

令和 6 年 5 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06629

研究課題名(和文)新規アルギニン水酸化酵素の電子伝達系の同定と抗結核薬の大量生産システムの確立

研究課題名(英文) Identification of redox partner for a novel arginine hydroxylase and establishment of high level production system for anti-tubercular agent

研究代表者

熊谷 孝則 (Kumagai, Takanori)

広島大学・医系科学研究科(薬)・准教授

研究者番号：70274058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新規アルギニン水酸化酵素DcsAの電子伝達系を同定するため、抗結核薬D-サイクロセリン(D-CS)生産菌由来の3種のフェレドキシン(FDX)および2種のFDX還元酵素(FDR)を、大腸菌の宿主・ベクター系を利用することにより取得した。しかしながら、DcsAの電子伝達系の決定には至らなかった。そこで、電子伝達系としてPseudomonas putida由来のプチダレドキシン(PDX)およびPDX還元酵素(PDR)の利用を考え、PDXおよびPDRの大腸菌における発現系を構築し、両タンパク質を可溶性のタンパク質として発現させることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果は、大腸菌を宿主とした抗癌剤ヒドロキシウレア(HU)の生産系の構築につながる可能性があり、学術的に意義があると思われる。また、HU生産系の構築が達成されれば、D-CSの大腸菌を宿主とした実用レベル高生産系が確立され、より安全で安価なD-CSの供給につながる可能性があり、社会的に意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)： In the present study, in order to identify the redox partner for a novel arginine hydroxylase, DcsA, three ferredoxins (FDXs) and two FDX reductases (FDRs) from a D-CS-producing microorganism were obtained. However, the redox partner for DcsA could not be determined. Considering putidaredoxin (PDX) and PDX reductase (PDR) from Pseudomonas putida as the redox partner for DcsA, expression system for each protein was constructed using Escherichia coli as a host, and each protein was expressed as soluble protein.

研究分野：微生物薬品学

キーワード：アルギニン水酸化酵素 電子伝達系 抗癌剤 ヒドロキシウレア 抗結核薬 D-サイクロセリン 異種生産

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

D-サイクロセリン (D-CS, 図 1) は、放線菌 *Streptomyces (S.) lavendulae* ATCC11924 により生産される抗生物質であり、結核治療の二次選択薬として用いられている。私はこれまで、ATCC11924 株から D-CS 生合成遺伝子クラスターをクローニングすることに成功し、その生合成経路 (図 1) を明らかにするとともに、大腸菌を宿主とした D-CS 生産系の構築に成功した (引用文献 ~)。

一方、D-CS の生合成中間体であり、かつ、抗癌剤として使用されるヒドロキシウレア (HU) (図 1) 生合成の初発反応は、遺伝子破壊実験から、DcsA が関与することを明らかにしていたものの、その触媒機能は不明であった。そこで、*in vitro* における解析を行った結果、DcsA はヘムを含有する新規のアルギニン水酸化酵素であり、その活性発現には、電子伝達系が必要であることを明らかにした。そこで、D-CS 生産菌における DcsA の電子伝達系を同定するため、ATCC11924 株の全ゲノム解析を実施し、フェレドキシン (FDX) をコードする遺伝子を 7 個 (*sla_0278*, *sla_0641*, *sla_0828*, *sla_1644*, *sla_2106*, *sla_5080*, *sla_5828*) および FDX 還元酵素 (FDR) をコードする遺伝子 2 個 (*sla_0456*, *sla_5644*) を見出した。

