

令和 6 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02127

研究課題名（和文）生物合成系の再設計による革新的核酸系化合物の創製

研究課題名（英文）Creation of Innovative Nucleic Acid-Based Compounds by Redesigning Biosynthetic Machinery

研究代表者

葛山 智久（Kuzuyama, Tomohisa）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授

研究者番号：30280952

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：核酸系化合物であるAngustmycin (AGM)の生合成遺伝子クラスターを同定し、生合成経路の全容を解明した。その過程で、新規脱水酵素であるAgm6が、2-fluoroadenosineに対しても活性を持つことを明らかにした。Agm6の立体構造を元にした考察により、基質認識を拡大させた変異酵素を作出し、2-fluoroadenosineへの活性が向上する変異としてT61AとT61S変異を発見した。特に、変異導入によって活性が向上した2-fluoroadenosineと2-chloroadenosineについて、目的のexo-glycal環構造を持つ新規核酸系化合物を単離することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核酸系化合物は生体内で様々な役割を担う核酸誘導体のアナログとなりうることから、核酸系化合物の構造多様化は新規創薬のための有望な手段である。一方で、新規核酸系化合物の単離報告例は減少傾向にあり、新規核酸系化合物の発見は困難となってきた。本研究課題では、研究過程で解明した生合成系の理論的改変による新規核酸系化合物生産系の構築に取り組むことにより、exo-glycal構造を有する新規な核酸アナログ化合物を創出することに成功した。これを元にした化合物の合成の可能性を示すことで、アナログ耐性病源菌や物質生産株の開発に向けた、多様な新規化合物の開発可能性の提示できた点において意義がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we identified a biosynthetic gene cluster for the nucleic acid compound angustmycin (AGM). In the process, we found that Agm6, a novel dehydratase, is also active against 2-fluoroadenosine. Next, based on protein conformational studies, we generated mutant enzymes with the aim of expanding substrate recognition to adenosine analogs, and discovered the T61A and T61S mutations with enhanced activity against 2-fluoroadenosine. In particular, for 2-fluoroadenosine and 2-chloroadenosine, whose activity was improved by the mutagenesis, we succeeded in isolating nucleic acid-based compounds with the desired exo-glycal ring structure.

研究分野：天然物化学

キーワード：天然有機化合物 生合成 核酸系化合物

1. 研究開始当初の背景

核酸系抗生物質と耐性菌

核酸アナログ物質は、核酸合成酵素へのアナログ阻害効果によって抗生作用を持つ場合が多く知られており、その作用から医療目的や産業目的で用いられる例が存在する。実際に医薬品として用いられる核酸系抗生物質の例として、エンテカビル (Entecavir) が存在する (Figure 1)。B 型慢性肝炎の治療では、核酸アナログ製剤であるエンテカビルが用いられることがあるが、これは B 型肝炎ウイルスが有する HBV 逆転写酵素への結合によって転写活性を阻害し、ウイルスの増殖を止めることで薬効を示している。しかし、近年ではエンテカビルの長期投薬によって耐性を獲得したウイルスの出現が問題となっており、薬剤耐性獲得機構に関する研究が進められている。産総研の安武義晃らの研究では、エンテカビル結合型の HIV 逆転写酵素キメラを作製することで、薬剤耐性の獲得機構の解明が試みられている。この研究では活性ポケットに導入された変異が核酸アナログの結合を立体的に阻害している可能性が示されており、同じ核酸アナログ物質であっても、構造の違いが薬剤耐性の獲得に大きく影響を与える可能性が考えられる。

核酸アナログ物質が産業において用いられる例としては、S-(2-aminoethyl)-L-cysteine (AEC) が存在する (Figure 1)。 *Brevibacterium flavum* を用いた L-リジンの発酵生産において、AEC は L-リジンと類似した構造を持つことから、スレオニンとの共添加によって L-リジンの合成にフィードバック阻害を起こすことが知られている。味の素の佐野孝之輔らの研究では、*Brevibacterium flavum* に対して AEC およびスレオニンを用いたスクリーニングを行うことで、AEC によるフィードバック阻害への耐性株を選択し、培養条件によって差は出るものの、野生株 (No. 2247) が C1 培地にて 0.5 g/L の L-リジンを蓄積するのに対して、31.8 g/L の L-リジンを蓄積する AEC 耐性株 FA-3-115 の入手に成功した。

