

研究課題	新たに見出した P450 酵素反応を利用した 抗生物質生産系の構築
キーワード	①新規抗生物質生産、②シトクロム P450 酵素、③放線菌

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	イイザカ ヨウヘイ 飯坂 洋平	所属等	東邦大学 薬学部 助教
プロフィール	東邦大学大学院薬学研究科博士課程前期を修了後、企業研究員として体外診断薬の研究開発に従事。学生時代に取り組んだ放線菌に関する研究が忘れられず、同大学院社会人博士課程を経て学位を取得。現職にて放線菌の奥深さをかみしめながら放線菌による抗生物質の生合成に関する研究に邁進している。		

1. 研究の概要

シトクロムP450酵素 (P450) MycGは放線菌*Micromonospora griseorubida* A11725が生産する16員環マクロライド系抗生物質mycinamicinの水酸基とエポキシ環の形成に関与する。MycGは放線菌*Rhodococcus* sp. NCIMB 9784の電子伝達タンパク質RhFREDとの相互作用様式を変化させることにより、生産菌 (*in vivo*) では確認されない新たな触媒作用を示すことが確認されている (図1)。すなわち、MycGとRhFREDを1本のポリペプチド鎖とした電子伝達タンパク質融合型ではmycinamicin生合成過程の水酸化とエポキシ化を触媒するが、MycGとRhFREDをそれぞれ単独のタンパク質として非融合型で相互作用させると、既存の反応に加え、新たに*N*-脱メチル化反応を触媒することが*in vitro*反応系で明らかとなっている。そこで、RhFREDにより誘起されるMycGの新たな触媒活性である*N*-脱メチル化反応を利用した新規抗生物質の生産系の構築を検討した。これまでに*M. griseorubida*のmycG欠損株にMycGとRhFREDを単独タンパク質として発現させたところ、MycGの機能は回復するが、*N*-脱メチル化mycinamicinの生産は見られなかった。この原因として、*M. griseorubida*はMycGと相互作用するネイティブな電子伝達タンパク質を有するために、MycGとRhFREDが効率的に相互作用していないことが考えられた。そのため、ドラフトゲノム解析により電子伝達タンパク質であるフェレドキシン (Fdx) をコードすると推定される4つの遺伝子の欠損株を取得し、mycinamicin類の生産を比較することでMycGと相互作用するフェレドキシンの同定について検討した。

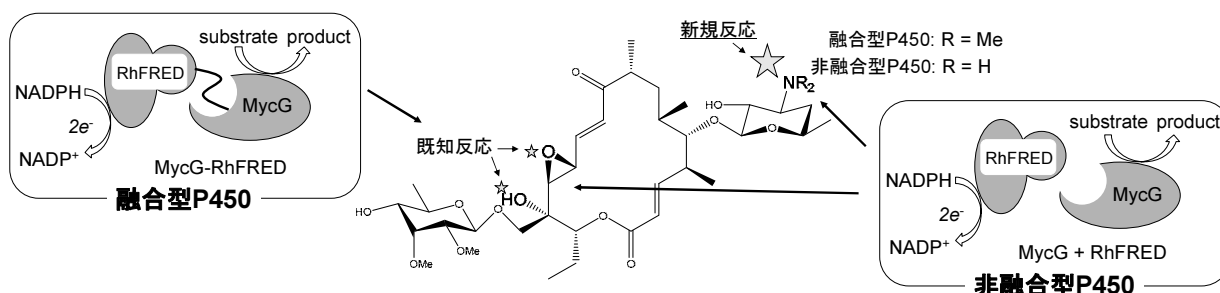


図1 MycGとRhFREDの相互作用と触媒活性の種類

2. 研究の動機、目的

既存の抗生物質に対する耐性菌の蔓延に伴い、新たな化学療法剤の開発が急務となっている。多種多様な2次代謝産物を生産する放線菌は生物活性物質の供給源として医薬品産業に大きく貢献してきた。しかしながら、その多様性にも限界が見られ、放線菌からの生物活性物質の報告数は著しく減少している。

