

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20380066

研究課題名（和文） アロサミジン分子を基盤としたケミカルバイオロジーの新展開

研究課題名（英文） Development of chemical biology based on allosamidin molecule

研究代表者

作田 庄平（SAKUDA SHOHEI）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：80192087

研究成果の概要（和文）：キチナーゼ阻害物質アロサミジンの示す抗喘息作用の機能解析を行い、アロサミジンプローブと結合するキチナーゼ様タンパク質を鍵タンパク質として同定した。他のアロサミジンターゲット候補タンパク質を含めて組換え体タンパク質発現系を確立し、アロサミジン類との相互作用解析等による抗喘息作用解明の基盤を築いた。アロサミジン生合成遺伝子クラスターの一部の取得に成功し、アロサミジンの放線菌に対するキチナーゼ生産促進作用の環境中での役割を調べるための基盤を築いた。

研究成果の概要（英文）：Allosamidin, a chitinase inhibitor, shows anti-asthmatic and chitinase production promoting activities toward mammals and *Streptomyces* bacteria, respectively. Allosamidin photo-affinity probe was used to identify a chitinase-like protein as a key allosamidin-binding molecule for anti-asthmatic activity of allosamidin. Expression systems to obtain recombinant candidate proteins for allosamidin's target molecule including the chitinase-like protein were constructed. Gene cluster responsible for allosamidin biosynthesis was obtained, which is useful for investigating the role of allosamidin in environment.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|------------|
| 2008年度 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |
| 2009年度 | 2,600,000 | 780,000 | 3,380,000 |
| 2010年度 | 2,600,000 | 780,000 | 3,380,000 |
| 総計 | 8,000,000 | 2,400,000 | 10,400,000 |

研究分野：生物有機化学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：生物活性物質、キチナーゼ、喘息、キチナーゼ様タンパク質、アロサミジン、放線菌

1. 研究開始当初の背景

研究代表者が1986年に発見したアロサミジンは放線菌の代謝産物であり、キチンミミックの擬似三糖構造を有し（図3）、キチナーゼの触媒活性部位に触媒遷移状態ホモログとして強く結合する。アロサミジンは種々の生物におけるキチナーゼの生理的役割の解明に用いられて来たが、近年アロサミジンの有する2つの生理作用が新たに見出

された。一つは、喘息マウスに対する抗喘息作用であり、もう一つは放線菌に対するキチナーゼ生産促進作用である。アロサミジンの抗喘息作用のターゲット分子の解明は新たな作用点を有する抗喘息剤の開発に有用であり、喘息発症メカニズム解明の基礎研究としても重要である。また放線菌のキチナーゼ生産に関与するアロサミジンの作用解明にも大きな意義がある。土壌には昆虫やカビ由

来のキチン質が多く存在し、土壌微生物にとってキチンは重要な栄養源である。放線菌は土壌のキチン分解における主役でありそのキチナーゼ生産調節は環境中のキチン代謝さらには生態系に大きな影響を与えると考えられる。アロサミジンはその中で鍵となるシグナル物質として機能する可能性がある。以上より、研究代表者はアロサミジンの持つそれら生理活性の作用機構を分子レベルで解明することを目的に研究を進めている。本研究開始当初での知見は以下の通りであった。

抗喘息作用におけるアロサミジンのターゲット分子は当初、喘息マウスの肺において発現が誘導される哺乳類酸性キチナーゼであるとされていた。しかし、研究代表者らはアロサミジン類縁体であるデメチルアロサミジン (図3) がアロサミジンよりはるかに優れた抗喘息作用を示し、両者の活性の違いは酸性キチナーゼに対する阻害活性の違いによるものではないことを明らかにした。即ち、酸性キチナーゼだけではデメチルアロサミジンの強い抗喘息作用は説明できず、抗喘息作用において重要なアロサミジン類のターゲット分子が別に存在することが示唆された。

放線菌のキチナーゼ生産促進活性では、アロサミジンがキチン分解物の作用により放線菌の菌体外に放出され、キチナーゼ遺伝子上流にコードされるタンパク質で構成される二成分制御系のセンサー部位に作用することでキチナーゼ生産を促進することが明らかとなった。しかし、アロサミジンの作用の詳細な分子機構には不明な点が多く残されており、また環境中での役割については全く不明である。

