

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22790068

研究課題名（和文）

抗結核薬生合成遺伝子の発見—抗結核薬の大量生産系の確立と抗癌剤生産への応用—

研究課題名（英文）

Discovery of a biosynthetic gene cluster for an anti-tubercular agent — its application for the establishment of overproduction system for the anti-tubercular agent and the production of anti-cancer drug—

研究代表者

熊谷 孝則（TAKANORI KUMAGAI）

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：70274058

研究成果の概要（和文）：本研究では、抗結核薬 D-サイクロセリン（DCS）の生産菌 *Streptomyces lavendulae* ATCC11924 からクローニングした DCS 生合成遺伝子クラスター（*dcsA*～*dcsJ*）について、遺伝子破壊実験を行うことにより、DCS 生合成経路を明らかにした。また、DCS 生合成に必要な遺伝子を実験室大腸菌に移植することにより、大腸菌における DCS 生産系を確立した。さらに、DCS 生合成に関与する新規ヘムタンパク質 DcsA を見出した。

研究成果の概要（英文）：In the present study, the biosynthetic pathway for the anti-tubercular agent, D-cycloserine (DCS), was elucidated by the gene disruption analysis of the DCS biosynthetic gene cluster in a DCS-producing *Streptomyces lavendulae* ATCC11924. In addition, DCS production system in *Escherichia (E.) coli* was established by introducing the DCS biosynthetic genes into *E. coli*. Furthermore, DcsA was found to be a novel heme protein involved in the biosynthesis of DCS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：抗結核薬, D-サイクロセリン, 生合成, 異種発現, 放線菌

1. 研究開始当初の背景

D-サイクロセリン（DCS）は、*Streptomyces (S.) lavendulae* 等の放線菌により生産される分子量 102 の抗生物質であり、抗結核薬として使用される。DCS の構造は極めてシンプルであるにも関わらず、その生合成遺伝子はクロ

ーニングされていなかった。私は、DCS 生合成遺伝子は DCS 自己耐性遺伝子の近傍に存在するのではないかと仮説を立て、DCS 生産菌 *S. lavendulae* ATCC11924 のゲノムライブラリーから、自己耐性遺伝子を含む約 21-kb の遺伝子断片をクローニングした。遺伝子解析の結

果、約 21-kb の遺伝子断片は 22 個の遺伝子を含んでおり、そのうち全て同方向に転写される 10 個の遺伝子から成るクラスターが、DCS の生合成に関与すると考えられ、これら遺伝子を *dcsA*~*dcsJ* と命名した。*dcsA*~*dcsJ* 遺伝子を DCS 非生産放線菌株である *S. lividans* 66 に導入し、異種発現を試みた結果、*dcsA*~*dcsJ* 遺伝子が導入された *S. lividans* 66 は、DCS の生産能を獲得した。以上の結果から、DCS 生合成遺伝子のクローニングに初めて成功した。DCS 生合成遺伝子クラスターを発見することができたため、私は、過去の DCS 生合成に関する知見を考慮し、DCS の生合成経路を推定した (図 1)。

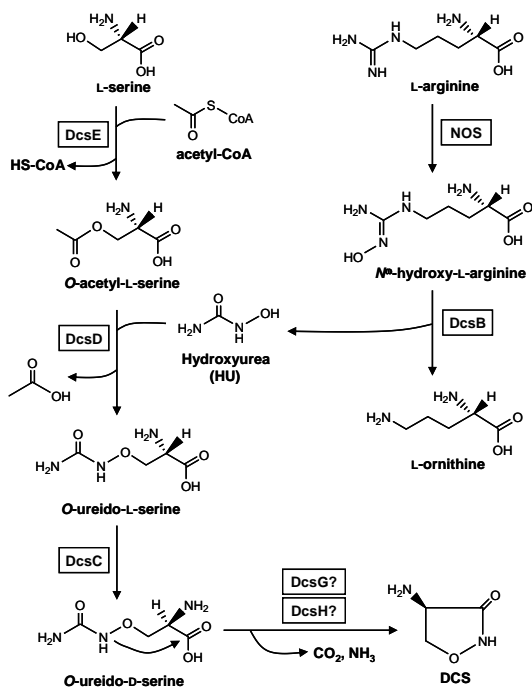


図 1 DCS の推定生合成経路

2. 研究の目的

(1) *dcsA*~*dcsJ* 遺伝子をそれぞれ破壊した *S. lavendulae* ATCC11924 の変異株を作製し、それらの DCS 生産能を調べることで、DCS 合成に必須の遺伝子を明らかにするとともに、推定した生合成経路が正しいことを証明する。