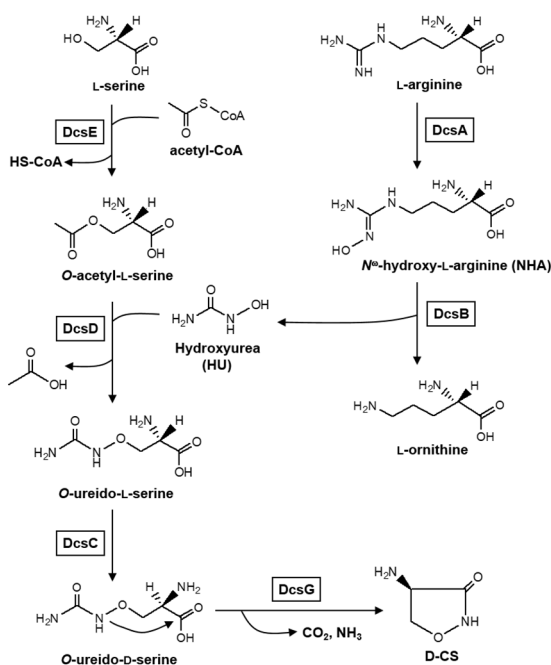


図1 D-CSの生合成経路

2. 研究の目的

(1) DcsA の電子伝達系の同定

フェレドキシン (FDX) をコードする遺伝子 (*sla_0278*, *sla_0641*, *sla_0828*, *sla_1644*, *sla_2106*, *sla_5080*, *sla_5828*) および FDX 還元酵素 (FDR) をコードする遺伝子 (*sla_0456*, *sla_5644*) について、大腸菌の宿主・ベクター系を用いて発現させ、クロマトグラフィーの手法を用いてそれぞれのタンパク質を精製する。精製した FDX, FDR および DcsA を用いて、*in vitro* で DcsA の活性を測定することにより、DcsA の電子伝達系を同定する。

(2) 大腸菌を宿主とした HU 生産系の構築

dcsA, *dcsB*, および、上記(1)で同定した FDX および FDR をコードする遺伝子は大腸菌に導入し、L-アルギニンを原料とした大腸菌による HU 生産系を構築する。

(3) L-セリンおよび L-アルギニンを原料とした大腸菌による D-CS 生産

これまで、大腸菌を宿主とし、L-セリンおよび HU を原料とした D-CS 生産系を構築している。上記(2)の研究により、大腸菌を宿主とした HU 生産系の構築に成功したならば、既存の D-CS 生産系と組み合わせることにより、大腸菌を宿主とし、L-セリンおよび L-アルギニンを原料とした D-CS 生産系を構築する。

3. 研究の方法

(1) FDX および FDR 発現大腸菌の作製

フェレドキシン (FDX) をコードする遺伝子 (*sla_0278*, *sla_0641*, *sla_0828*, *sla_1644*, *sla_2106*, *sla_5080*, *sla_5828*) および FDX 還元酵素 (FDR) をコードする遺伝子 (*sla_0456*, *sla_5644*) について、大腸菌のコドンに最適化した人工遺伝子を合成し、それらを pUCFa ベクターに組み込んだプラスミドを構築した。構築したプラスミドから、制限酵素消化によりそれぞれの遺伝子を切り出し、発現ベクター pET-21a(+) に挿入することにより、各遺伝子の発現用プラスミドを構築した。構築した発現プラスミドを大腸菌 BL21(DE3) 株に導入することにより、FDX および FDR 発現大腸菌を作製した。

(2) FDX および FDR の発現

FDX および FDR の発現は、Overnight Express Autoinduction System 1 を用いて、自動誘導により行った。培養は、OD₆₀₀ が 1.0 になるまで 28 で行い、その後、18 にて 24 時間培養した。タンパク質発現の確認は、Tricine-SDS-PAGE により行った。

(3) FDX および FDR の精製

100 mL の培養液から大腸菌を回収し、結合バッファーに懸濁した後、超音波破碎により菌体を破碎した。遠心することにより無細胞抽出液を取得し、ニッケルアフィニティークロマトグラフィー樹脂を加え、タンパク質を吸着させた。洗浄バッファーを用いて樹脂を洗浄後、溶出バッファーを用いて FDX および FDR を溶出させた。タンパク質精製の確認は、Tricine-SDS-PAGE により行った。

(4) FDX および FDR の分析

FDX および FDR が活性を保持しているか推定するため、分光光度計を用いて、260 ~ 600 nm の吸収スペクトルを測定した。

(5) *Pseudomonas putida* 由来プチダレドキシン (PDX) および PDX 還元酵素 (PDR) 発現大腸菌の作製

PDX および FDR をコードする遺伝子について、大腸菌のコドンに最適化した人工遺伝子を合成し、それらを pUCFa ベクターに組み込んだプラスミドを構築した。構築したプラスミドから、制限酵素消化によりそれぞれの遺伝子を切り出し、発現ベクター-pET-21a(+)に挿入することにより、各遺伝子の発現用プラスミドを構築した。構築した発現プラスミドを大腸菌 BL21(DE3)株に導入することにより、PDX および PDR 発現大腸菌を作製した。