2. 研究の目的

喘息は、抗原によって活性化された Th2 細胞より分泌されるインターロイキン 13 (IL-13) が主なサイトカインとして機能し、そのシグナルが好酸球の活性化、ケミカルメディエーターの分泌を促し、気管支収縮等がおこり発症するとされる (図1)。アロサミジンは IL-13 投与で誘導した喘息マウスにおいて好酸球の活性化等の喘息症状を緩和することよりそのターゲット分子は IL-13 の下流でシグナル分子として機能すると考えられた。従って、アロサミジンのターゲット分子としては IL-13 によって発現が誘導されるアロサミジンによってその機能が阻害されるタンパク質であると推定された。そこで本研究ではまず、喘息マウスの肺において発現が上昇しアロサミジンと結合する分子を取得することを目的とした。次に得られたアロサミジン結合タンパク質をもとにアロサミジンとデメチルアロサミジンの作用の違いを

解明することにした。

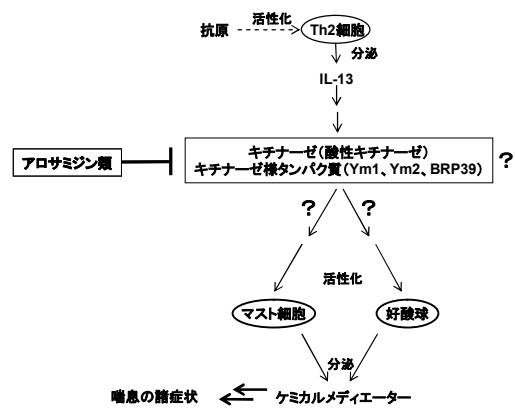


図1 喘息とアロサミジン類の推定作用点

アロサミジンのキチナーゼ生産促進機構として、アロサミジンは放線菌の菌体内に生産されるがキチンの存在下で菌体外に放出され菌体の外から二成分制御系のセンサーヒスチジンキナーゼのセンサー部位にシグナルを与え、キチナーゼの生産を促進し、キチンの分解を早め、菌の成育を活性化することが示されている (図2)。しかし、センサー部位に結合するリガンド分子が何であるかは不明である。アロサミジンそのものあるいはアロサミジンとタンパク質との複合体がリガンドの候補として考えられた。そこでまずアロサミジンと結合する分子の同定を目的としアロサミジンの作用を探ることにした。また、環境中でのアロサミジンの機能を解析するために有用なアロサミジン生合成遺伝子の取得を目指すことにした。

以上のように本研究では、アロサミジンの抗喘息作用およびキチナーゼ生産促進作用の分子機構をケミカルバイオロジーの手法を用いて解明することを目的とした。

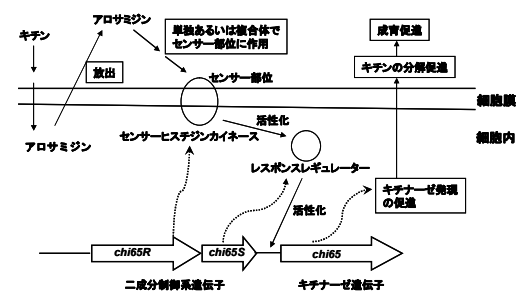


図2 アロサミジンのキチナーゼ生産促進機構モデル

3. 研究の方法

アロサミジン結合タンパク質の取得および結合活性測定のためにアロサミジンおよびデメチルアロサミジンのフォトアフィニ

ティプローブおよびビオチン化プローブを調製した。アロサミジンの非還元末端のアセトアミドを酸加水分解して得られるアミンをもとにプローブを調製することにした。

喘息マウスの気管支肺胞洗浄液 (BALF) に存在するアロサミジン結合タンパク質の取得を、フォトアフィニティプローブを用いて試みた。また、放線菌の膜タンパク質画分および可溶性タンパク質画分に存在するアロサミジン結合タンパク質の同定を、同様にプローブを用いて試みた。

肺胞洗浄液中から得られたアロサミジン結合タンパク質の同定を行った。同定された結合タンパク質を、大腸菌を用いて発現する系の確立を試みた。

喘息マウスの肺において発現が上昇しアロサミジンと結合する可能性が高いキチナーゼおよびキチナーゼ様タンパク質の組換え体タンパク質の発現系の確立を試みた。

アロサミジン生合成の最終段階であるデメチルアロサミジンからアロサミジンへの変換酵素であるメチルトランスフェラーゼの酵素活性測定系を確立し酵素の精製を試みた。

アロサミジン生産菌のゲノムを解析し、全ゲノムをカバーしていると考えられる約2000のDNA断片配列を得た。アロサミジン生合成酵素をコードしていると考えられるDNA断片をもとに生合成遺伝子クラスターの取得を試みた。

