

アミノグリコシド抗生物質生合成酵素の機能解析と応用

東京工業大学理工学研究科化学専攻 工藤 史貴

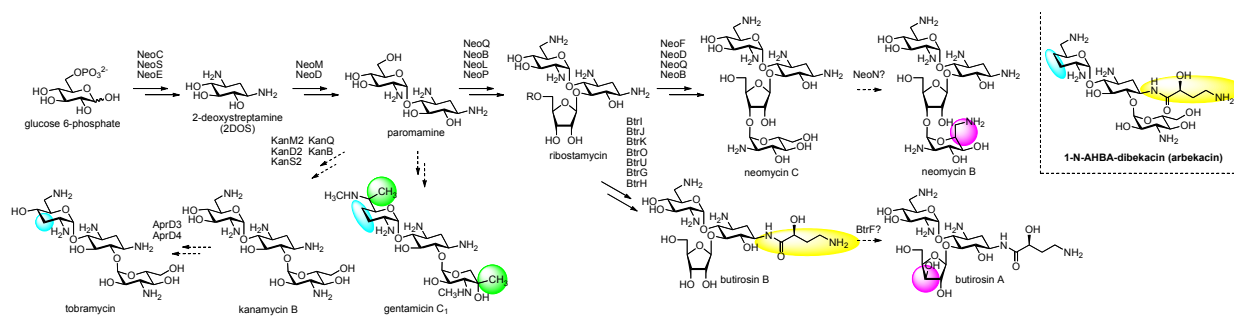


研究指針

カナマイシンやストレプトマイシンに代表されるアミノグリコシド抗生物質は、結核菌に有効な臨床医学上重要な抗生物質である。MRSA 感染症の敗血症に有効なアルベカシンは、カナマイシンをデオキシ化、さらにアシル化することにより合成された半合成アミノグリコシド抗生物質である。微生物培養液より単離されたアミノグリコシド抗生物質ブチロシンの生合成に特徴的な 4-アミノ-2-ヒドロキシ酪酸 (AHBA) の付加と、ゲンタミシンやトブラマイシン生合成に見られるデオキシ化を模倣したデザインとなっている。従って、アミノグリコシド骨格を模倣する酵素反応システムを有する微生物が存在するわけで、それら微生物由来の酵素・遺伝子を利用することで、酵素的もしくは発酵的に、耐性菌に有効な新規アミノグリコシドを創製できる可能性がある。本研究では、アミノグリコシド抗生物質の修飾酵素を機能解明し、酵素を利用した新規アミノグリコシド抗生物質の創製を目指している。

アミノグリコシド抗生物質の基本骨格構築に関わる酵素

本群抗生物質の大部分は、特徴的なアミノサイクリトールである 2-デオキシストレプトアミン (2DOS) を中心アグリコンとして有する。本研究者は、2DOS 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* 由来ブ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。その後、諸外国の研究グループも類似 2DOS 含有型アミノグリコシド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。本研究者は、共通に見いだ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、組換えタンパク質を用いた酵素反応解析を進めてきた。現在までに、本研究者と英国のグループによる研究から、グルコース-6-リン酸からネオマイシン C 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 (Scheme 1)。



Scheme 1. ネオマイシン生合成経路とアミノグリコシド抗生物質の構造多様化

本群抗生物質の構造多様性は、この基本生合成経路から分岐する反応を触媒する酵素により生じるはずで、それぞれのアミノグリコシド抗生物質生合成系に特異的に存在する酵素によって触媒されると考えられた。すなわち、耐性菌に有効なデオキシ化、C-メチル化、異性化、アシル化による修飾反応は、それら特異酵素により触媒されるはずである。また相同性解析からは、生合成経路から想定される酵素触媒能を推定することは困難であり、新たな形式の酵素反応を発見できると期待された。

ネオマイシン生合成の最終段階

ネオマイシン B 生合成に関しては、5' ' 位の異性化反応を触媒する酵素だけが未解明であり、生合成遺伝子クラスター中にコードされる唯一未解明のラジカル SAM 酵素 NeoN により触媒されると推定された。

ラジカル SAM 酵素は、還元型の鉄-硫黄クラスターをその活性中心に有し、S-アデノシル-L-メチオニン (SAM) を還元的に開裂させることにより、5'-デオキシアデノシルラジカルを発生させ様々なラジカル反応を触媒する。これまでに知られていないラジカル活性種を引き金とする多種多様な反応を触媒する酵素の存在も指摘されており、酵素反応化学的に興味深いタンパク質である。