抗生物質などの天然化合物の生合成に関与するP450は20種類以上の反応を触媒し、その多彩な触媒活性は化合物の構造や生物活性の多様化に大きく貢献している。化合物の構造修飾は有機化学的手法が有効ではあるが、抗生物質は複雑な構造であることが多く、目的とする構造修飾を行うには苛酷な条件下で多段階の合成過程を必要とする場合が多い。そのため、位置、立体特異的なP450による修飾反応を利用して、新たな抗生物質を創出する研究が精力的に行われている。

P450に関する研究が大きく進展する中、MycGとRhFREDの非融合型相互作用による*N*-脱メチル反応のように、電子伝達タンパク質の相互作用の変化により生じるP450の新たな触媒活性を利用することは将来枯渇すると予測される新規抗生物質の創出に大きく貢献することが期待される。

しかしながら、これまでに放線菌による異種電子伝達タンパク質により誘起されるP450の新たな触媒活性を利用した新規抗生物質の生産は報告されていない。新規抗生物質を実用に供するには、効率的且つ安定した生産に向け、生産菌を取得することが極めて重要となる。そこで、*in vitro*反応系で確認されたMycGとRhFREDの非融合型相互作用による*N*-脱メチル化反応をmycinamicin生産菌 (*in vivo*) で再構成し、抗生物質の生合成に適用した新規抗生物質の生産系構築を実証することを目的として本研究に取り組んだ。

3. 研究の結果

(1) *M. griseorubida* Fdx遺伝子 (*fdx*) 欠損株の取得

細菌型P450の反応には電子伝達タンパク質としてFdxとFdx還元酵素 (Fdr) の介在が必要となる。MycGとRhFREDにより生じる*N*-脱メチル化反応を *M. griseorubida* のmycinamicin生合成に適用するためには、MycGと相互作用するネイティブなFdxからの電子供与を絶つ必要があると考えられた。MycGに電子供与するFdxが特定されていないことから、*M. griseorubida* のドラフトゲノム解析の結果より、Fdxをコードすると推定される4つの遺伝子 (536.6、735.18、

1157.66、1510.76) を見出し、それらの遺伝子欠損株の取得を検討した。まず、*fdx*欠損用プラスミドの構築はPCR-targeting systemを用いた。neomycin耐性遺伝子 (*neo*) と接合伝達開始点 *oriT* のカセットDNA断片の上流と下流に各 *fdx* の5'末端より上流の領域と3'末端より下流の領域が付加するようにPCRで増幅し、*fdx*欠損用カセットDNA断片とした。この断片を、*fdx*領域を含む *M. griseorubida* A11725染色体上の約2.5 kbのDNA断片を挿入したプラスミドを保持する大腸菌に導入し、相同組換えにより *fdx*領域が *neo-oriT*カセットに置換された *fdx*欠損用プラスミドを作製した。各 *fdx*欠損用プラスミドを大腸菌から *M. griseorubida* A11725に接合伝達させ、相同組換えにより染色体上の *fdx*領域が *neo-oriT*カセットに置換された *fdx*欠損株を取得した。この方法により、536.6、735.18、1510.76の各欠損株は取得出来たが、1157.66欠損株は取得することが出来なかった。

(2) 各FdxのMycGへの電子供与の確認

各FdxのMycGへの電子供与の有無を検証するため、735.18、1510.76欠損株については各欠損株のmycinamicin類の生産をHPLCにより分析した。MycGに電子供与するFdxが欠失している場合、MycGは酸化反応を触媒できないことから、mycinamicin生合成でMycGの基質となるmycinamicin IVが蓄積されると考えられた。735.18、1510.76欠損株のmycinamicin類の生産を確認した結果、MycGによりmycinamicin IVから生成されるmycinamicin IIの生産が確認された。これらの株ではMycGが機能していることから、735.18及び1510.76はMycGへ電子を供与するFdxではないと考えられた。536.6についてはmycinamicin生合成でMycGよりも上流工程で作用するP450 MycCIに電子供与するFdxであることが明らかとなっている。そのため、536.6欠損株ではMycCIより下流工程の生合成が生じないため、mycinamicin類の生産によるMycGの機能