4. 研究成果

アロサミジンおよびデメチルアロサミジンを0.5 M HClで脱アセチル化しモノアミンを得、フォトアフィニティおよびビオチン化プローブを調製した(図3)。得られたプローブはアロサミジンと同等の強いキチナーゼ阻害活性を維持していた。

IL-13処理した喘息誘導マウスのBALFに含まれるアロサミジン類結合タンパク質を、フォトアフィニティプローブを用いて検出した。45 KDa付近にプローブと結合するバンドが検出され、そのバンドはアロサミジンあるいはデメチルアロサミジンを加えた競合阻害実験では消失したため、アロサミジン類特異的結合分子であると考えられた。またそのバンドは喘息誘導マウスで発現が上昇したタンパク質のバンドと一致していた。バンドに含まれるタンパク質はN末端アミノ酸配列解析によりYm1および/またはYm2であることが分かった。両者はアミノ酸配列で高い相同性がありアミノ酸配列解析では区別が難しかった。そこでマウス肺由来のcDNAを解析し喘息誘導マウスにおいてmRNAレベルでYm1が主に発現していることを明らかにした。Ym1とアロサミジン類プローブとの結合は組換え体Ym1を用いて確認した。

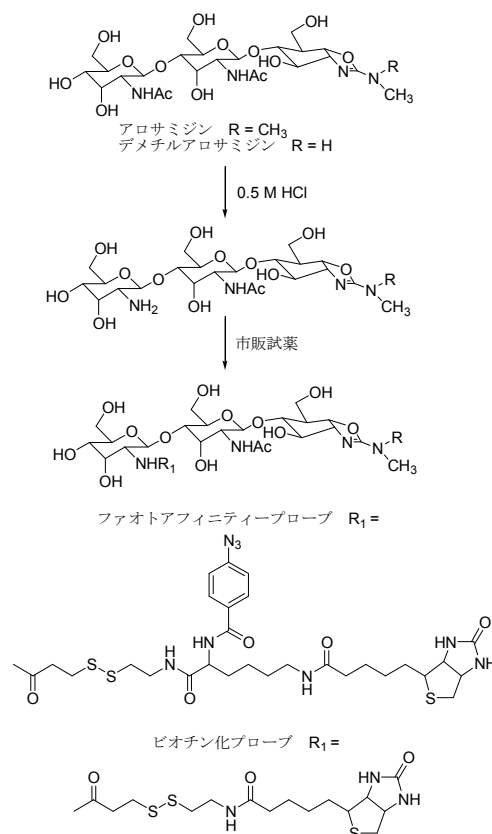


図3 アロサミジン、デメチルアロサミジン、プローブの構造

Ym1はキチナーゼ様タンパク質に属する。キチナーゼ様タンパク質は哺乳類、昆虫、植物等に存在するがそれらの分子レベルでの作用機構に関する知見はほとんど得られていない。キチナーゼ様タンパク質はキチナーゼと類似したアミノ酸配列および立体構造を有するが、触媒活性に必須の酸性アミノ酸残基の変異によりキチン分解活性は失われている。いくつかのキチナーゼ様タンパク質では、変異した触媒部位にキチンやN-アセチルグルコサミンオリゴマーが結合することが知られている。しかし哺乳類には生体成分としてキチンは存在せず、キチナーゼ様タンパク質が結合する分子は不明である。2004年に喘息と酸性キチナーゼの関連が指摘されて以来、酸性キチナーゼおよびキチナーゼ様タンパク質の作用とそれらの喘息との関わりについての研究にしのぎが削られて来っており、酸性キチナーゼ、Ym1/Ym2および他のキチナーゼ様タンパク質であるBRP39がマウスの喘息発症と関与するとの報告がなされている。

そこでそれらキチナーゼおよびキチナーゼ様遺伝子の発現を、喘息モデルマウスの肺由来のcDNAを用いて調べた。その結果酸性キチナーゼ、Ym1、Ym2、BRP39遺伝子全てにおいて喘息発症時での発現の上昇が見られ

