

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660088

研究課題名(和文)ポルフィリン合成を標的とした抗マラリア薬の開発

研究課題名(英文)Development of anti-malarial drugs targeting porphyrin biosynthesis

研究代表者

和地 正明(Wachi, Masaaki)

東京工業大学・生命理工学研究科・教授

研究者番号：90192822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アラレマイシンをリード化合物として19種類の誘導体を合成した。大腸菌hemB欠損株を宿主として、マラリア原虫を含む様々な生物種由来のPBGSの異種発現系を構築した。構築した株を用いてアラレマイシンおよび誘導体の感受性を調べた結果、PBGSの由来によって感受性が異なることが判明した。

アラレマイシン生産菌のゲノム解析を行ったところ、2つのALA合成酵素ホモログの遺伝子hemAとALASが見出された。ALA要求性変異株の相補性試験により、hemAがALAの合成を担うことが明らかとなった。一方、ALASはその下流の3つの遺伝子とともにアラレマイシン生合成に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Nineteen derivatives were synthesized using alaremycin as a lead compound. Heterologous expression systems were constructed with an E. coli hemB disruptant and PBGS genes derived from various organisms including malaria parasite. It was shown that sensitivity to alaremycin as well as its derivatives differ among these PBGSs.

Two genes encoding ALA synthase homologs, hemA and ALAS, were found in the genome sequence of the alaremycin producer strain Streptomyces sp. A012304. It was shown that the hemA gene was responsible for ALA biosynthesis by complementation test of an E. coli ALA auxotrophic mutant. On the other hand, it was revealed that the ALAS gene was involved in the biosynthesis of alaremycin together with its downstream three genes.

研究分野：応用微生物学

キーワード：アラレマイシン 抗マラリア薬 ポルフィリン 5-アミノレブリン酸 ポルフォビリノーゲン合成酵素
hemA ALAS

1. 研究開始当初の背景

アラレマイシン (5-acetamido-4-oxo-5-hexenoic acid) は、ポルフィリン合成の前駆体である 5-アミノレプリン酸 (ALA) と類似の構造を有する抗生物質として発見された。ポルフィリン合成の初発反応は、2 分子の ALA がポルフォピリノーゲン合成酵素 (PBGS: HemB タンパク質) の作用により縮合しポルフォピリノーゲンとなる過程である。その構造からアラレマイシンは PBGS を阻害することが期待された。そこで、緑膿菌の PBGS に対するアラレマイシンの作用機構の解析を行った。アラレマイシンは、緑膿菌 PBGS を $K_i=1.3$ mM で阻害した。さらにアラレマイシンの阻害機構を明らかにするために、PBGS-アラレマイシン複合体の結晶構造解析を行った。その結果、アラレマイシンの 4 位のケトンと ALA 結合部位のひとつ P-部位の Lys-260 がシッフ塩基を形成し、7 位のケトンがもうひとつの ALA 結合部位である A-部位の Lys-205 と水素結合を形成していることが判明した。つまり、PBGS の 2 つの ALA 結合部位をアラレマイシンは 1 分子で効率的にブロックしていたのである。このような阻害様式をもつ PBGS 阻害剤はこれまでに知られておらず、非常にユニークな阻害剤であるといえる。好気呼吸を行なうすべての生物はポルフィリンを必要とすることから、様々な生物種に対するアラレマイシンの効果を調べたところ、これまでの予備的な解析ではアラレマイシンがマラリア原虫に有効であることが見出された。アラレマイシンは、既存の PBGS 阻害剤より 100 倍以上低濃度でマラリア原虫の増殖を阻害したことから、抗マラリア薬のリード化合物として期待された。

2. 研究の目的

土壌分離放線菌培養液から見出された新規抗生物質アラレマイシンはポルフィリン合成の初発段階を触媒する PBGS を特異的に阻害することが明らかとなった。ポルフィリン合成を標的とした抗生物質はこれまで開発されていないことから、新規標的を有する抗生物質開発のリード化合物となることが期待される。予備的な解析からマラリア原虫に対する効果が高いことが判明したため、本研究ではアラレマイシンをリード化合物とした抗マラリア薬の開発の可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PBGS-アラレマイシン複合体の結晶構造をもとに *in silico* ドッキング解析により、高い阻害効果の期待できるアラレマイシン誘導体を設計する。例えば、C7 のケトンと Lys205 との距離を近づけることによってシッフ塩基を形成できるようにする。アラレマイシンのアセチル基の周りに空間的な余裕が認められるので、この部位の変換の効果を調べる。C5=C6 と酵素との相互作用が見られ

ないのでこの部位の変換も試みる。有望な化合物については結晶構造解析を行う。

(2) 大腸菌の PBGS をマラリア原虫の PBGS に置換した株を構築し、合成した誘導体の感受性を調べる。

(3) アラレマイシン生産株のゲノムシーケンシングを行ない、PBGS 遺伝子を同定する。本菌の PBGS がアラレマイシンに耐性を示すメカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

(1) アラレマイシンをリード化合物として 19 種類の誘導体を合成した。*Pseudomonas putida* 由来のポルフォピリノーゲン合成酵素 (PBGS) に対する *in vitro* の阻害活性を調べたところ、アラレマイシンより 10~100 倍程度阻害活性が上昇したものが得られた。

(2) マラリア原虫の PBGS に対するアラレマイシンの阻害効果を簡便に検定できるようにするために、大腸菌の PBGS をコードする遺伝子 (*hemB*) をマラリア原虫の PBGS 遺伝子に置換した株を構築した。 λ red 相同組換え系を用いて、大腸菌の *hemB* 遺伝子を欠失させ、マラリア原虫 PBGS 遺伝子の発現プラスミドを導入した。マラリア原虫由来の PBGS 遺伝子は、*hemB* 欠失株の増殖を回復させたことから、大腸菌細胞の中で発現し機能していると思われた。同様に、様々な生物種由来の PBGS を *hemB* 欠損株で発現させた。構築した株を用いて、合成した誘導体の阻害活性をアッセイした結果、PBGS の由来によってアラレマイシンおよびその誘導体に対する感受性が異なることが明らかとなった。

(3) アラレマイシン生産菌である *Streptomyces* sp. A012304 株はアラレマイシンに耐性を示すことが分かっている。そこで A012304 株から標的酵素をコードする *hemB* 遺伝子のクローニングを行った。近縁の *Streptomyces* 属細菌 3 種の配列をもとにプライマーを設計し、*hemB* 遺伝子部分断片を増幅した。これをもとに周辺領域を増幅して *hemB* 遺伝子全長を得ることに成功した。得られた *hemB* 遺伝子の配列を決定したところ、A012304 株に特有のアミノ酸置換が 6 ヶ所に認められた。コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* を宿主として、生産菌 PBGS の精製に成功した。精製酵素を用いてアラレマイシン感受性を調べたところ、生産菌 PBGS は感受性菌の PBGS に比べて約 10 倍アラレマイシンに耐性であることが判明した。

(4) アラレマイシン生産菌 *Streptomyces* sp. A012304 株のゲノム解析をしたところ、ALA 合成酵素ホモログが 2 つ見出された。一つは細菌型の *hemB* 遺伝子であり、もう一つは動物型の ALAS 遺伝子である。ALA 要求性変異株の相補性試験から *hemA* が ALA の生合成を行っていることが明らかとなった。一方、大腸菌で異種発現系により ALAS は下流の 3 つの遺伝子とともにアラレマイシンの生合成に

関与していることが明らかとなった。

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 5 件)

Yamashita C, Hashimoto K, Kumagai K, Maeda T, Takada A, Yabe I, Kawasaki H, Wachi M. L-Glutamate secretion by the N-terminal domain of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 mechanosensitive channel. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2013, 77:1008-1013. 査読有
doi:10.1271/bbb.120988

Supkulsutra T, Maeda T, Kumagai K, Wachi M. A role of the transcriptional regulator LldR (NCgl2814) in glutamate metabolism under biotin-limited conditions in *Corynebacterium glutamicum*. *J Gen Appl Microbiol.* 2013, 59:207-214. 査読有
doi:10.2323/jgam.59.207

Ito K, Hamasaki K, Kayamori A, Nguyen PA, Amagai K, Wachi M. A secondary structure in the 5' untranslated region of *adhE* mRNA required for RNase G-dependent regulation. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2013, 77:2473-2479. 査読有
doi:10.1271/bbb.130618

Yano K, Wachi M, Tsuchida S, Kitazume T, Iwai N. Degradation of benzotrifluoride via the dioxygenase pathway in *Rhodococcus* sp. 065240. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2015, 79:496-504. 査読有
doi: 10.1080/09168451.2014.982502.

Fang MY, Zhang C, Yang S, Cui JY, Jiang PX, Lou K, Wachi M, Xing XH. High crude violacein production from glucose by *Escherichia coli* engineered with interactive control of tryptophan pathway and violacein biosynthetic pathway. *Microb Cell Fact.* 2015, 14:8. 査読有
doi: 10.1186/s12934-015-0192-x.

〔学会発表〕(計 8 件)

Wachi M, Yamashita C. Role of NCgl1221 mechanosensitive channel in glutamate production in *Corynebacterium glutamicum*. 12th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms (June 23-28, 2013, Cancun, México)

Takada A, Wachi M. Screening of inhibitors of Hfq-mediated RNA metabolism. 12th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms (June 23-28, 2013, Cancun, México)

矢野寛明、岩井伯隆、和地正明、大腸菌 *hemB* 欠損株を宿主とした PBGS 異種発現によるアラレマイシン感受性の評価系の構築、第 65 回日本生物工学会大会 (2013 年 9 月 18 日 - 20 日、広島)

森ひかる、岩井伯隆、和地正明、アラレマイシン生産菌 *Streptomyces* sp. A012304 株の 2 つの ALA 生合成酵素ホモログの解析、第 9 回日本ゲノム微生物学会年会 (2015 年 3 月 6 日 - 8 日、神戸)

岩井伯隆、森ひかる、和地正明、アラレマイシン生産菌 *Streptomyces* sp. A012304 株の 2 種類の 5-アイノレブリン酸合成遺伝子の解析、日本農芸化学会 2015 年度大会 (2015 年 3 月 26 日 - 29 日、岡山)

Wachi M. Treasure hunting: Screening of antibiotics with a new target of action. 56th International Symposium of the Korean Society of Life Science (Aug. 27-28, 2015, Changwon, Korea)

森ひかる、岩井伯隆、和地正明、アラレマイシンの生合成経路、日本農芸化学会 2016 年度大会 (2016 年 3 月 28 日 - 30 日、札幌)

上田沙蘭、岩井伯隆、和地正明、アラレマイシン生産菌 *Streptomyces* sp. A012304 株のポルフォビリノーゲン合成酵素の特性、日本農芸化学会 2016 年度大会 (2016 年 3 月 28 日 - 30 日、札幌)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和地 正明 (WACHI, Masaaki)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
教授
研究者番号：90192822

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：