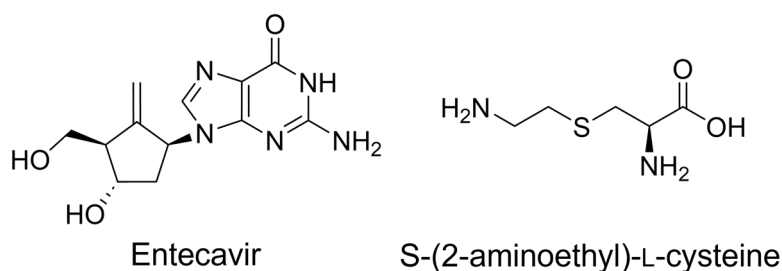


Figure 1. Entecavir と S-(2-aminoethyl)-L-cysteine の構造

Angustmycin 類

核酸系抗生物質の一つである Angustmycin A (以降 AGM A) および Angustmycin C (以降 AGM C) は、放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* var. *angustmyceticus* の培養上清から発見された物質であり、同時に単離された Angustmycin B は後に adenine であることが判明した (Figure 2)。AGM C は adenosine のプリン塩基 1 位の炭素にヒドロキシメチル基が付加した核酸アナログ構造を有しており、AGM A はヒドロキシメチル基に加え、五炭糖の外側に C

二重結合を含む *exo*-glycal 構造を特徴として有している。しかしながら、AGM 類は生化学試薬として近年でも用いられているにも関わらず、その生合成研究は 1960 年代に行われたラベル体投与実験を最後に報告が断たれており、*exo*-glycal の形成機構を含め、AGM 類の生合成機構については不明である。さらにはその誘導体展開についても、有機合成による異性体の報告があるのみであり、異なる核酸塩基を有する誘導体の報告はない。

AGM A は抗生作用として GMP 合成酵素への阻害を持つことが分かっており、GMP を由来とする GTP, GDP, ppGpp などの生体に必須な物質生産を阻害することが出来る。ppGpp は細菌の緊縮応答に関わるシグナル因子として機能し、例えばサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* では ppGpp が病原性を持つ遺伝子の発現に関わることが示されている。

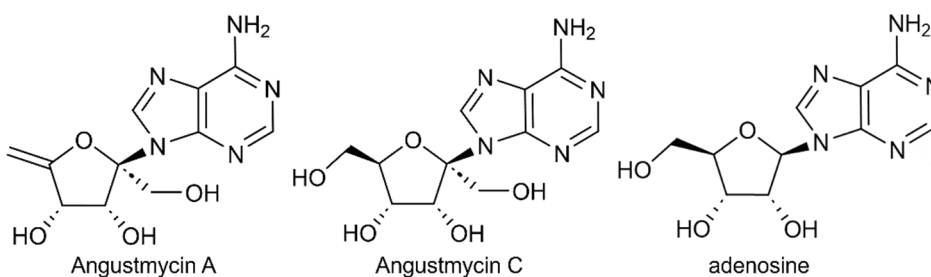


Figure 2. Angustmycin A, Angustmycin C, adenosine の構造

2. 研究の目的

核酸系化合物は生体内で様々な役割を担う核酸誘導体のアナログとなりうることから、核酸系化合物の構造多様化は新規創薬のための有望な手段である。一方で、新規核酸系化合物の単離報告例は減少傾向にあり、新規核酸系化合物の発見は困難となってきた。したがって、従来のような生物活性などを指標とした核酸系天然化合物の単離とは根本的に異なるアプローチによる化合物へのアクセス手法の開発が急務である。そこで本研究計画では、本研究で解明する生合成理論をもとに、核酸系天然物生合成系の論理的な再設計による核酸系化合物の構造多様化の創出を目的とする。特に、本研究課題では、上述した AGM の核酸系天然化合物を対象として、その生合成理論の解明と、そこから得られた知見に基づいた生合成系の理論的改変による新規核酸系化合物生産系の構築に取り組む。