(2) DCS の生合成原料であるヒドロキシ尿素 (HU) の供給経路で機能するであろう一酸化窒素合成酵素 (NOS) をコードする遺伝子は、*dcsA*~*dcsJ* の中には含まれていなかったことから、NOS をコードする遺伝子をクローニングするとともに、その遺伝子破壊株を作製す

ることで、DCS 合成に必須の遺伝子であることを明らかにする。

(3) DCS は比較的少ない遺伝子により合成されることから、生合成に必要な全遺伝子を扱いが容易な宿主大腸菌に移植することが可能であると考えられる。そこで、DCS 生合成に必要な各遺伝子をタンデムに連結した発現ベクターを構築後、大腸菌に導入し、大腸菌を宿主とした DCS の大量生産系を開発する。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子破壊株の作製

遺伝子破壊株の作製は、染色体 DNA との 2 回相同組換えを利用した in frame deletion 法により行った。遺伝子破壊ベクターとしては、pKC1132 を用いた。遺伝子破壊株の確認は、サザン解析あるいは PCR 法により行った。

(2) 遺伝子破壊株の相補実験

遺伝子破壊株への遺伝子相補実験は、チオストレプトンで誘導可能なプロモーター *tipA* を保有するベクター pIJ8600 を用いて行った。

(3) NOS 遺伝子のクローニング

NOS をコードする遺伝子 (*nos*) のクローニングにおいては、まず、degenerate PCR により *nos* の内部配列を増幅した。続いて、得られた断片をプローブとして、ATCC11924 株のゲノムライブラリーから、*nos* の全長を含む DNA 断片を取得した。

(4) DCS の検出

培地中に生産された DCS の検出は、陽イオン交換カラムを用いた HPLC により行った。

(5) 組換えタンパク質の発現と精製

組換えタンパク質の生産は大腸菌を宿主として、発現ベクター pET-21a(+)あるいは pET-28a(+)を用いて行った。その際、組換えタンパク質は、ヒスチジンタグ付きタンパク質として発現させた。組換えタンパク質の精製は、ニッケルアフィニティークロマトグラフィーにより行った。

(6) DCS 生産用ベクターの構築と大腸菌における DCS 生産

DCS 生産用ベクターの構築は、XbaI/SpeI カ

セット法により行った。この方法により, *dcsE*, *dcsD*, *dcsC* および *dcsG* をタンデムに連結したベクターを構築した。なお, これら遺伝子は, T7 プロモーターの支配下に置いた。

大腸菌における DCS の生産は, DCS 生産用ベクターを BL21(DE3)株に導入し, 得られた形質転換体を培養することにより行った。

4. 研究成果

(1) 遺伝子破壊および組換えタンパク質を用いた DCS 生合成経路の解明

①*dcsB*

dcsB 破壊株は, DCS 生産能を喪失した。また, *dcsB* 破壊株への *dcsB* の相補は, DCS 生産能を回復させた。これらの結果から, *dcsB* は DCS の生合成に必須であることが明らかになった。さらに, *dcsB* 破壊株への HU の添加は, DCS 生産能を回復させるとともに, 組換え DcsB タンパク質は, 試験管内において, 水酸化アルギニンを加水分解し, HU とオルニチンを生成させることが明らかになった。以上の結果から, DcsB は DCS 生合成において, 水酸化アルギニンを加水分解し, HU を供給するタンパク質であることを示すことができた。

②*dcsC*

dcsC 破壊株は, DCS 生産能を喪失した。また, *dcsC* 破壊株への *dcsC* の相補は, DCS 生産能を回復させた。これらの結果から, *dcsC* は DCS の生合成に必須であることが明らかになった。さらに, 組換え DcsC タンパク質は, 試験管内において, *O*-ウレイドセリンのラセミ化を触媒することが明らかになった。以上の結果から, DcsC は DCS 生合成において, *O*-ウレイドセリンをラセミ化し, *O*-ウレイド-D-セリンを供給するタンパク質であることを示すことができた。

③*dcsD*

dcsD 破壊株は, DCS 生産能を喪失した。この結果から, *dcsD* は DCS の生合成に必須であることが明らかになった。さらに, *dcsD* 破壊株の無細胞抽出液に *O*-ウレイド-L-セリンを添加すると, DCS の合成が認められた。さらに, 組換え DcsD タンパク質は, 試験管内において, *O*-アセチルセリンと HU から *O*-ウレイド-L-セリンを生成する反応を触媒した。以上の結果から, DcsD は DCS 生合成において,