を検証することが出来ない。実際、536.6欠損株ではMycCI以降の生合成により生成される mycinamicin類の生産は見られなかった。そこで、536.6欠損株にmycinamicin IVを添加し、MycGによる変換反応が生じるかを確認したところ、mycinamicin IIの生成が認められ、536.6もMycGに電子を供与するFdxではないと考えられた。

これらの結果より、MycGに電子を供与するFdxは1157.66である可能性が考えられたが、1157.66欠損株はまだ取得に至っていない。取得できない要因としてfdx欠損用プラスミドの相同領域が不十分であることが想定されるため、プラスミドの再構築を検討している。また、1157.66が生育に不可欠な必須遺伝子である可能性もあるため、*in vitro*反応でのMycGへの電子供与の検証についても計画している。

4. 研究者としてのこれからの展望

MycGと相互作用するネイティブなFdxを絞り込むことが出来た。今後、MycGに電子供与するFdxを特定することで、そのFdxをコードする遺伝子欠損株にRhFREDを導入し、MycGの新たな触媒作用であるN-脱メチル化反応を利用した新規抗生物質の生産系が構築できると考えている。電子伝達タンパク質との相互作用を改変することでP450が従来とは異なる新たな触媒作用を示すことはMycGでしか報告されていない。そのため、他のP450についても検証することでP450の潜在的な触媒能を見出すことができる可能性が高い。本研究での取り組みは限りある天然物資源に新たな機能を付与して有用物質を生産することを目指した基礎研究であり、効率的な新規抗生物質の創出へと繋げていきたいと考えている。

放線菌代謝物からの新規抗生物質の発見は減少しているが、分子生物学の進展によりゲノム情報が容易に手に入るようになった。放線菌にはまだ我々がその姿を見たことがない物質を多く生産し得る遺伝子を有していることが明らかとなっている。つまり、これまで放線菌を我々が利用しやすいように培養してきた条件ではこれらの遺伝子を発現させることができず、放線菌が生産し得る物質の一部しか発見できていない。また、多様な物質を生合成することを可能にする個々の酵素についてもその機能を一部解明してきただけで、MycGのように潜在的な能力を引き出す、或いは人為的に改変することで新たな物質生産へと応用できることが明らかとなってきている。これらの多種多様な物質を生産し得る放線菌の潜在能力を引き出す研究に邁進し、創薬の発展に少しでも貢献していければと考えている。

5. 社会に対するメッセージ

多剤耐性菌の蔓延が深刻な懸念となっているにもかかわらず、製薬企業の抗菌薬開発の撤退が相次いでいます。この原因として、抗菌薬の低い収益性やシーズ探索が困難であることが挙げられています。製薬企業にとって困難となる要因はまさにアカデミアが担うべき領域であると考えています。基礎研究で得られた成果は直ぐに新規抗菌薬の開発といった応用研究に繋がるものばかりではありませんが、学術的知見が積み重なって体系を成したときに新規抗菌薬の開発の大きな推進力になるものと思います。この点に理解を示していただき、ご支援いただきました日本私立学校振興・共済事業団の関係各位並びに奨励金をご寄付いただいた皆様に心より御礼申し上げます。

本奨励金により遂行した研究はまだ課題が多く残っておりますが、得られた知見を基に課題を解決することで新規抗生物質のデザインや生産法の開発に新しい展開を生み出すことができると考えています。このようなアカデミアからの基礎研究が社会的脅威となり得る多剤耐性菌を克服する一助になると考えておりますので、引き続きのご支援の程、宜しくお願い致します。