本研究ではまず、NeoN の基質として考えられるネオマイシン C をリボスタマイシンから四つの酵素を利用して調製した。それぞれの段階の反応生成物も NeoN の基質になりうるが入手困難であり、本酵素的手法はネオマイシン類の合成方法としても有用と考えられる。

ラジカル SAM 酵素に存在する鉄-硫黄クラスターは酸化されやすいため、NeoN の調製は基本的に全てグローブボックス内で行った。NeoN 発現大腸菌から無細胞抽出液を調製し、硫酸鉄(II)アンモニウム六水塩と硫化ナトリウムで鉄-硫黄クラスターを再構成後、ジチオナイトで還元して活性型と考えられる酵素を調製した。先述の酵素的に調製したネオマイシン C と SAM を基質として反応を行い、生成物をジニトロフェニル化して HPLC にて分析した結果、期待した通りの異性化反応を検出することができた。本反応は SAM の非存在下や鉄-硫黄クラスターを再構成しない場合には検出されなかったことから、NeoN はラジカル SAM 酵素として異性化反応を触媒することが明らかとなった。SAM から生じた 5'-デオキシアデノシルラジカルが直接 5'' 位の水素原子を引き抜きラジカル中間体が生じ、それが逆側から水素原子を引き抜くことで異性化が起こると考えている。現在、本酵素反応機構を詳細に解明する為に NeoN の精製を検討している。

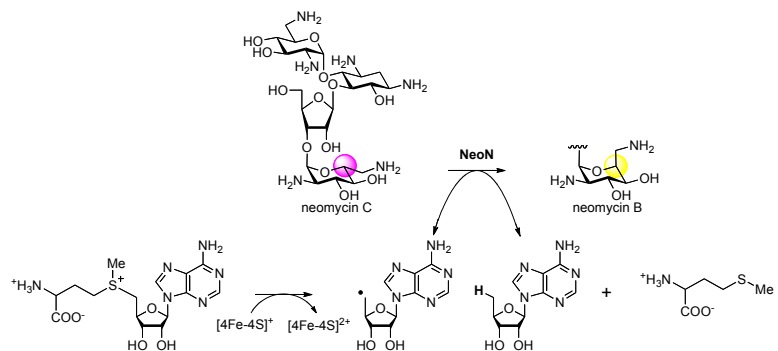


Figure 1. ラジカル SAM 酵素 NeoN による異性化反応

トブラマイシン/カナマイシン合成

本研究ではまた、パロマミンの配糖化から分岐し、3'' 位と 6'' 位のアミノ化と 3'' 位のデオキシ化を経て生合成されるトブラマイシンの生合成酵素機能解明も目指した。トブラマイシン/カナマイシン類の生合成遺伝子クラスターに特徴的に存在する糖転移酵素 (KanM2) を大腸菌にて発現させ、パロマミンと UDP-グルコースを基質として酵素反応を行った。反応生成物のジニトロフェニル誘導体の LC-ESI-MS 分析の結果、本酵素によりパロマミンが配糖化されることが分かった。さらに数 mg スケールで反応を行い、3''-デオミノ-3''-ヒドロキシカナマイシン C を酵素的に合成することに成功した。反応効率改善の余地はあるものの、本酵素による部位特異的な糖転移反応は入手困難な生合成中間体を得るために重要である。現在、トブラマイシン/アプラマイシン生合成遺伝子クラスターに特異的にコードされている NAD⁺依存型脱水素酵素 AprD3 とラジカル SAM 酵素 AprD4 がカナマイシン B の 3'' 位デオキシ化を触媒すると考え酵素反応を検討している。

今後の展開

生合成遺伝子クラスターの比較から、ゲンタミシン生合成における C-メチル化とデオキシ化も機能未知のラジカル SAM 酵素により触媒されると推定している。従って、潜在的に様々な酵素触媒能を有する“ラジカル SAM 酵素”を鍵酵素としてアミノグリコシド抗生物質が修飾されることが分かってきた。今後は、ネオマイシン異性化を触媒するラジカル SAM 酵素 NeoN の機能解明を機に、他の未解明酵素の機能解明も達成できると考えている。また、配糖化酵素とアミノ化酵素によるアミノグリコシド抗生物質の基本骨格合成酵素と組み合わせることで、多種多様な新規アミノグリコシドを酵素的に合成することを念頭におき研究を進めている。