た。

本研究においてアロサミジン類が Ym1 と結合することを示されたが、BRP39 についても、アロサミジン類と結合する可能性は高いと考えられる。即ち、酸性キチナーゼ、Ym1、Ym2、BRP39 全てが喘息発症に関与しており、アロサミジン類はそれら全てに結合し作用を阻害する可能性があることになる (図 1)。そこでそれらタンパク質の組換え体を作製しアロサミジン類との結合活性を調べることを計画した。大腸菌を用いた発現系で可溶性画分に得やすい GST 融合タンパク質として発現する系を構築し、GST 融合酸性キチナーゼ、GST 融合 Ym1、GST 融合 Ym2、GST 融合 BRP39 の発現に成功した。今後、それら GST 融合タンパク質および GST 部分を除去した組換え体タンパク質を用いて、アロサミジン類との結合の強さ、培養細胞を用いた実験でのアロサミジンの作用、酸性キチナーゼ、Ym1/Ym2、BRP39 それぞれの結合分子等をひとつひとつ解明することで、アロサミジン類の抗喘息作用の全体像を明らかにすることが重要である。その中でアロサミジンとデメチルアロサミジンの示す活性の違いは大きな手がかりになると考えられる。

アロサミジンフォトアフィニティプローブを用いてアロサミジン生産菌の膜タンパク質画分においてプローブと結合するタンパク質を検出した。その結果、アロサミジンによって生産促進され培養液上清に分泌される 46 kDa キチナーゼをコードする遺伝子が生産する 65 kDa キチナーゼが結合タンパク質として検出された。65 kD キチナーゼはフィブロネクチンタイプ III ドメインを有しているが培養上清の 46 kDa キチナーゼでは存在しない。また、センサーヒスチジンキナーゼもアロサミジン結合タンパク質として同定された。これらの結果はアロサミジンがキチナーゼと複合体を作り、複合体が二成分制御系のセンサー部分に作用することを示唆していた (図 2)。今後さらなる解析を行いアロサミジンのキチナーゼ生産促進機構の全体像を明らかにする予定である。

デメチルアロサミジンからアロサミジンへの変換を司るメチルトランスフェラーゼの酵素反応系として、重水素ラベルデメチルアロサミジンを S-アデノシルメチオニン存在下酵素液と反応させ、生成した重水素ラベルアロサミジンを LC-MS で分析する方法を確立した。アロサミジン生産菌 *Streptomyces* sp. AJ9463 の培養菌体破碎液上清より、硫酸沈殿、DEAE-Sepharose、MonoQ、Phenyl-5PW、SUPER SW-3000 による精製を行い比活性が 100 倍以上上昇した酵素液を得ることができた。精製サンプルの SDS-PAGE を行い、検出された複数のバンドの N 末端アミノ酸配列解析を行い目的の酵素である可能性のある配列を持

つバンドを特定することができた。

AJ9463 株の DNA 配列を受託解析により解析し、約 2000 の DNA 断片配列を得た。その中でアロサミジン生合成に関与すると考えられるアミジノトランスフェラーゼとオキシドレダクターゼを含む DNA 断片に注目し、その前後の配列をインバース PCR により取得した。現在 25 kbp の DNA 配列が得られており、その中にはアロサミジンの生合成酵素をコードすると考えられる遺伝子が並んでいるが、いくつか生合成に必要と考えられる酵素遺伝子が不足しておりさらなる解析により生合成遺伝子全長を取得する予定である。また今後、コスミドライブラリーを作製し、宿主放線菌にアロサミジン生産させる方法でアロサミジン生合成遺伝子であることをの証明を行い、さらに、得られたアロサミジン生合成遺伝子を解析し、アロサミジンのキチナーゼ生産促進活性の機能につながる遺伝子がないか調べる。また、実際の環境中でのアロサミジン生合成遺伝子の発現を調べ、アロサミジンの環境における役割を探る予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件 全て査読有)