3. 研究の方法

AGM A および C の生合成遺伝子の同定と機能解析を行い、*in vitro* や大腸菌を用いた *in vivo* での AGM A および C の生産を目指す。特異な構造である *exo*-glycal を形成する酵素を、試薬として入手可能な核酸化合物と反応させることで、当該酵素の基質特異性を調べる。さらに、反応が進行した場合には、クロマトグラフィーを用いて精製し、NMR を用いて化学構造を明らかにすることで、多様な *exo*-glycal 含有核酸誘導体を創出する。

4. 研究成果

AGMA, AGM C の生合成経路の全容解明

本研究課題において、AGM A, AGM C の生合成クラスターとして *agm1* から *agm6* の 6 つの遺伝子で構成される *agm* クラスターを同定し、その機能および生合成経路についてその全容を解明することに成功した (Figure 3)。

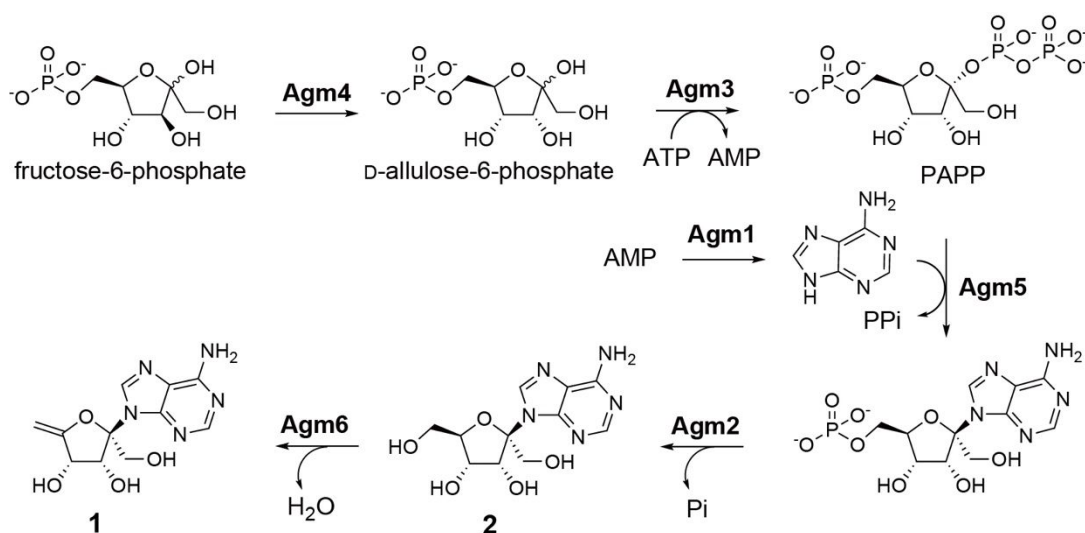


Figure 3. AGMA (1)と AGM C (2)の生合成経路

その過程で、Agm6は生合成経路の最後の反応において、AGM Cを基質に脱水反応を触媒し、AGM Aを生成物として放出することを明らかにした。また、Agm6の配列を元に相同性の高いホモログ酵素を調べたとき、それらのほとんどがSAH hydrolaseとして機能していることを見出した。SAH hydrolaseは *S*-adenosyl-L-homocysteine を基質とし、加水分解反応を触媒して adenosine と cysteine を生成する酵素であり、Agm6の脱水反応の特異性が伺える。また、Agm6は基質認識に寛容性を持つことも明らかにした。Agm6は真の基質であるAGM C以外にも、adenosine やプリン 2位にハロゲン修飾したような 2-fluoroadenosine, 2-chloroadenosine に対しても活性を示し、一方でプリン 2位以外が修飾された toyocamycin, *N*6-methyladenosine, tuberdin, 2'-*O*-methyladenosine, 8-bromoadenosine に対しては活性を持たないことも明らかにした。また同じプリン 2位へのハロゲン修飾物であっても 2-bromoadenosine については、活性を示さないことも同様に明らかにした。