O-アセチルセリンと HU から *O*-ウレイド-L-セリンを生成する反応を触媒するタンパク質であることを示すことができた。

④*dcsE*

dcsE 破壊株は, DCS 生産能を喪失した。この結果から, *dcsE* は DCS の生合成に必須であることが明らかになった。さらに, *dcsE* 破壊株への *O*-アセチルセリンの添加は, DCS 生産能を回復させるとともに, 組換え DcsE タンパク質は, 試験管内において, L-セリンをアセチル化する反応を触媒した。以上の結果から, DcsE は DCS 生合成において, *O*-アセチルセリンを供給するタンパク質であることを示すことができた。

⑤*dcsF*

dcsF 破壊株は, 野生株と同等の DCS を生産した。この結果から, DcsF は DCS の生合成に関与しないことが明らかになった。

⑥*dcsG*

dcsG 破壊株は, DCS 生産能を喪失した。また, *dcsG* 破壊株への *dcsG* の相補は, DCS 生産能を回復させた。これらの結果から, *dcsG* は DCS の生合成に必須であることが明らかになった。さらに, 組換え DcsG タンパク質は, 試験管内において, ATP とマグネシウムイオンの存在下, *O*-ウレイド-D-セリンから DCS を生成する反応を触媒した。以上の結果から, DcsG は DCS 生合成において, *O*-ウレイド-D-セリンを環状化し, DCS を生成させるタンパク質であることを示すことができた。

⑦*dcsH*

dcsH 破壊株は, 野生株と同等の DCS を生産した。この結果から, DcsH は DCS の生合成に関与しないことが明らかになった。

(2) NOS 遺伝子 (*nos*) のクローニングとその遺伝子破壊

HU の供給経路において, 水酸化アルギニンの生成に関与すると推測した NOS をコードする遺伝子 (*nos*) は, DCS 生合成遺伝子クラスターに存在していない。そこで, ATCC11924 株の染色体 DNA から, degenerate PCR とそれに続くライブラリースクリーニングにより, *nos* をクローニングした。クローニングした ATCC11924 株の NOS は, 他の放

線菌由来の NOS と高い相同性を有しており、オキシゲナーゼドメインのみから成っていた。*nos* の遺伝子破壊を行った結果、予想に反して、*nos* 破壊株は野生株と同等の DCS を生産していた。この結果から、NOS は DCS 生合成に関与しないことが明らかになった。

(3) 水酸化アルギニンの供給に関与する遺伝子の同定

上記の研究結果から、DCS 生合成において、NOS は水酸化アルギニンの供給に関与しないことが明らかになった。そこで、DCS 生合成遺伝子クラスターに存在し、その機能が推測できなかった *dcsA* の遺伝子破壊を行った。その結果、*dcsA* 破壊株は、DCS 生産能を喪失した。また、*dcsA* 破壊株への *dcsA* の相補は、DCS 生産能を回復させた。これらの結果から、*dcsA* は DCS の生合成に必須であることが明らかになった。さらに、*dcsA* 破壊株への水酸化アルギニンの添加は、DCS 生産能を回復させた。以上の結果から、*DcsA* は DCS 生合成において、水酸化アルギニンの供給に関与するタンパク質であることが強く示唆された。

(4) 組換え *DcsA* の解析

大腸菌の宿主・ベクター系を用いて、*DcsA* をヒスチジンタグ付きタンパク質として発現させ、ニッケルアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。興味深いことに、精製直後のイミダゾール含有バッファー中において、*DcsA* タンパク質は赤黄色を呈していた。そこで、バッファー置換後、*DcsA* の吸収スペクトルを測定した結果、387 nm に最大ピークを認めた (図 2)。続いて、10 mM のジチオナイトを添加したところ、吸収スペクトルが変化し、402 nm に最大ピークが現れた (図 2)。さらに、ジチオナイト存在下で、CO ガスを吹き込んだところ、439 nm にシャープな最大ピークが現れた (図 2)。これらのスペクトルは、ヘムタンパク質に特徴的なものであることから、*DcsA* はヘムタンパク質であることが示唆された。この結果は、*DcsA* が L-アルギニンの水酸化を触媒するタンパク質であることを支持するものである。

(5) 大腸菌における DCS 生産

まず、構築した DCS 生産用ベクターを保有する大腸菌 BL21(DE3) 株を、Overnight Expression Autoinduction System1 (OnEx1) 試

薬 (GE Healthcare) を添加した培地で培養し、生産用ベクターに挿入した DCS 生合成遺伝子の発現性を SDS-PAGE により確認した。その結果、挿入した全ての遺伝子 (*dcsE*, *dcsD*, *dcsC* および *dcsG*) は発現していることが確かめられた。

