることが分かった (図2)<sup>6)</sup>。

SCO4327破壊株がFLを蓄積したことから、SCO4327酵素はFLを次の中間体に変換すると考えられた。そこで熱安定性に優れている高度好熱細菌である*Thermus thermophilus*由来のSCO4327相同酵素の組換え酵素とFLを用いて反応させた結果、Dehypoxanthinyl futalosine (DHFL) が生成した (図2)<sup>6)</sup>。

次にSCO4550の組換え酵素がDHFLを次の中間体に変換するか検討した。しかし本酵素はラジカルSAM酵素 (Radical S-adenosyl-L-methionine 酵素) と総称される酵素に属し、酸素感受性で精製が難しく活性を検出できなかった。そこで次の反応を触媒すると予想されたSCO4326破壊株が蓄積する中間体の単離を行いCyclic DHFLを得た。なおSCO4550の酵素反応機構はTexas A&M大学のT. Begley教授との共同研究により最近解明に成功した<sup>7)</sup>。次いでCyclic DHFLとSCO4326組換え酵素を用いて次の中間体の同定を行った結果、1,4-Dihydroxy-6-naphthoateであることが分かった (図2)<sup>6)</sup>。

次に、FL生成機構の手掛かりを得るため、新たにゲノム解析された菌株の*mqn* 遺伝子を探索した結果、好熱放線菌である*Acidothermus cellulolyticus* では遺伝子群が2箇所にクラスターを成していた。

図2. 今回明らかにしたメナキノン新規生合成経路 (Futalosine 経路)



その一方にアデノシンデアミナーゼ (Acel\_0264) が含まれていたことから、本酵素の新規経路への関与を検討した。化学合成したアミノ体のフトロシン (Aminodeoxy futalosine: AFL) と組換えアデノシンデアミナーゼを反応させた結果、予想通り FL が生成した<sup>8)</sup>。また本菌株が持つ MqnB は、AFL に作用せず FL のみに作用した<sup>8)</sup>。したがって放線菌ではコリスミ酸→AFL→FL→DHFL の順番で生合成されることが分かった。他方、ピロリ菌の MqnB は AFL にのみ作用したことから、ピロリ菌ではコリスミ酸→AFL→DHFL の順番で生合成されることが分かり、新規経路の初発反応には多様性があることが判明した (図2)<sup>8)</sup>。

上述した *A. cellulolyticus* のクラスター中には、機能不明のラジカル SAM 酵素遺伝子が含まれていた (*S. coelicolor* の SCO4494 に相当; MqnE)。そこで組換え酵素を用いて検討した結果、SCO4506 (MqnA) と SCO4494 (MqnE) のみで AFL が生成することが分かった<sup>9)</sup>。興味深いことに、通常ラ

ジカル SAM 酵素は S-アデノシルメチオニン由来のアデノシルラジカルが反応の起点となり、種々のラジカル反応を触媒するのに対し、SCO4494 は生じたアデノシルラジカルそのものを基質として用い、SCO4506 (MqnA) により生じた芳香環化したコリスミ酸に付加することが分かった (図2)。

## 2-2. FL 経路阻害剤の探索

今回解明した FL 経路はピロリ菌、食中毒原因菌として知られているカンピロバクター属細菌、クラミジアなどの病原微生物も有している。上述の実験で MK の生合成は微生物の生育に必須であったことから、新規経路の阻害剤は、これら病原菌に対する特異的抗生剤になると期待されることから天然物に探索した。

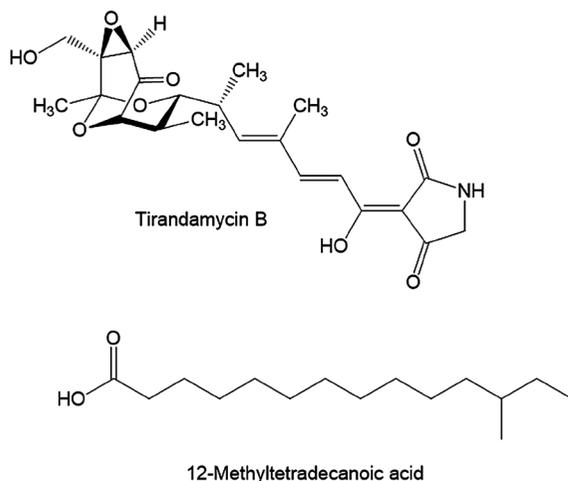
筆者の研究室ではピロリ菌を扱えないため、2 種類の納豆菌類縁菌を用いてアッセイを行った。*Bacillus subtilis* と *Bacillus halodurans* はゲノム解析の結果から最も近縁な微生物と報告されて

いるが、MKの生合成経路は異なり、前者は既知経路、後者はFL経路を使う。そこで後者の生育を特異的に阻害し、かつその阻害がMKの添加で回復する化合物を天然物に探索した。その結果、12-Methyltetradecanoic acid<sup>10)</sup>とTirandamycin B<sup>11)</sup>がFL経路を阻害することが分かった(図3)。さらに、他グループによりエイコサペンタエン酸とSiamycin Iも本経路を阻害すると報告された<sup>12)</sup>。

### 2-3. 微生物のペプチドグリカン生合成に関与する新規グルタミン酸エピメラーゼ

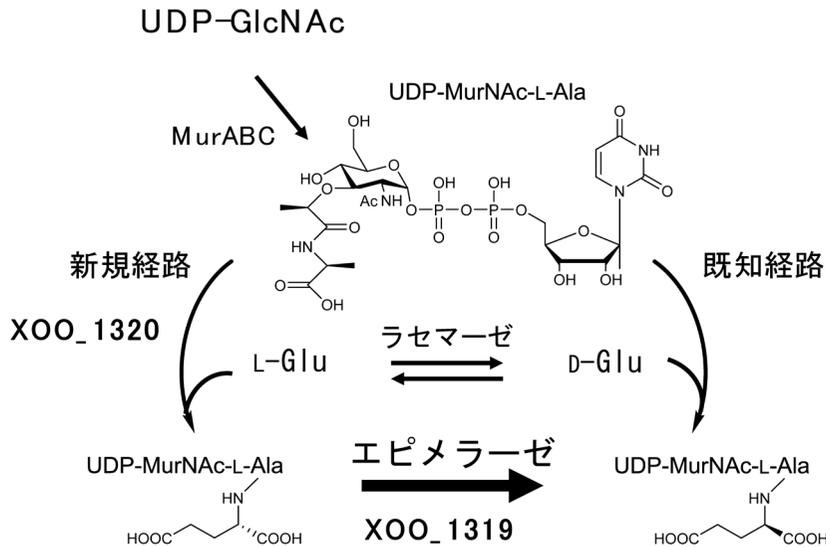
微生物ペプチドグリカンの1ユニットは、UDP-N-Acetylmuramic acid (UDP-MurNAc) にペプチドが結合した中間体からなり、6つの酵素によりUDP-N-Acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) から生合成される。最初にMurAとMurBによりUDP-GlcNAcからUDP-MurNAcが生成し、次いでMurCからMurFの4つのアミド結合形成酵素により、順次L-アラニン (L-Ala)、D-グルタミン酸 (D-Glu)、メソ-ジアミノピメリン酸 (またはL-リジン)、D-Ala-D-Alaが付加される<sup>13)</sup>。この際に用いられるD-Gluは、グルタミン酸ラセマーゼとD-アミノ酸アミノトランスフェラーゼにより生合成される。

図3. Futilosine経路阻害剤の構造



しかし、*Xanthomonas*や*Xylella*属細菌は上記の両遺伝子を持っていないことから、D-Glu要求性大腸菌と*Xanthomonas oryzae* (MAFF311018)のゲノムDNAを用いたショットガンクローニングを行った結果、XOO\_1319とXOO\_1320の両遺伝子で相補された<sup>14)</sup>。前者は機能未知であるが、後者は上述のMurD (UDP-MurNAc-L-AlaにD-Gluを付加する酵素)と相同性を有していた。各々単独ではD-Glu要求性を相補せず、その反応機構に興味を持たれたことから更なる解析を行った。最初にXOO\_1319とXOO\_1320の組換え酵素を調製し、各々単独で、あるいは共存下で、L-Gluのラセミ化活性が検出できるか検討したが、何れにおいても活性は検出できなかった。そこで、MurDに相同性を示したXOO\_1320が、予想される反応であるUDP-MurNAc-L-AlaへのD-Gluの付加反応を触媒するか検討した結果、コントロールとして用いた大腸菌の組換えMurDは高い活性を示したのに対し、XOO\_1320では微弱な活性しか検出できなかった。そこで、上述の相補実験で2つの遺伝子が必須であった事実から、XOO\_1319とXOO\_1320の両組換え酵素とUDP-MurNAc-L-AlaとL-Gluを基質に用いて反応を行った結果、効率よくUDP-MurNAc-L-Ala-D-Gluが生成した。詳細に解析した結果、XOO\_1320がUDP-MurNAc-L-AlaにD-GluではなくL-Gluを付加しMurNAc-L-Ala-L-Gluが生成した後、XOO\_1319が生成物末端のL-GluをD-Gluに異性化していることが分かった(図4)<sup>14)</sup>。以上の結果から、XOO\_1320はL-Gluを基質に用いる初めてのMurDであり、XOO\_1319は新規なL-Gluエピメラーゼであることが判明した。しかし反応機構の詳細については未解明であることから、現在、結晶構造解析を試みている。なおXOO\_1319の相同遺伝子は、 $\gamma$ -プロテオバクテリアに属する*Stenotrophomonas*属、*Dyella*属、*Frateria*属、*Rhodanobacter*属、*Wenzhouxiangella*属、*Pseudoxanthomonas*属、

図4. 新規ペプチドグリカン生成機構



*Lysobacter* 属細菌や、稀少放線菌である *Micromonospora* 属, *Actinoplanes* 属, *Verrucosipora* 属, *Salinispora* 属, *Dactylosporangium*, *Longispora*, *Solirubrobacter* 属, *Catenuloplanes* 属細菌などに存在した。

今回見出した生合成機構は、イネ白葉枯病菌 (*X. oryzae*) に加え、果樹の病原菌である *Xylella* 属細菌, 病院内で日和見感染し、重篤な免疫不全、肺炎などを引き起こす *Stenotrophomonas* 属細菌が利用している。そこで XOO\_1319 と XOO\_1320 の特異的阻害剤は、これら病原菌の特異的農薬・抗生剤になると考えられる。具体的なスクリーニング方法としては、Glu ラセマーゼ欠損に起因する D-Glu 要求性 WM335 株をペーパーディスクアッセイの被検菌に用いて可能である。①培地に D-Glu を添加し WM335 株を植菌した軟寒天重層培地と、② XOO\_1319 と XOO\_1320 を発現させた WM335 株を植菌した軟寒天重層培地の2種類を用いる。ペプチドグリカンの生合成では、前者①は添加 D-Glu を利用するのに対し、後者②では XOO\_1319 と XOO\_1320 が供給する。したがって、前者①には抗菌活性を示さず、後者②のみに活性

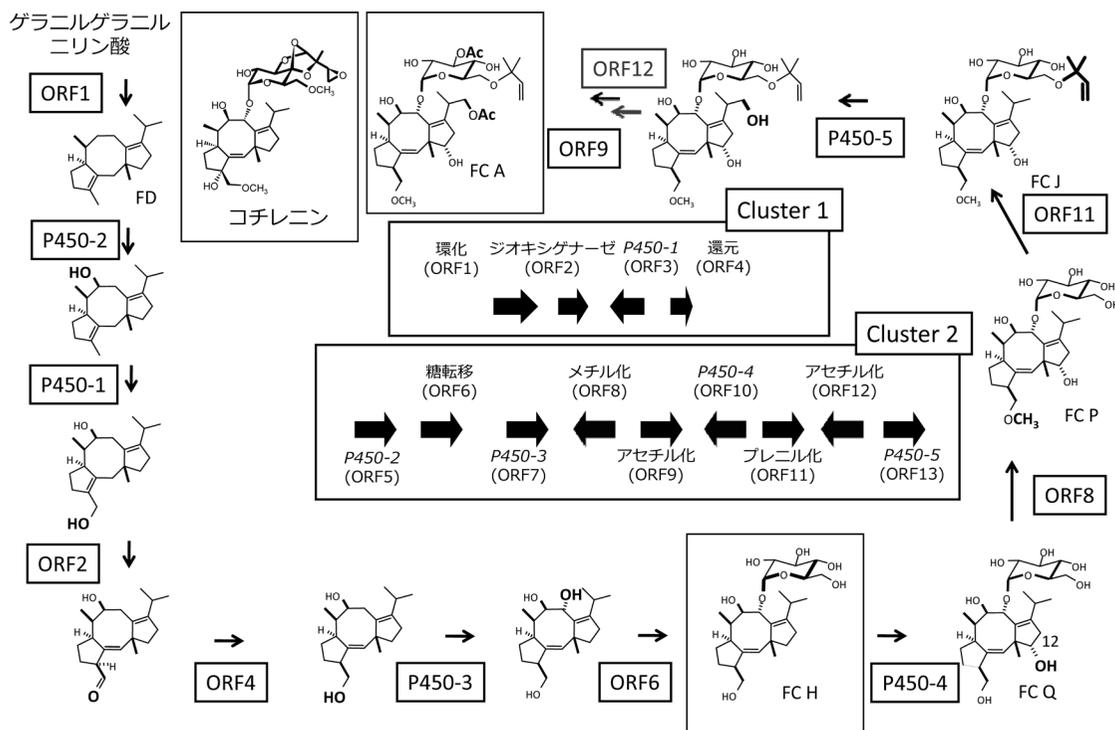
を示す化合物は、XOO\_1319 あるいは XOO\_1320 の阻害剤と考えられる。現在、本系を用いて、放線菌やカビの培養液に候補化合物を探索している。

#### 2.4. 生合成工学による半合成に有利な中間代謝物生産

糸状菌が生産するジテルペン配糖体であるコチレニン (図5) は、抗がん剤として極めて有望であったが、その産生菌体が継代培養の過程で絶え供給不可能となった。そこで、コチレニンの構造類似体である Fusicoccin (FC) を用いて構造活性相関試験が行われた結果、FC の 12 位の水酸基を除去した化合物がコチレニン様活性を有することがわかった。そこで筆者は糸状菌である FC 産生菌 *Phomopsis amygdali* 染色体上の 12 位水酸化酵素遺伝子を同定し破壊することによる半合成に有用な中間体蓄積株の育種を行った<sup>15~20)</sup>。

最初に、既に同定されていた FC の基本骨格であるフシコッカジエンを生成するゲラニルゲラニル 2 リン酸 (GGDP) 環化酵素遺伝子 (ORF1) の近傍に関連遺伝子が存在するか検討した結果、ジオキシゲナーゼ (ORF2), Cytochrome P450 (ORF3 :

図5. Fusicoccin (FC) 生合成経路と生合成遺伝子クラスター



P450), 還元酵素 (ORF4) の合計4つからなるクラスター1を同定できた (図5)<sup>15)</sup>。しかし他の生合成遺伝子は存在しなかったため、FC生産菌のドラフトゲノム解析を行った結果、約21kbのDNA断片内に4つのP450遺伝子 (P450-2 (ORF5), P450-3 (ORF7), P450-4 (ORF10), P450-5 (ORF13)), 糖転移 (ORF6), メチル基転移 (ORF8), アセチル基転移2つ (ORF9とORF12), プレニル基転移遺伝子 (ORF11) の合計9個の遺伝子からなる生合成遺伝子クラスター2を同定できた (図5)<sup>20)</sup>。

見出した5つのP450遺伝子の何れかが12位の水酸化に関与すると推定されたため機能解析を試みた。当初、組換え酵素の調製を試みたが、糸状菌のP450は膜酵素であり発現不可能であった。そこでFCの基本骨格を生成するGGDP環化酵素遺伝子 (ORF1), P450遺伝子およびP450レダクターゼ遺伝子を出芽酵母のミクロソームで共発現させ、生成する代謝産物の構造を解析する方法、

あるいはP450遺伝子とP450レダクターゼ遺伝子を出芽酵母のミクロソームで発現させて酵素源に用いる *in vitro* アッセイで機能解析を試みた。その結果、P450-2 (ORF5) がフシコッカジエンの8位の水酸化を、次いでP450-1 (ORF3) が16位を水酸化することを明らかにした<sup>17,20)</sup>。生成した中間体はジオキシゲナーゼ (ORF2) によりアルデヒド体へ変換され、次いで還元酵素 (ORF4) により再還元された (一連の反応で2,3位の二重結合が1,2位へ移動する)<sup>18)</sup>。さらに生成中間体はP450-3 (ORF7) により9位が水酸化された (図5)<sup>20)</sup>。したがって残るP450-4 (ORF10) あるいはP450-5 (ORF13) の何れかが12位の水酸化を触媒すると考えられたことから、相同組換えによる遺伝子破壊を行った結果、P450-5 (ORF13) 破壊株はFC Jを蓄積し、P450-4 (ORF10) 破壊株は12位が水酸化されないFC Hを蓄積した。FC Hの生産性は親株のFC Aより高く、他のFC関連化合物の副生も

ほとんど見られなかった (95%以上)。FC Hからはコチレニンと同等以上の活性を有する誘導体が比較的容易に合成できることから当初の目標を達成することができた<sup>20)</sup>。

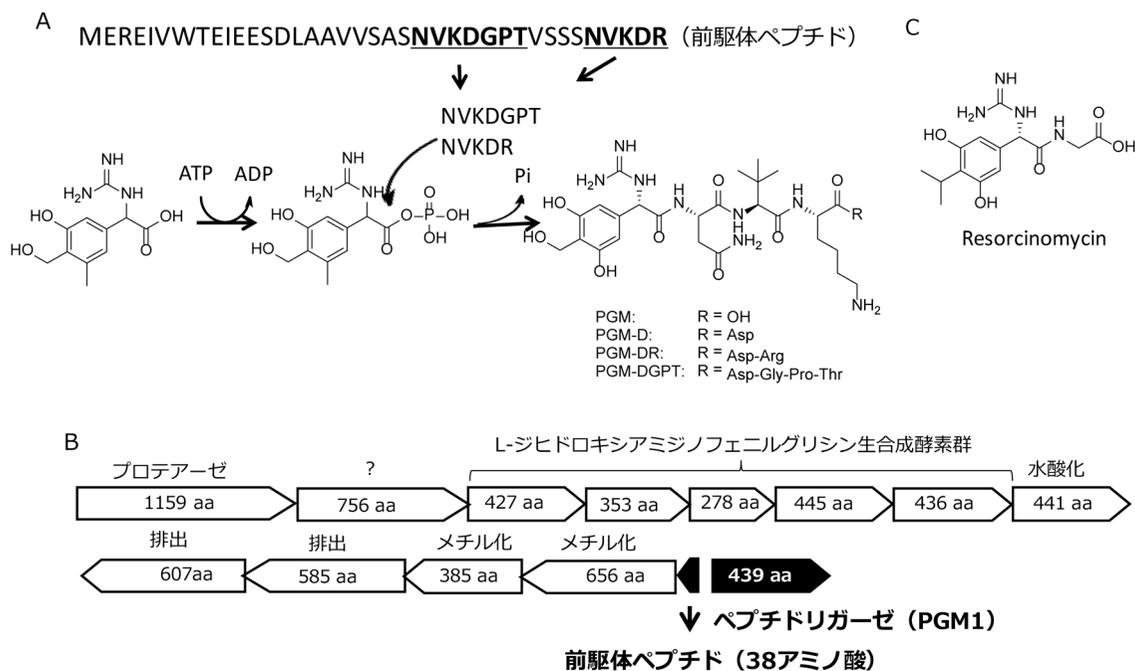
## 2-5. ペプチドを求核剤とする新規アミド結合形成酵素の発見と応用

天然に見出されるペプチド化合物の生合成機構の代表例は、リボソームが関与する機構である。この場合、ペプチドに取り込まれるアミノ酸の種類と順番はコドンに従う。リボソームが関与しないペプチドの生合成として、非リボソームペプチド合成酵素の英語名 Non-ribosomal peptide synthetase の頭文字を取って NRPS と総称される機構による生合成も知られている<sup>21)</sup>。NRPS では非タンパク性のアミノ酸も基質として利用できるのが特徴であり、取り込まれるアミノ酸の種類は、アデノシン三リン酸 (ATP) を用いてアデニル化により基

質を活性化する NRPS の A-ドメインによって規定される。その他の例としてはアミノ酸を ATP でリン酸化により活性化した後、もう1つのアミノ酸のアミノ基との間でアミド結合を形成するアミノ酸リガーゼやアミノアシル-t-RNA を利用する反応も知られている<sup>22)</sup>。

放線菌が生産するペプチド抗結核剤 Pheganomycin (PM) は、非タンパク性のアミノ酸 (*S*)-2-(3,5-Dihydroxy-4-hydroxymethyl) phenyl-2-guanidinoacetic acid (DHGA) に、タンパク性のアミノ酸からなる NVKDR または NVKDGPT ペプチドが結合した2種類が知られている (図6A)<sup>23)</sup>。PM は非タンパク性のアミノ酸を持つことから NRPS により生合成されると推定されたが、NRPS の A-ドメインによる基質アミノ酸の認識は厳密であり、どのように2種類の配列および長さからなるペプチドが生合成されるのか興味を持たれたので詳細に検討した<sup>24)</sup>。

図6. Pheganomycin の構造と生合成機構 (A), Pheganomycin 生合成遺伝子クラスター (B), Resorcinomycin の構造 (C)



PMに含まれるDHGAの基本骨格はバンコマイシンにも含まれ、既に生合成遺伝子も同定されていたことから、その相同配列をPM生産菌のゲノム配列に探索した結果、PM生合成遺伝子クラスターを見出した(図6B)。しかしPMのペプチド基本骨格を生合成するのに必要な最大で8つのA-ドメインからなるNRPS遺伝子を近傍に見いだせなかった。そこでクラスターにペプチダーゼ遺伝子が存在したことから、タンパク性のアミノ酸からなるペプチドがリボソームにより生合成される可能性を考え配列を精査した結果、両方の配列を含む38アミノ酸をコードする遺伝子を見出した(図6B)。本遺伝子を破壊した結果、PMの生産が消失したことから、2種類のペプチドはリボソームにより供給されると結論づけた<sup>24)</sup>。

次にN-末のDHGAとペプチド間のアミド結合を形成する酵素について検討を行った結果、前駆体ペプチドをコードする遺伝子の隣に候補遺伝子を見出した(PGM1)(図6B)。PGM1遺伝子を破壊した結果、PMの生産が完全に消失し、さらにPGM1の組換え酵素を用いて、L-アミジノフェニルグリシンとNVKDRまたはNVKDGPTペプチドをMg<sup>2+</sup>とATPの存在下で反応させた結果、両基質がアミド結合した生成物を得た<sup>24)</sup>。これまで幾つかのアミノ酸リガーゼが報告されているが、PGM1はペプチドを求核剤として用いる初めての例である。

PMの構造類縁体Resorcinomycin(図6C)は、PM同様に抗結核剤として単離された化合物であり<sup>25)</sup>、PMと類似の機構で生合成される<sup>26)</sup>。PGM1が幅広い基質特異性を有していたことから、PM誘導体を酵素合成し構造活性相関試験を行った。その結果、活性発現には、N末端のフェニルグリシン誘導体に少なくとも1つのアミノ酸の結合が必須であること、PMのN末端のフェニルグリシン誘導体の4位水酸基、Resorcinomycinの4位イソプロピル基が各々必須であること、PMのペプ

チド部分をスベルミジンに置換しても活性を保持することがわかった<sup>27)</sup>。

## 謝辞

本研究は筆者が富山県立大学と北海道大学において、多くの学生諸子、ポスドク、教員の助力と科研費や民間財団の研究助成金により得られた成果であり、この場を借りて深謝したい。

## 利益相反自己申告

申告すべきものなし。

[この総説は2004年度住木・梅澤記念賞受賞者 大利徹博士が受賞後の研究をまとめたものです。]

## 引用文献

- 1) 大利 徹: 放線菌が生産するイソプレノイド抗生物質の生合成研究. *Jpn J Antibiot.* 2005; 58: 87–98.
- 2) Charon L, Hoeffler JF, Pale-Grosdemange C, *et al.*: Deuterium-labelled isotopomers of 2-C-methyl-D-erythritol as tools for the elucidation of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. *Biochem J.* 2000; 346: 737–42.
- 3) Kuzuyama T, Seto H: Diversity of the biosynthesis of the isoprene units. *Nat Prod Rep.* 2003; 20: 171–83.
- 4) Bentley R, Meganathan R: Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiol Rev.* 1982; 46: 241–80.
- 5) Seto H, Jinnai Y, Hiratsuka T, *et al.*: Studies on a new biosynthetic pathway for menaquinone. *J Am Chem Soc.* 2008; 130: 5614–5.
- 6) Hiratsuka T, Furihata K, Ishikawa J, *et al.*: An alternative menaquinone biosynthetic pathway operating in microorganisms. *Science.* 2008; 321: 1670–3.
- 7) Cooper LE, Fedoseyenko D, Abdelwahed SH, Kim SH, Dairi T, Begley TP: *In vitro* reconstitution of the radical S-adenosylmethionine enzyme MqnC

- involved in the biosynthesis of fufalosine-derived menaquinone. *Biochemistry*. 2013; 52: 4592–4.
- 8) Arakawa C, Kuratsu M, Furihata K, *et al.*: Diversity of the early step of the fufalosine pathway. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55: 913–6.
  - 9) Mahanta N, Fedoseyenko D, Dairi T, Begley TP: Menaquinone biosynthesis: formation of aminofufalosine requires a unique radical SAM enzyme. *J Am Chem Soc*. 2013; 135: 15318–21.
  - 10) Tanaka R, Kunisada T, Kushida N, *et al.*: Branched fatty acids inhibit the biosynthesis of menaquinone in *Helicobacter pylori*. *J Antibiot*. 2011; 64: 151–3.
  - 11) Ogasawara Y, Kondo K, Ikeda A, Harada R, Dairi T: Identification of tirandamycins as specific inhibitors of the fufalosine pathway. *J Antibiot*. 2017; 70: 798–800.
  - 12) Yamamoto T, Matsui H, Yamaji K, *et al.*: Narrow-spectrum inhibitors targeting an alternative menaquinone biosynthetic pathway of *Helicobacter pylori*. *J Infect Chemother*. 2016; 22: 587–92.
  - 13) van Heijenoort J: Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Nat Prod Rep*. 2001; 18: 503–19.
  - 14) Feng R, Satoh Y, Ogasawara Y, Yoshimura T, Dairi T: A glycopeptidyl-glutamate epimerase for bacterial peptidoglycan biosynthesis. *J Am Chem Soc*. 2017; 139: 4243–45.
  - 15) Toyomasu T, Tsukahara M, Kaneko A, *et al.*: Fusicoccins are biosynthesized by an unusual chimera diterpene synthase in fungi. *Proc Natl Acad Sci*. 2007; 104: 3084–8.
  - 16) Minami A, Tajima N, Higuchi Y, *et al.*: Identification and functional analysis of brassicene C biosynthetic gene cluster in *Alternaria brassicicola*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009; 19: 870–4.
  - 17) Hashimoto M, Higuchi Y, Takahashi S, *et al.*: Functional analyses of cytochrome P450 genes responsible for the early steps of brassicene C biosynthesis. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009; 19: 5640–3.
  - 18) Ono Y, Minami A, Noike M, *et al.*: Dioxygenases, key enzymes to determine the aglycon structures of fusicoccin and brassicene, diterpene compounds produced by fungi. *J Am Chem Soc*. 2011; 133: 2548–55.
  - 19) Noike M, Liu C, Ono Y, *et al.*: An enzyme catalyzing *O*-prenylation of the glucose moiety of fusicoccin A, a diterpene glucoside produced by the fungus *Phomopsis amygdali*. *Chembiochem*. 2012; 13: 566–73.
  - 20) Noike M, Ono Y, Araki Y, *et al.*: Molecular breeding of a fungus producing a precursor diterpene suitable for semi-synthesis by dissection of the biosynthetic machinery. *PLoS One*. 2012; e42090.
  - 21) Koglin A, Walsh CT: Structural insights into nonribosomal peptide enzymatic assembly lines. *Nat Prod Rep*. 2009; 26: 987–1000.
  - 22) Giessen TW, Marahiel MA: Ribosome-independent biosynthesis of biologically active peptides: application of synthetic biology to generate structural diversity. *FEBS Lett*. 2012; 586: 2065–75.
  - 23) Suzukake-Tsuchiya K, Hori M, Shimada N, Hamada M: Mode of action of deoxypheganomycin D on *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607. *J Antibiot*. 1988; 41: 675–83.
  - 24) Noike M, Matsui T, Ooya K, *et al.*: A peptide ligase and the ribosome cooperate to synthesize the peptide pheganomycin. *Nat Chem Biol*. 2015; 11: 71–6.
  - 25) Kondo E, Katayama T, Kawamura Y, *et al.*: Isolation and characterization of new antibiotics resorcinomycins A and B. *J Antibiot*. 1989; 42: 1–6.
  - 26) Ooya K, Ogasawara Y, Noike M, Dairi T: Identification and analysis of the resorcinomycin biosynthetic gene cluster. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2015; 79: 1833–7.
  - 27) Ogasawara Y, Ooya K, Fujimori M, Noike M, Dairi T: Structure and activity relationships of the anti-*Mycobacterium* antibiotics resorcinomycin and pheganomycin. *J Antibiot*. 2016; 69: 119–20.

---

## Bioengineering of microorganisms aiming for drug development

Tohru Dairi

Graduate School of Engineering, Hokkaido University,  
N13 & W8, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060–8628, Japan

Microorganisms have been used as producers of primary and secondary metabolites as exemplified by amino acids and antibiotics. For these purposes, microorganisms possessing desirable abilities have been traditionally screened. However, we are recently able to employ another approach utilizing (meta) genome databases. By comparative genomics, we revealed alternative pathways for menaquinone and peptidoglycan biosynthesis and developed new screening strategies for antibiotics specifically acting on pathogens possessing these new pathways. We have also been mining biosynthetic genes of secondary metabolites and characterized them in detail. In this review, I briefly summarize these results.