考察および今後の展望

本研究では、新規脱水酵素である Agm6の基質認識の寛容性を拡大することを目指した。まず、AGMの生合成遺伝子クラスターを同定し、その生合成経路の全容を解明することに成功した。ついで、Agm6が基質認識の寛容性を持ち、真の基質であるAGM Cの他にも

adenosine や adenosine アナログである 2-fluoroadenosine に対しても活性を持つことを明らかにした。次に、タンパク質立体構造を元にした考察により、adenosine アナログへの基質認識を拡大させることを目的とした変異 5 種を検討し、実際に変異導入を行った。ついで、作出した 5 種の変異が adenosine アナログへの活性にどのような影響を与えるのかを調べ、2-fluoroadenosine への活性が向上する変異として T61A, T61S 変異を発見した。特に T61A 変異について注目した活性評価実験により、2-chloroadenosine への活性向上および 2-bromoadenosine への新規基質認識を確認した。最後に、変異導入によって活性の向上が得られた 2-fluoroadenosine と 2-chloroadenosine について、大スケールの反応系を構築することによって酵素生成化合物を単離し、NMR 解析によってその構造を決定した。

本研究で得られた新規性として、T61A 変異 Agm6 酵素における 2-chloroadenosine への活性強化、2-bromoadenosine への基質認識の開発があり、これらは共に adenosine のプリン 2 位へのハロゲン修飾化合物である。これらの現象が生じる理由としては、Thr61 が adenosine のプリン 2 位炭素近傍に存在するため、側鎖が小さい Ala への変異により、プリン 2 位ハロゲン修飾化合物の基質認識に対する立体障害が少なくなり、その結果基質として認識しやすくなったためであると考察出来る。

今後の研究目標として、4',5'-dehydro-5'-deoxy-2-fluoroadenosine と 4',5'-dehydro-5'-deoxy-2-chloroadenosine の十分量の生産が可能になったことから、これらの構造的特徴である *exo-glycal* 構造の反応性に注目し、5'位炭素への更なる伸長反応を試みる。2002 年の Lopez らの報告では、同様に *exo-glycal* 構造を持つ化合物である 1-*exo*-methylene-2,3-anhydrofutanoses を元とした伸長反応に成功している。この研究ではハロゲン化させた *exo-glycal* 化合物とボロン酸を鈴木カップリング反応させることで、*exo-glycal* 構造の炭素二重結合を元に炭素鎖が伸長したような化合物の生成に成功しており、4',5'-dehydro-5'-deoxy-2-fluoroadenosine, 4',5'-dehydro-5'-deoxy-2-chloroadenosine への応用も期待される。Adenosine アナログであるという構造的特徴に加えて、更なる伸長反応を進めることで、より多様な構造を持った核酸アナログの創出ができると考えている。

以上、本研究課題では、研究過程で解明した生合成系の理論的改変による新規核酸系化合物生産系の構築に取り組むことにより、*exo-glycal* 構造を有する新規な核酸アナログ化合物を創出することに成功した。これを元にした化合物の合成の可能性を示すことで、アナログ耐性病源菌や物質生産株の開発に向けた、多様な新規化合物の開発可能性の提示できたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shiraishi Taro, Xia Jiaqi, Kato Teruhito, Kuzuyama Tomohisa	4. 巻 74
2. 論文標題 Biosynthesis of the nucleoside antibiotic angustmycins: identification and characterization of the biosynthetic gene cluster reveal unprecedented dehydratase required for exo-glycal formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 830 ~ 833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-021-00466-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shao Xiaofei, Zheng Chang, Xu Peng, Shiraishi Taro, Kuzuyama Tomohisa, Molinaro Antonio, Silipo Alba, Yu Biao	4. 巻 61
2. 論文標題 Total Synthesis and Stereochemistry Assignment of Nucleoside Antibiotic A 94964	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 e202200818
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202200818	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 徐昊、白石太郎、葛山智久
2. 発表標題 Biosynthesis of the acyl side chain of the nucleotide antibiotic A-94964 produced by Streptomyces sp. SANK 60404
3. 学会等名 2022年度本放線菌学会大会 福井
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 徐昊、白石太郎、葛山智久
2. 発表標題 Biosynthesis of the acyl side chain in the nucleoside antibiotic A-94964 by unusual Type I polyketide synthase of Streptomyces sp. SANK 60404
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
中国	Univ. of Chinese Academy of Sciences			
イタリア	University of Naples Federico II			