(6) PDX および PDR の発現

PDX および PDR の発現は、Overnight Express Autoinduction System 1 を用いて、自動誘導により行った。培養は、OD₆₀₀ が 1.0 になるまで 28 で行い、その後、18 にて 24 時間培養した。タンパク質発現の確認は、Tricine-SDS-PAGE により行った。

4. 研究成果

(1) D-CS 生産菌における DcsA の電子伝達系の同定

D-CS 生産菌由来のフェレドキシン (FDX) をコードする遺伝子 (*sla_0278*, *sla_0641*, *sla_0828*, *sla_1644*, *sla_2106*, *sla_5080*, *sla_5828*)、および、FDX 還元酵素 (FDR) をコードする遺伝子 (*sla_0456*, *sla_5644*) について、大腸菌のコドンに最適化した遺伝子を用いて大腸菌における発現を試みた。その結果、FDX では 3 種 (*Sla_0278*, *Sla_2106*, *Sla_5080*)、FDR では 2 種 (*Sla_0456*, *Sla_5644*) が可溶性のタンパク質として発現することが明らかになった。そこで、5 種のタンパク質について、ニッケルアフィニティークロマトグラフィーによる精製を行った結果、全てのタンパク質をほぼ単一タンパク質として取得することができた。精製したタンパク質について、活性を保持しているか否か調査するため、吸収スペクトルの測定を行った。その結果、FDX については、*Sla_0278* および *Sla_5080* において、鉄 硫黄クラスターを保有するタンパク質に特徴的なスペクトルが観測され、これらは活性を保持しているものと考えられた。*Sla_2106* については、特徴的なスペクトルは観測されず、活性を保持していないものと考えられた。一方、FDR については、*Sla_0456* および *Sla_5644* とともに、フラビントタンパク質に特徴的なスペクトルは観測されず、これらは活性を保持していないものと考えられた。これらの結果から、D-CS 生産菌由来の DcsA の電子伝達系を同定するのは困難になったため、*Pseudomonas putida* 由来の PDX および PDR を電子伝達系として利用する研究方針に変更した。

(2) PDX および PDR の大腸菌における発現

PDX および FDR をコードする遺伝子 (*pdx*, *pdr*) について、大腸菌のコドンに最適化した遺伝子を用いて大腸菌における発現を試みた。その結果、両タンパク質ともに可溶性のタンパク質として発現することが明らかになった。

以上の成果から、目的(1)を達成するには至らなかった。そのため、目的(2)および(3)を達成するための研究は実施できなかった。

< 引用文献 >

Kumagai, T., Koyama, Y., Oda, K., Noda, M., Matoba, Y., and Sugiyama, M., Molecular cloning and heterologous expression of a biosynthetic gene cluster for the antitubercular agent D-cycloserine produced by *Streptomyces lavendulae*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 2010, 1132-1139.

Kumagai, T., Takagi, K., Koyama, Y., Matoba, Y., Oda, K., Noda, M., and Sugiyama, M., Heme protein

and hydroxyarginase necessary for biosynthesis of D-cycloserine, *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2012, 3682-3689.

Uda, N., Matoba, Y., Kumagai, T., Oda, K., Noda, M., and Sugiyama, M., Establishment of an *in vitro* D-cycloserine-synthesizing system by using *O*-ureido-L-serine synthase and D-cycloserine synthetase found in the biosynthetic pathway, *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2013, 2603-2612.

Uda, N., Matoba, Y., Oda, K., Kumagai, T., and Sugiyama, M., The structural and mutational analyses of *O*-ureido-L-serine synthase necessary for D-cycloserine biosynthesis, *FEBS J.* 282, 2015, 3929-3944.

Kumagai, T., Ozawa, T., Tanimoto, M., Noda, M., Matoba, Y., and Sugiyama, M., High level heterologous production of D-cycloserine by *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 2015, 7881-7887.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yasuda, N., Fujita, T., Fujioka, T., Tagawa, M., Kohira, N., Torimaru, K., Shiota, S., Kumagai, T., Morita, D., Ogawa, W., Tsuchiya, T., and Kuroda, T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Effects of the order of exposure to antimicrobials on the incidence of multidrug-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 8826
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-35256-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Noda, M., Kumagai, T., Yamaoka, M., Danshiitsoodol, N., and Sugiyama, M.	4. 巻 46
2. 論文標題 Construction of a temperature-sensitive shuttle vector between lactic acid bacteria and <i>Escherichia coli</i> and its application to a Tn10-based random mutagenesis tool in lactic acid bacteria	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 840-847
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b23-00164	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Morita, D., Arai, H., Isobe, J., Maenishi, E., Kumagai, T., Maruyama, F., and Kuroda, T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Whole-genome and plasmid comparative analysis of <i>Campylobacter jejuni</i> from human patients Toyama, Japan, from 2015 to 2019	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiol. Spectr.	6. 最初と最後の頁 e02659-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/spectrum.02659-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nishimura, S., Nakamura, K., Yamamoto, M., Morita, D., Kuroda, T., Kumagai, T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Genome sequence-guided finding of lucensomycin production by <i>Streptomyces achromogenes</i> subsp. <i>streptozoticus</i> NBRC14001	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms10010037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

[学会発表] 計24件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 森田 大地, Asish K. Mukhopadhyay, Goutam Chowdhury, 丸山 史人, 神田 美幸, 山本 佑樹, 田原 栄俊, 熊谷 孝則, 大野 歩, 北原 圭, 三好 伸一, Shanta Dutta, 黒田 照夫
2. 発表標題 インド・コルカタ市におけるCampylobacter症原因菌の全ゲノム解析
3. 学会等名 第35回微生物シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩見 巧真, 森田 大地, 黒田 照夫, 熊谷 孝則
2. 発表標題 希少放線菌Actinoplanes nipponensis NBRC14063のゲノム解析
3. 学会等名 2023年度日本放線菌学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 盛井 順風, 森田 大地, 黒田 照夫, 熊谷 孝則
2. 発表標題 希少放線菌Kitasatospora cystarginea NBRC14836 のゲノム解析
3. 学会等名 2023年度日本放線菌学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩見 巧真, 森田 大地, 黒田 照夫, 熊谷 孝則
2. 発表標題 Actinoplanes nipponensis NBRC14063のゲノム解析
3. 学会等名 第62回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 盛井 順風, 森田 大地, 黒田 照夫, 熊谷 孝則
2. 発表標題 Kitasatospora cystarginea NBRC14836 のゲノム解析
3. 学会等名 第62回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森田 大地, Asish K. Mukhopadhyay, Goutam Chowdhury, 磯部 順子, 前西 絵美, 山本 美和子, 丸山 史人, 神田 美幸, 山本 佑樹, 田原 栄俊, 熊谷 孝則, 大野 歩, 北原 圭, 三好 伸一, Shanta Dutta, 黒田 照夫
2. 発表標題 インドコルカタ市および日本のヒト患者由来ETECの比較ゲノム解析
3. 学会等名 第62回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 百留 孝士郎, 谷重 萌, 安岡 里帆, 近藤 有馬, 森田 大地, 小川 和加野, 熊谷 孝則, 黒田 照夫
2. 発表標題 Serratia marcescensにおける2成分制御系SarRSを介した消毒薬耐性機構の解析
3. 学会等名 第76回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩見 巧真, 森田 大地, 黒田 照夫, 熊谷 孝則
2. 発表標題 希少放線菌NBRC14063株における酸性ペプチド生合成遺伝子クラスターの解析
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 森田 大地, 加藤 悠真, Asish K Mukhopadhyay, Goutam Chowdhury, 丸山 史人, 山本 佑樹, 田原 栄俊, 熊谷 孝則, 大野 歩, 北原 圭, 三好 伸一, Shanta Dutta, 黒田 照夫
2. 発表標題 インドコルカタ市におけるヒト患者由来Shigella spp.の比較ゲノム解析
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 近藤 永遠, 森田 大地, 黒田 照夫, 熊谷 孝則
2. 発表標題 Actinoplanes属放線菌NBRC14279株のゲノム解読
3. 学会等名 第34回微生物シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村 祥, 中村 和音, 山本 美也子, 森田 大地, 黒田 照夫, 熊谷 孝則
2. 発表標題 ゲノム配列が導いたStreptomyces属放線菌NBRC14001株による lucensomycin生産の発見
3. 学会等名 2022年度日本放線菌学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 和木坂 樹, 烏丸 顕正, 森田 大地, 熊谷 孝則, 丸山 史人, 黒田 照夫
2. 発表標題 緑膿菌のフルオロキノロン系抗菌薬耐性機構の嗜好性及びMexXYの発現調節に関する遺伝子変異の解析
3. 学会等名 第75回日本細菌学会中四国支部総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村 祥, 中村 和音, 山本 美也子, 森田 大地, 黒田 照夫, 熊谷 孝則
2. 発表標題 Streptomyces属放線菌NBRC14001株はlucensomycinを生産する - ゲノムマイニングによる発見 -
3. 学会等名 第74回日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 熊谷 孝則, 西村 祥, 中村 和音, 山本 美也子, 森田 大地, 黒田 照夫
2. 発表標題 ゲノム解析が顕在化したStreptomyces属放線菌NBRC14001株による lucensomycin生産
3. 学会等名 第61回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田 大地, 荒井 大樹, 磯部 順子, 前西 絵美, 熊谷 孝則, 丸山 史人, 黒田照夫
2. 発表標題 ヒト患者由来Campylobacter jejuniの比較ゲノム解析とプラスミドの多様性
3. 学会等名 第61回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Morita, D., Isobe, J., Maenshi, E., Kumagai, T., Yamamoto, Y., Kanda, M., Kamikawa, Y., Tahara, H., Kitahara, K., Miyoshi, S., Choudhury, G., Mukhopadhyay, A. K., Dutta, S., Maruyama, F., Kuroda, T.
2. 発表標題 Genetic diversity of Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) and Campylobacter in India and Japan
3. 学会等名 16th Asian Conference of Diarrhoeal Disease and Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田 大地, 武田 明佳, 山本 美和子, 神田 美幸, 山本 佑樹, 熊谷 孝則, 田原 栄俊, 丸山 史人, 黒田 照夫
2. 発表標題 完全長配列を用いたEnterotoxigenic Escherichia coliの比較ゲノム解析と新規病原プラスミドの発見
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 近藤 永遠, 山腰 祐也, 森田 大地, 黒田 照夫, 熊谷 孝則
2. 発表標題 Actinoplanes属放線菌NBRC14279株における二次代謝産物生成遺伝子クラスターの解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷重 萌, 安岡 里帆, 近藤 有馬, 百留 孝士郎, 森田 大地, 小川 和加野, 熊谷 孝則, 黒田 照夫
2. 発表標題 Serratia marcescensにおける2成分制御系SarRSを介した消毒薬耐性機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 近藤 永遠, 森田 大地, 黒田 照夫, 熊谷 孝則
2. 発表標題 希少放線菌Actinoplanes awajinensis NBRC14279のゲノム解析
3. 学会等名 2021年度日本放線菌学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤 永遠, 森田 大地, 黒田 照夫, 熊谷 孝則
2. 発表標題 Actinoplanes属放線菌NBRC14279株のゲノム解析
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 熊谷 孝則, 近藤 永遠, 森田 大地, 黒田 照夫
2. 発表標題 Actinoplanes awajinensis subsp. mycoplanecinus NBRC14279のゲノム解析
3. 学会等名 第60回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村 祥, 中村 和音, 森田 大地, 黒田 照夫, 熊谷 孝則
2. 発表標題 ゲノムマイニングに基づいたStreptomyces属放線菌NBRC14001株によるIucensomycin生産の顕在化
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒井 大樹, 森田 大地, 磯部 順子, 前西 絵美, 熊谷 孝則, 丸山 史人, 黒田 照夫
2. 発表標題 ヒト患者由来Campylobacter jejuniの薬剤感受性とレジストーム解析
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022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
---------	---------