- ①Yosuke Sato, Shigeo Suzuki, Seiko Muraoka, Naoya Kikuchi, Naotaka Noda, Takafumi Matsumoto, Hiromasa Inoue, Hiromichi Nagasawa, Shohei Sakuda, *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 3054-3059, 2011.
- ②Toki Taira, Maho Fujiwara, Nicole Denhart, Hiroko Hayashi, Shoko Onaga, Takayuki Ohnuma, Thomas Letzel, Shohei Sakuda, Tamo Fukamizo, Transglycosylation reaction catalyzed by a class V chitinase from cycad, *Cycas revolute*: A study involving site-directed mutagenesis, HPLC, and real-time ESI-MS. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1804**, 668-675, 2010.
- ③Jamil Baban, Salima Fjeld, Shohei Sakuda, Vincent G. H. Eijsink, Morten Soerlie, The roles of three *Serratia marcescens* chitinases in chitin conversion are reflected in different thermodynamic signatures of allosamidin binding. *J. Phys. Chem. B*, **114**, 6144-6149, 2010.
- ④Henrik Zakariassen, Laila Klemetsen, Shohei Sakuda, Gustav Vaaje-Kolstad, Kjell M. Varum, Morten Sorlie, Vincent G. Eijsink, Effect of enzyme processivity on the efficacy of a competitive chitinase inhibitor. *Carbohydrate Polymers*, **82**, 779-785, 2010.
- ⑤Yasuhiro Takenaka, Sachiko Nakano, Masahiro Tamoi, Shohei Sakuda, Tamo

Fukamizo, Chitinase gene expression in response to environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*: Chitinase inhibitor allosamidin enhances the stress, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 1066-1071, 2009.

⑥Takafumi Matsumoto, Hiromasa Inoue, Yosuke Sato, Yoshihiro Kita, Takako Nakano, Naotaka Noda, Miyuki Eguchi-Tsuda, Atsushi Moriwaki, Keiko Kan-o, Koichiro Matsumoto, Takao Shimizu, Hiromichi Nagasawa, Shohei Sakuda, Yoichi Nakanishi, Demethylallosamidin, a chitinase inhibitor, suppresses airway inflammation and hyperresponsiveness. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **390**, 103-108, 2009.

⑦Shigeo Suzuki, Eiyo Nakanishi, Keiko Furihata, Katsushiro Miyamoto, Hiroshi Tsujibo, Takeshi Watanabe, Yasuo Ohnishi, Sueharu Horinouchi, Hiromichi Nagasawa, Shohei Sakuda, Chitinase inhibitor allosamidin promotes chitinase production of *Streptomyces* generally, *Int. J. Biol. Macromol.*, **43**, 13-19, 2008.

〔学会発表〕(計6件)

- ①作田庄平、アロサミジンのキチナーゼ生産促進および抗喘息作用の分子機構解析、第52回天然有機化合物討論会、2010年9月29日、静岡
- ②村岡聖子、マウスのキチナーゼおよびキチナーゼ様タンパク質とアロサミジン類、第24回キチン・キトサンシンポジウム、2010年7月13日、東京
- ③村岡聖子、アロサミジン類の抗喘息作用における作用機構解析、日本農芸化学会2010年度大会、2010年3月29日、東京
- ④Shohei Sakuda, Strong anti-asthmatic and Ym1-binding activities of demethylallosamidin, 11th International Conference on Chitin & Chitosan, Sep. 8, 2009, Taipei
- ⑤田川直史、アロサミジン生合成酵素 methyltransferase の精製に関する研究、日本農芸化学会2009年度大会、2009年3月29日、福岡
- ⑥作田庄平、多彩な顔を持つアロサミジン、第22回キチン・キトサンシンポジウム特別セッション、2008年8月5日、新潟

〔図書〕(計3件)

- ①村岡聖子、野田直孝、井上博雅、菊池直也、長澤寛道、作田庄平、マウスのキチナーゼおよびキチナーゼ様タンパク質とアロサミジン類、キチン・キトサン研究、**17**, 70-73, 2011.
- ②Shohei Sakuda and Makoto Kimura, Toxins of microorganisms In Comprehensive Natural Products Chemistry Vol. 3 Natural Products: Chemical Ecology Edited by Kenji Mori, Elsevier Limited. 2010, P411-455.
- ③Shohei Sakuda, Chitinase inhibitors and its

significance in biology In Binomium Chitin-Chitinase: Emerging issues Edited by Salvatore Musumeri and Maurizio G. Paoletti, Nova Science Publishers, Inc. 2009, 20 pages.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

作田庄平 (SAKUDA SHOHEI)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
准教授
研究者番号：80192087

(2) 連携研究者

井上博雅 (INOUE HIROMASA)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・
教授
研究者番号：30264039