そこで、同大腸菌株を用いて DCS の生産を試みた。OnEx1 試薬を含む培地で 24 時間培養後、基質である L-セリンおよび HU を添加し、さらに 12 時間培養することにより、DCS の生産を行った。HPLC 解析の結果、DCS が生産されていることが明らかになった。しかしながら、構築した大腸菌による DCS の生産量は、DCS 生産菌である *S. lavendulae* ATCC11924 の生産量の約 1/10 であった。

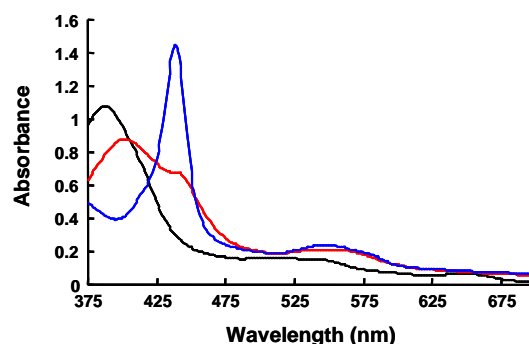


図 2 *DcsA* の吸収スペクトル

黒：静止型 赤：還元型 青：CO 結合型

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 4 件)

① Uda, N., Matoba, Y., Kumagai, T., Oda, K., Noda, M., and Sugiyama, M. (2013) 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.*, in press. 査読有

DOI: 10.1128/AAC.02291-12

② Oda, K., Matoba, Y., Kumagai, T., Noda, M., and Sugiyama, M. (2013) Crystallographic study to determine the substrate specificity on an L-serine-acetylating enzyme found in the D-cycloserine biosynthetic pathway. *J. Bacteriol.*

195, 1741-1749. 査読有
DOI: 10.1128/JB.02085-12

③ Kumagai, T., Takagi, K., Koyama, Y., Matoba, Y., Oda, K., Noda, M., and Sugiyama, M. (2012) Heme protein and hydroxyarginase necessary for biosynthesis of D-cycloserine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 3682-3689. 査読有
DOI: 10.1128/AAC.00614-12

④ Kumagai, T., Koyama, Y., Oda, K., Noda, M., Matoba, Y., and Sugiyama, M. (2010) Molecular cloning and heterologous expression of a biosynthetic gene cluster for the antitubercular agent D-cycloserine produced by *Streptomyces lavendulae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 1132-1139. 査読有
DOI: 10.1128/AAC.01226-09

[学会発表] (計 8 件)

①熊谷孝則, 高木紀抄, 的場康幸, 野田正文, 杉山政則: 抗結核薬 D-サイクロセリンの生合成に関与する DcsA タンパク質の機能解析 2012年度日本放線菌学会大会 2012年9月6日~7日 東京

②小田康祐, 的場康幸, 熊谷孝則, 野田正文, 杉山政則: D-サイクロセリン生合成に関わる L-セリン-O-アセチルトランスフェラーゼの基質特異性に関する構造生物学的研究 2012年度日本放線菌学会大会 2012年9月6日~7日 東京

③宇田成利, 的場康幸, 小田康祐, 野田正文, 熊谷孝則, 杉山政則: D-サイクロセリン生合成に関わる O-ウレイド L-セリン合成酵素の基質特異性に関する構造生物学的研究 2012年度日本放線菌学会大会 2012年9月6日~7日 東京

④Kumagai, T., Takagi, K., Noda, M., Oda, K., Matoba, Y., and Sugiyama, M. (2011) A hydroxylation reaction necessary in the biosynthesis of an antitubercular antibiotic D-cycloserine. IUMS2011, September 6-10, Sapporo, Japan.

⑤宇田成利, 的場康幸, 小田康祐, 野田正文,

熊谷孝則, 杉山政則: 生合成酵素を用いた D-サイクロセリンの試験管内合成 第 52 回日本生化学会中国・四国支部例会 2011年5月13日~14日 広島

⑥高木紀抄, 熊谷孝則, 小山佑介, 宇田成利, 小田康祐, 野田正文, 的場康幸, 杉山政則: D-サイクロセリン生合成遺伝子クラスターのクローニングとその機能解析 第 52 回日本生化学会中国・四国支部例会 2011年5月13日~14日 広島

⑦熊谷孝則, 小山佑介, 小田康祐, 野田正文, 的場康幸, 杉山政則: 遺伝子破壊を用いた D-サイクロセリン生合成遺伝子クラスターの機能解析 2010年度日本放線菌学会大会 2010年9月2日~3日 東京

⑧宇田成利, 的場康幸, 小田康祐, 野田正文, 熊谷孝則, 杉山政則: D-サイクロセリン生合成に関与する酵素群の機能解析 2010年度日本放線菌学会大会 2010年9月2日~3日 東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

熊谷 孝則 (TAKANORI KUMAGAI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号: 70274058

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: