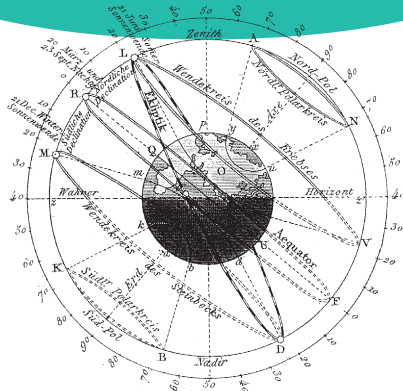


## 【解説】



【2019年農芸化学女性研究者賞】

# 抗生物質ストレプトスリシンおよびその類縁化合物の 組合せ生合成で新規化合物を創る 未利用抗生物質の生合成酵素は未利用にあらず！

丸山千登勢

抗生物質の登場は、不治の病と呼ばれた病気の数減らし、人類の平均寿命を飛躍的に延ばしてきた。最近では、さまざまな疾病に有効な薬剤や、健康維持のための多様な薬剤も望まれている。しかしながら、これまでに微生物から発見された生理活性物質は数万種類に及ぶにもかかわらず、それらのなかで実際に医薬品や農薬として実用に至っているものはほんの僅かであり、それ以外の多くは、有用な生理活性をもっていないが、さまざまな理由から未利用のままになっている。そのような未利用資源を現在の科学技術で有用な資源へと導くことができれば、創薬スピードを加速させることが可能であると考え、未利用資源の一つである抗生物質 streptothricin (ST) とその類縁化合物 (図1) をモデル化合物として、その実用化を目標とした研究を行ってきた。

## さまざまな放線菌が創り出すST類縁化合物の化学構造

放線菌が生産する抗生物質ST (図1) は、1943年にワックスマン博士によって *Streptomyces lavendulae* の培養液から初めて単離され<sup>(1)</sup>、以来、数多くの放線菌か

ら見つかった抗生物質である。STは、真核生物、原核生物の両者に対して強力な抗菌活性を示すにもかかわらず、ヒトなどの真核生物への毒性が強く医薬品や農薬として利用されていない。微生物由来の天然生理活性物質を探索する多くの研究者にとっては「有名な」化合物であり、STがもつ強力な抗菌活性を有効活用するために、有機化学的手法による毒性緩和への努力が試みられ、多くの類縁化合物が創製されてきたが、実際に医薬品として利用された報告はない。このような背景の元、2006年に濱野らは、STの streptolidine lactam を加水分解する新規微生物酵素 SttH を見だし、本酵素が触媒する修飾により、STの真核生物への強毒性を緩和することに成功した<sup>(2,3)</sup> (図2)。このことからSTの構造改変は、臨床応用などの実用化への可能性を有していることが示唆された。STおよびST類縁化合物は共通して、アミノ糖とアミノ酸誘導体からなる streptothrisamine 骨格 (図1) を有しているが、この化合物は各種微生物に対する抗菌活性も細胞毒性も示さない。しかしアミノ酸側鎖として、1~7残基の  $\beta$ -lysine ( $\beta$ -Lys) または  $\beta$ -Lys oligopeptide [oligo( $\beta$ -Lys)]<sup>(4)</sup>、あるいは glycine 誘導体が結合した、ST, BD-12, および glycythr-

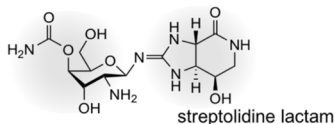
Novel Compounds Generated by Combinatorial Biosynthesis Using the Streptothricin Biosynthetic Enzymes: Biosynthetic Enzymes Found from Underused Antibiotics Are Useful !  
Chitose MARUYAMA, 福井県立大学大学院生物資源学研究所

## ◇◇◇ コラム ◇◇◇

「放線菌という微生物をご存じですか？」公開講座などの冒頭で問いかけると、多くの方が「？」な表情をされますが、「土の匂いって感じますよね？ あの匂いの正体は、土壤中に生息する放線菌が生産するジオスミンという化合物なんですよ」と話すと、多くの方が放線菌を身近に感じてくださいます。1928年にイギリスの細菌学者フレミング博士が、青カビが生産する抗生物質ペニシリンを発見されたことに始まり、以後、日本を含む世界中で天然生理活性物質の探索が行われ、これまでに数万種類にも及ぶ天然物が微生物から単離されています。糸状菌に並んで放線菌は、多種多様な化学構造や生理活性を有する化合物を生産することが知られており、北里大学・大村 智先生が発見された抗寄生虫抗生物質エバメクチンも放線菌が生産する化合物の一つです。このような天然物探索研究は、私たちにさまざまな疾病に対抗できる武器をもたらしてくれました。しかしながら、私たちが戦うべき疾病はまだ多く、より多くの強力な武器が必要であり、新たな生理活性物質の需要は尽きることがありません。もちろん新たな武器を天然より探索するのも良いのですが、新規

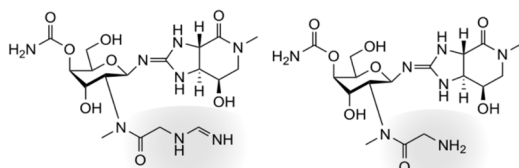
化合物の発見は1960年代をピークに年々減少を続けているのが現状です。そこで私たちは、すでに単離されている天然物を活用して、新たな化合物を創造するという研究を行っています。実は、これまでに単離されている数万種類の微生物由来天然物のうち、そのまま実用的な薬になるものはほんの僅かであり、それ以外の化合物は、有効な生理活性をもちながらも毒性を併せ持つなどの理由から、未利用資源としてどこかの研究室の棚で眠ったままになっています。せっかく発見された化合物を使わずに置くのはもったいない！そこで、このような未利用化合物について、その生産菌である微生物がどのような酵素群を活用してその化合物を創り出しているのかを調べ、さらに化学構造内のどの構造部位が有用で、また不都合なのかを調べます。そして良い部分を活かして不都合な部分を改変しながら、より良い化合物になるようにデザインして創り出す、それを目指して研究を進めています。バラエティに富んだ天然物の構造の数だけ、微生物はそれを創り出すための多種多様な酵素をもち、特色ある生産工場を操業しています。私たちはまだそのほんの一部しか解明できていません。微生物は未知の巧みな技を秘めた、宝箱なのです。

carbamoyl-D-gulosamine



アミノ酸側鎖を持たない  
アミノ糖とアミノ酸誘導体  
からなり、ST類縁化合物の  
すべてに共通する基本骨格

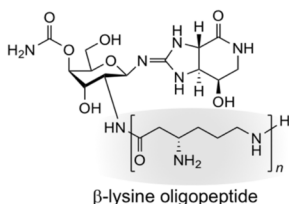
streptothrisamine



アミノ酸側鎖としてglycineまたは  
glycine誘導体を有するタイプの  
ST類縁化合物  
強力な抗菌活性を示す

BD-12

glycythricin



$n = 1$ , SF-F  
 $n = 2$ , SF-E  
 $n = 3$ , SF-D  
 $n = 4$ , SF-C  
 $n = 5$ , SF-B  
 $n = 6$ , SF-A  
 $n = 7$ , SF-X

アミノ酸側鎖として $\beta$ -lysineを  
有するタイプのST類縁化合物  
 $\beta$ -lysine側鎖が長くなるほど  
強力な抗菌活性を示す  
 $\beta$ -lysine側鎖の長さによって  
7種類の類縁体が存在

図1 ■ STおよびST類縁化合物の化学構造

cinなどの多くの類縁化合物は強力な抗菌活性と細胞毒性を示す(図1)。また、STにおいては、oligo( $\beta$ -Lys)側鎖の長さが長くなればなるほど抗菌活性が強くなるこ

とから、ST類化合物の生理活性には、アミノ酸側鎖構造が重要な役割を果たしていると言える。さらに、前述したように、これまでに数多くのST類化合物が微生物

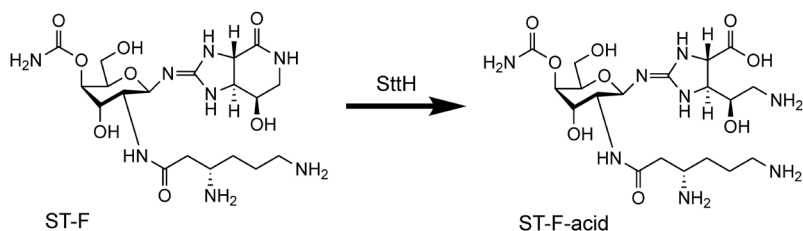


図2 ■ 新規ST加水分解酵素SttHによるSTの構造改変

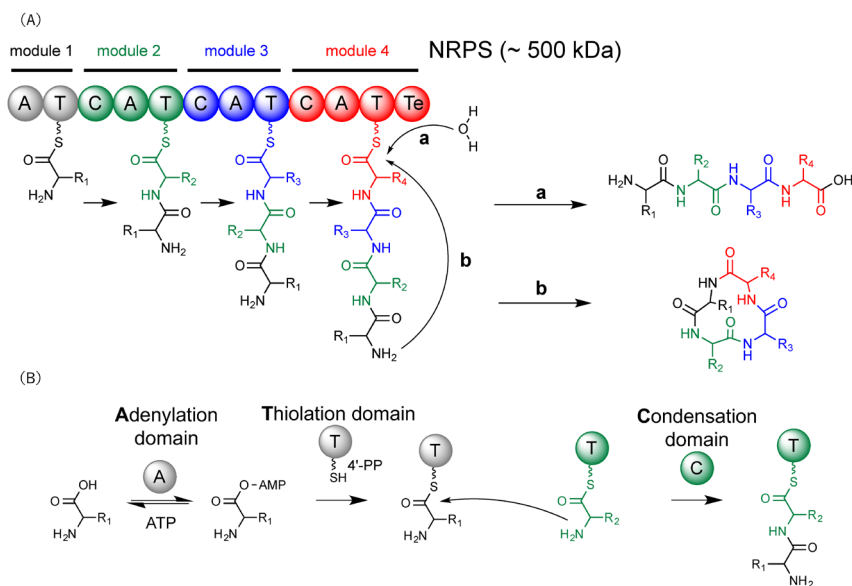


図3 ■ 一般的なNRPSによるペプチド合成反応

から発見されているが、実はアミノ酸側鎖構造としては、 $\beta$ -Lys タイプと glycine タイプの2種類しか発見されていない。したがって、このアミノ酸側鎖部分に $\beta$ -Lys や glycine 以外のアミノ酸を結合させることができれば、これまでにない新しいタイプのST類縁化合物を創製することができ、真核生物への毒性がなくなった化合物が創出できるのではないかと考えられた。そこで筆者らは、この生理活性に重要なアミノ酸側鎖構造の生合成機構に着目し、その仕組みを解明するとともに、応用利用によって新規ST類縁化合物の創製を行った。

### STが有するoligo( $\beta$ -Lys) 側鎖の生合成研究

放線菌 *Streptomyces rochei* NBRC12908 は、1~4残基の $\beta$ -Lysをアミノ酸側鎖に有するST(図1)を生産する。一般的に放線菌における抗生物質の生合成遺伝子は、自己耐性遺伝子とクラスターを形成していることが知られていることから、ST自己耐性遺伝子(*sttR*)を指標に、ST生産放線菌*S. rochei*ゲノムライブラリーより、*sttR*遺伝子を含む約34kbpのゲノム断片を有するコスミドを取得した。本コスミドの全塩基配列を決定したところ、*sttR*遺伝子近傍領域に非リボゾームペプチド合

成酵素(NRPS)遺伝子を含む遺伝子群が見いだされ、STの生合成の一部は、NRPSが関与していると推測された。さらに、本コスミドを、STおよびST類縁化合物を全く生産しない異種放線菌 *Streptomyces lividans* に導入した結果、その導入株は*S. rochei*と同様に、 $\beta$ -Lys 3残基以上からなるoligo( $\beta$ -Lys)を有するSTを生産した。したがって、本コスミドにはST生合成にかかわるすべての遺伝子群が含まれており、すなわちoligo( $\beta$ -Lys)合成酵素遺伝子も含まれていることを明らかにした。そこで次に、得られた遺伝子群のなかから、oligo( $\beta$ -Lys)合成酵素遺伝子の探索を行った。oligo( $\beta$ -Lys)は非タンパク性アミノ酸である $\beta$ -Lysが構成成分であること、また結合様式が通常のタンパク合成機構では考えられないイソペプチド結合であることから、遺伝子群に見いだされたNRPSはoligo( $\beta$ -Lys)生合成に関与している可能性が強く示唆された。一般的なNRPSは、図3Aに示すように、ペプチド合成に必要なadenylation (A) domain, thiolation (T) domain, condensation (C) domainからなるモジュール構造を有し、さらに生成されるペプチド鎖長に一致する数のモジュール構造が連なった巨大タンパク質である。NRPSのA domainはそれぞれ基質特異性をもっており、A domainの

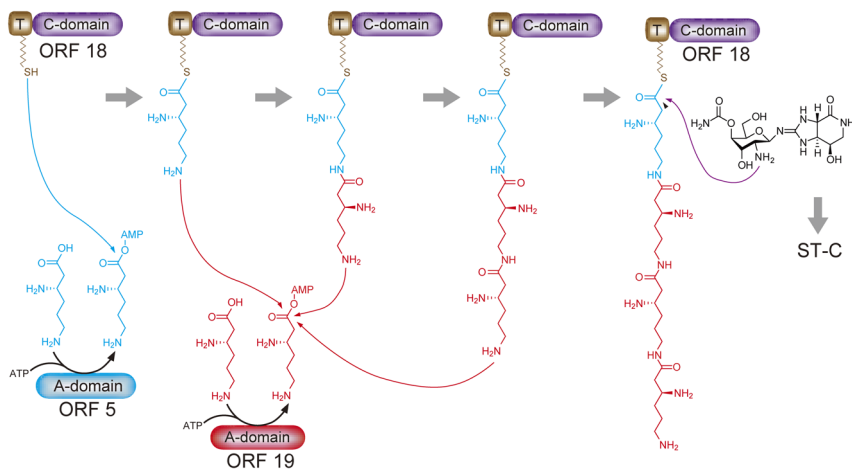


図4 ■ STのoligo( $\beta$ -Lys) 側鎖構造の生合成機構

触媒でアデニル化による活性化を受けた基質アミノ酸は、同じモジュール内のT domainに、補酵素4'-ホスホパンテテイン基を介したチオエステル結合でローディングされる。T domainにローディングされた隣り合わせたアミノ酸は、C domainの触媒によってペプチド結合が形成され、最終的に、TE domainと呼ばれる thioesterase domainによってNRPSからリリースされる(図3B)。したがって、図3Aのような4つのモジュールから構成されるNRPSでは、テトラペプチドが生成され、生産されるペプチド鎖長は、NRPSのモジュール構造によって厳密に制御される。しかしながら、STが有するoligo( $\beta$ -Lys)構造は、1~7残基と多様性があり、一般的なNRPSによる生合成機構にも当てはまらず、oligo( $\beta$ -Lys)構造は新奇のNRPS反応機構によって生合成されたと考えられた。そこで、本コスミドに含まれる各遺伝子の破壊実験による遺伝子工学的手法、各種生合成酵素を利用した生化学的手法により、oligo( $\beta$ -Lys)を次のように明らかにした<sup>6)</sup>(図4)。ST生合成遺伝子群に含まれるNRPSであるOrf5, Orf18, Orf19のアミノ酸配列から、それぞれがもつdomain構造を調べたところ、Orf5とOrf19はA domainのみからなる単独型のA domainであり、またOrf18はT, C domainから構成されており、一般的なNRPSのようなモジュール構造をもたないことが判明した。次に、これら3つの酵素の組換え酵素を用いた*in vitro*反応の結果、A domainであるOrf5とOrf19は、両者とも $\beta$ -Lysをアデニル化によって活性化するが、Orf5によって活性化された $\beta$ -LysだけがOrf18のT domainにローディングされることが明らかになった。さらに興味深いことに、Orf19によって活性化された $\beta$ -Lysは、Orf18のT domainに結合した状態で進行するoligo( $\beta$ -Lys)合成の伸長基質として直接使われ、そのペプチド合成反応は、Orf19が直接触媒すると

いう極めて興味深いメカニズムであった。これまでにさまざまなNRPSのA domainが報告されているが、Orf19のように、基質の活性化だけでなく、それを直接基質として利用し、さらにペプチド結合を繰り返し合成できるA domainは初めての報告例であった。T domain上で伸長したoligo( $\beta$ -Lys)は、Orf18のC domainの触媒によりST生合成中間体streptothrisamineと縮合し、STとしてOrf18からリリースされる(図4)。すなわち、ST上のoligo( $\beta$ -Lys)の鎖長は、どのタイミングでC domainがstreptothrisamineとoligo( $\beta$ -Lys)の縮合を触媒するかで決まる。他方、T domain上でのoligo( $\beta$ -Lys)の鎖長は、Orf19の触媒回数によって決まる。言い換えれば、Orf19の反応が早いか、あるいは、Orf18のC-domainの反応が早いかでSTのoligo( $\beta$ -Lys)の鎖長が決まることが判明し、実際、C domainに部位特異的変異を導入し、活性を弱めた変異型酵素を用いて反応を行うと、C domainによるstreptothrisamineとoligo( $\beta$ -Lys)の縮合のタイミングが遅れ、より長いoligo( $\beta$ -Lys)鎖長を有するSTが生産された<sup>6)</sup>。

#### ST生合成酵素群を利用した新規ST類縁化合物の創製

Orf5とOrf19が $\beta$ -Lys以外に活性化するアミノ酸が存在するか、これらA domainの基質特異性を評価したところ、 $\beta$ -Lysの構造アナログである $\beta$ -homolysine( $\beta$ -hLys)も基質になることを明らかにした。そこで、基質として $\beta$ -hLys, streptothrisamineを用い、3つの酵素Orf5, Orf18, Orf19にて酵素反応を行ったところ、streptothrisamineに $\beta$ -hLysが1~3残基結合した新規ST類縁化合物ST-hF, ST-hE, ST-hDが合成された<sup>6)</sup>。また、興味深いことに、 $\beta$ -Lysのみを基質とした酵素反応では、oligo( $\beta$ -Lys)のみの構造を有するペプチド化



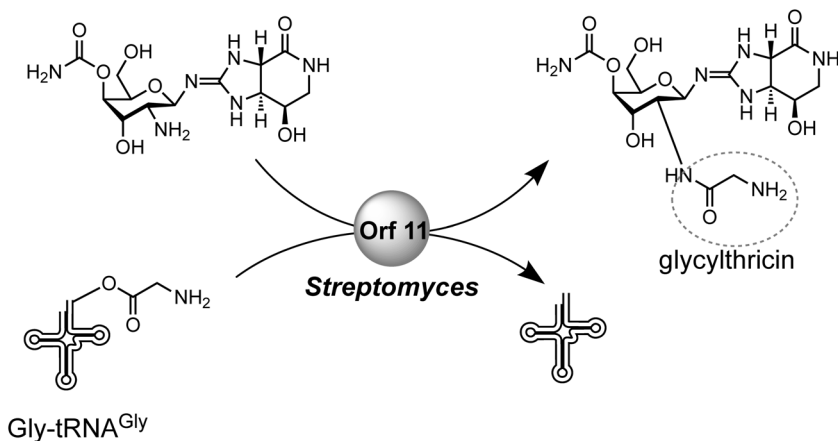


図5 ■ Glycyllthricinのglycine側鎖の生合成機構

化合物が生成された。生成されたoligo( $\beta$ -Lys)はSTの生合成に利用されることはなく、*in vitro*反応でのみ創製される新規ST類縁化合物であった。STのoligo( $\beta$ -Lys)構造はSTの生理活性に重要な役割を有していることから、oligo( $\beta$ -Lys)のみの構造が示す生理活性にはたいへん興味もたれた。そこで、本研究で創製できた新規化合物のうち単離精製できた化合物についてその生理活性を評価した<sup>6)</sup>。その結果、streptothrisamineは、原核・真核細胞ともに全く活性を示さないことが判明し、ST-hFはST-Fと同程度に、原核・真核細胞に強い生理活性を示し、真核生物への毒性は緩和されていなかった。その一方で、6残基の $\beta$ -Lysからなるoligo( $\beta$ -Lys)のみの構造においては、枯草菌*Bacillus subtilis*に対して特異的な抗菌活性を示し、医薬品のリード化合物としての可能性を見いだすことができた。

#### ST類縁化合物BD-12が有するglycine誘導体側鎖の生合成研究

BD-12<sup>6)</sup>は、STと同じく、streptothrisamine骨格を有することから、BD-12生合成遺伝子群にも、ST生合成遺伝子群に見いだしたstreptothrisamine生合成にかかわる遺伝子群が存在すると予想された。そこでBD-12生産菌*S. luteocolor* NBRC13826のBACライブラリーより、streptothrisamine生合成遺伝子群を指標にBD-12生合成遺伝子群を探索した。得られたBACクローンについて、BD-12を生産しない放線菌*S. lividans* TK23を宿主とした異種発現を試みたところ、BD-12の生産が確認されたことから、取得したBACクローンにはBD-12生合成にかかわるすべての遺伝子セットが含まれていることを明らかにした。われわれは、BD-12におけるglycine側鎖も、STの $\beta$ -Lys側鎖と同様、NRPSによって生合成されると予想し、BD-12生合成遺伝子群からOrf5、

Orf18、Orf19のホモログ酵素遺伝子を探索したが、予想に反し、そのようなホモログ酵素遺伝子は存在していなかった。そこで、各遺伝子産物の構造予測を基にアミド合成にかかわる酵素遺伝子を探索した結果、Orf11がFemAX familyに相同性を示すことが判明した。FemAXは、微生物のペプチドグリカン生合成過程におけるペプチド架橋反応を触媒するtRNA依存型ペプチド合成酵素として知られている。したがってBD-12のglycine側鎖は、NRPSではなく、tRNA依存的なメカニズムで生合成される可能性が示唆された。

そこで次に筆者らは、Orf11の機能解析を行うために、Orf11組換え酵素を用いた*in vitro*反応を試みた。Orf11の基質となるaminoacyl-tRNAの供給には、大腸菌由来*in vitro*タンパク質合成システムを利用し、streptothrisamineとglycineを基質に酵素反応を行ったところ、BD-12生合成中間体glycyllthricin(図1)の生成が確認された<sup>7)</sup>(図5)。また本反応について、先にRNaseにて前処理を行った後に酵素反応を行うとglycyllthricinは生成されなかったことから、Orf11は確かにtRNA依存型アミド合成酵素であることを明らかにした。さらにOrf11の基質特性を調べるために、タンパク質性アミノ酸20種類を基質として用いて同様の酵素反応を行ったところ、興味深いことに、僅かにではあるがalanineを基質認識し、alanine側鎖を有する新規ST類縁化合物alanylthricinを生産することが判明した。前述したように、STおよびST類縁化合物のアミノ酸側鎖には、 $\beta$ -Lysタイプまたはglycineタイプの2種類しか見つかっていない。しかし、本酵素を用いた反応において、第3のアミノ酸側鎖をもつ新規ST類縁化合物の創製に成功した。すなわち、Orf11ホモログ酵素の探索とその応用利用は、さらなる新規ST類縁化合物の創出への可能性が期待された。

## Orf11 ホモログ酵素遺伝子の探索と応用利用に関する研究

タンパク質翻訳システムにおいては、Gly-tRNA<sup>Gly</sup>を含め20種のアミノアシル-tRNA<sup>アミノ酸</sup> (aa-tRNA<sup>aa</sup>) が存在することから、天然にはglycine以外のaa-tRNA<sup>aa</sup>を基質認識するOrf11ホモログ酵素が存在すると考え、放線菌ゲノムデータベースより探索を行った。その結果、最近、Orf11ホモログ酵素Sba18を見だし、Orf11と同様に機能解析を行ったところ、Sba18は、Gly-tRNA<sup>Gly</sup>以外にもAla-tRNA<sup>Ala</sup>、Ser-tRNA<sup>Ser</sup>を基質として認識し、glycylthricin, alanylthricinだけでなく、serineを側鎖にもつ新規ST類縁化合物serylthricinを生成することを明らかにした。Orf11とSba18は高い相同性(75%)を有するが、その基質特異性は大きく異なり、Sba18はaa-tRNA<sup>aa</sup>分子におけるtRNA<sup>aa</sup>構造、アミノアシル基構造の両者に対して、広い基質特異性を有するアミド合成酵素であることが判明した。

## おわりに

Streptothrisamine骨格は、すべてのST類縁化合物の共通骨格であるが、本化合物は全く抗菌活性を示さない。しかしアミノ酸側鎖構造を有するSTやST類縁化合物のすべてが強力な抗菌活性を示すことから、これら化合物の生理活性には、アミノ酸側鎖構造が重要な役割を担っていると言える。したがってβ-Lysやglycine以外のアミノ酸側鎖をもつST類縁化合物の多様性創出は、真核生物に毒性を示さない有用化合物の創製につながると期待される。そこで本研究で新たに創製した3つの化合物、glycylthricin, alanylthricin, serylthricinについて、大腸菌、枯草菌、酵母に対する抗菌活性を評価した結果、残念ながら、いずれの化合物もSTやBD-12に比べて弱い抗菌活性が観察された。しかし興味深いことに、serylthricinについては、真核生物である酵母に対して全く抗菌活性を示さなかったことから、ST類縁化合物の医薬品リード化合物としての可能性を示唆できたと考えている。

本研究を通して、ST類縁化合物を生産する放線菌は、非タンパク質性アミノ酸(β-Lys)を構成成分とする場

合にはNRPSを、タンパク質性アミノ酸(glycine)を利用する場合は、tRNA依存型ペプチド合成酵素を使い分けているような、微生物がもつ巧みな生合成戦略を実感した。今後も、われわれの想像を超えた巧みな微生物酵素との出会いを楽しみに、新たな酵素の探索・活用を進めていきたい。そしていつか、われわれが必要とする生理活性をもつST類縁化合物をデザインし、論理的に生合成できることを目指していきたい。

## 文献

- 1) S. A. Waksman: *J. Bacteriol.*, **46**, 299 (1943).
- 2) Y. Hamano, N. Matsuura, M. Kitamura & H. Takagi: *J. Biol. Chem.*, **281**, 16842 (2006).
- 3) C. Maruyama & Y. Hamano: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2494 (2009).
- 4) Z. Ji, M. Wang, J. Zhang, S. Wei & W. Wu: *J. Antibiot. (Tokyo)*, **60**, 739 (2007).
- 5) C. Maruyama, J. Toyoda, Y. Kato, M. Izumikawa, M. Takagi, K. Shin-ya, H. Katano, T. Utagawa & Y. Hamano: *Nat. Chem. Biol.*, **8**, 791 (2012).
- 6) T. Furumai, K. Kaneko, N. Matsuzawa, M. Sato & T. Okuda: *J. Antibiot. (Tokyo)*, **21**, 283 (1968).
- 7) C. Maruyama, H. Niikura, M. Izumikawa, J. Hashimoto, K. Shin-ya, M. Komatsu, H. Ikeda, M. Kuroda, T. Sekizuka, J. Ishikawa *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 3640 (2016).

## プロフィール



丸山 千登勢 (Chitose MARUYAMA)  
 <略歴>1997年福井県立大学生物資源学部生物資源学科卒業/1999年同大学大学院生物資源学研究科生物資源学専攻修了/2012年同大学大学院生物資源学研究科博士(生物資源学)取得/2004年同大学生物資源学部非常勤研究員/2013年同大学生物資源学部博士研究員/同年次世代天然物化学技術研究組合研究開発部特別研究員/2017年福井県立大学大学院生物資源学研究科講師/2019年同准教授、現在に至る<研究テーマと抱負>放線菌をはじめとする微生物が造り出す天然物やその生合成にかかわる遺伝子をもつても多く見つけ出し、世の中の役に立てたい!<趣味>近くの山の散策, ドライブ, 近くの海で陸釣り

Copyright © 2020 公益社団法人日本農芸化学会  
 DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.58.217