

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H02895

研究課題名（和文）アミノグリコシド系抗生物質の生合成酵素構造解析を基盤とする新規物質生産系の開拓

研究課題名（英文）Structural analysis of aminoglycoside antibiotic biosynthetic enzymes

研究代表者

工藤 史貴（Kudo, Fumitaka）

東京工業大学・理学院・准教授

研究者番号：00361783

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：アミノグリコシド系抗生物質と構造類似性を有する（アミノ）サイクリトール含有天然物の生合成マシナリーを活用した新規物質生産系を開拓するために、カナマイシン、イスタマイシン、フチロシンなどの生合成酵素の機能構造解析を行なった。結果として、本抗生物質群を代表するカナマイシンAの生合成機構を、酵素の機能と構造を基に解明することができた。また、その他の生合成酵素の機能構造解析を進め、生合成中間体の糖部位のユニークな修飾機構や炭素環構築に関わる酵素の機能を解明することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アミノグリコシド系抗生物質は、結核菌に有効なストレプトマイシンや広範な抗菌スペクトルを示すカナマイシンなど、歴史的に人類の健康増進に大きく貢献してきた。腎毒性や聴覚神経毒性を示すなどの問題点を抱えた抗生物質であるが、半合成化合物も開発されており、今なお重要性の高い抗生物質群である。アミノグリコシド系抗生物質は放線菌などの微生物が生産することから、その合成機構を解明して人為的な改変を施すことで、有用性の高い物質を生産できる可能性がある。本研究では、代表格であるカナマイシンの合成機構について、その合成を司る酵素の機能と構造情報を精密に解析して、従来提唱されていた機構を訂正することができた。

研究成果の概要（英文）：Functional and structural analyses of the biosynthetic enzymes involved in the production of aminoglycoside antibiotics and related natural products containing (amino) cyclitols such as kanamycin, istamycin, and butirosin, have been conducted. As a result, the biosynthetic reaction mechanism of kanamycin A, a representative compound among aminoglycoside antibiotics, has been elucidated. Furthermore, through the functional and structural analyses of other biosynthetic enzymes, unique modification enzymes for sugar moieties in biosynthetic intermediates and enzymes responsible for the unique cyclitol formation have been identified.

研究分野：生物有機化学

キーワード：天然物化学 生合成 酵素 アミノグリコシド系抗生物質 ゲノムマイニング カナマイシン イスタマイシン

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 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アミノグリコシド系抗生物質は、特徴的なアミノサイクリトールに多種多様なデオキシアミノ糖が複数連結した抗生物質の総称である。放線菌代謝産物として単離されたカナマイシンやストレプトマイシンなどが有名であり、結核菌などの幅広い真正細菌に対して抗菌活性を示す。

アミノグリコシド系抗生物質の大多数は、特徴的なアミノサイクリトールとして 2-デオキシストレプタミン (2DOS) を有している (図 1)。2DOS の 4 位と 6 位水酸基がアミノ糖で配糖化された化合物は擬似三糖型のカナマイシン類として知られている。一方、2DOS の 4 位水酸基がアミノ糖、5 位水酸基がリボースで配糖化された化合物は擬似三糖型のリボスタマイシン類として知られている。また、リボスタマイシンのリボース部位の 3 位水酸基がアミノ糖で配糖化された化合物は擬似四糖型のネオマイシン類として知られている。

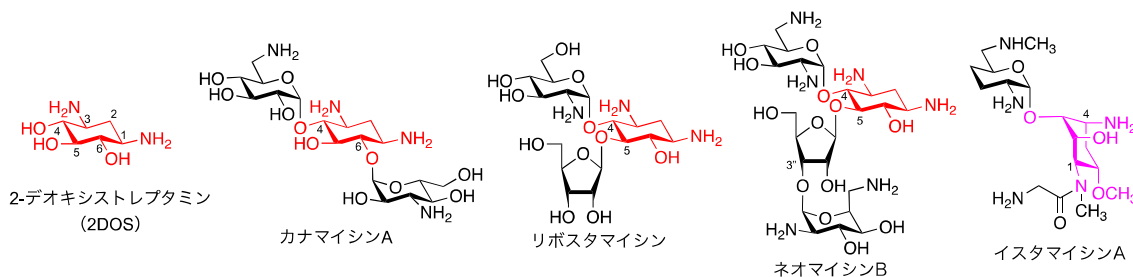


図 1 アミノグリコシド系抗生物質

申請者の研究グループでは 2DOS 合成機構を解明し、それを起点として、アミノグリコシド系抗生物質の全合成機構解明を目指し研究を行ってきた。そして、本研究課題時までには、ネオマイシン類に共通する合成酵素の機能を解明してきた (図 2)。すなわち、D-グルコース 6-リン酸から、2-デオキシ-*scyllo*-イノソース合成酵素により炭素六員環サイクリトールが生成し、これがアミノ基転移酵素と脱水素酵素により 2DOS へと変換される。2DOS は糖転移酵素により *N*-アセチルグルコサミニル化され、脱アセチル化酵素により擬似二糖型のパロマミンへと変換される。さらに、脱水素酵素とアミノ基転移酵素によりネアミンが生成される。ネアミンがリボシル化されるとリボスタマイシンとなる。リボスタマイシンは、さらにネオマイシン系擬似四糖型のアミノグリコシド抗生物質の合成に特徴的な糖転移酵素により *N*-アセチルグルコサミニル化される。そして、ネアミン生成時に用いられた脱アセチル化酵素、脱水素酵素、アミノ基転移酵素により同様に修飾されてネオマイシン C が生成される。最後に、ラジカル *S*-アデノシル L-メチオニン (SAM) 酵素スーパーファミリーに属する酵素により 5'''位がエピメリ化されることでネオマイシン B が生成する。

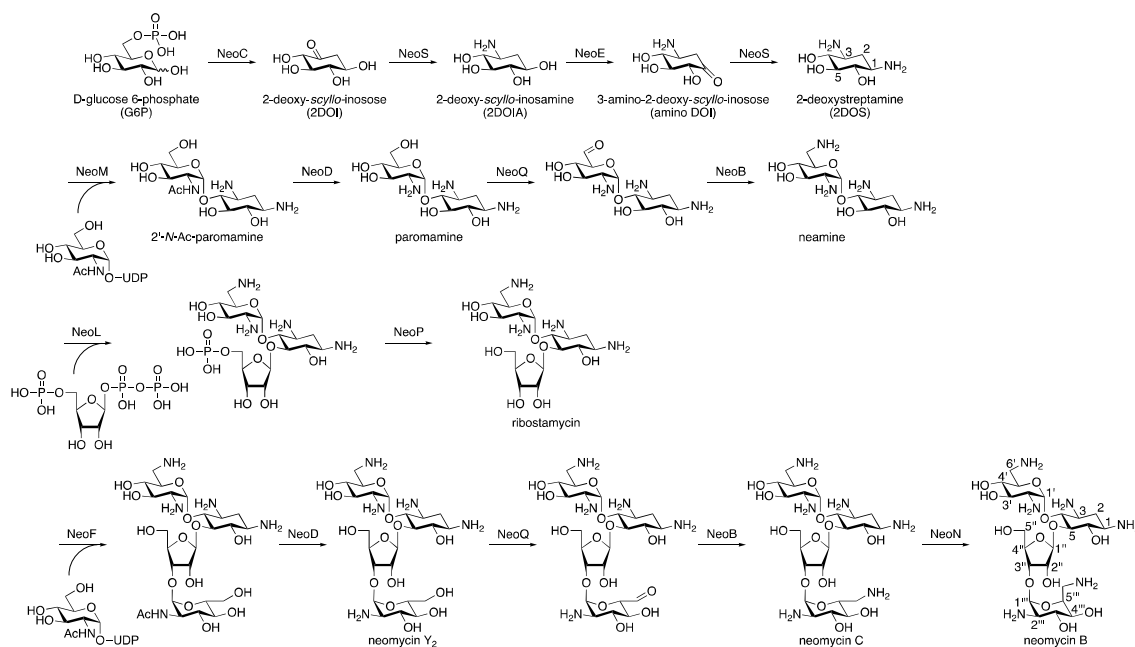


図 2 ネオマイシンBの合成機構

ネオマイシンの合成に関わる酵素活性を見出し、推定反応機構を提唱しているものの、これら酵素がどのように合成中間体を認識して反応を触媒しているかは不明であった。また、カナ

マイシンを含め、関連するアミノグリコシド系抗生物質の生合成機構については、生合成酵素の相同性に基づく機能推定に留まっており、実証には至っていなかった。また、関連する(アミノ)サイクリトール含有天然物の生合成酵素については機能解明されていないものが多かった。申請者は、これら生合成酵素や生合成マシナリーを活用することで、新規なアミノグリコシド系抗生物質を創出することを目指しており、それを達成するには、天然型の生合成酵素の機能と構造を明らかにする必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、多種多様なアミノグリコシド系抗生物質の生合成機構について、酵素の基質認識機構を含めたレベルで解明することを目的とした。また、関連する(アミノ)サイクリトール含有天然物の生合成酵素についても同様に、酵素機能構造解析を進めて、基質認識機構に関する情報を蓄積することにした。

- (1) まず、代表的なアミノグリコシド系抗生物質であるカナマイシンについて、提唱されている生合成機構を、*in vitro*にて酵素機能構造解析を行うことで実証することを試みた。
- (2) イスタマイシン類は、1,3-ジアミノサイクリトールである 2DOS とは異なり、1,4-ジアミノサイクリトールをコア構造に有するアミノグリコシド系抗生物質であり、アミノ基の導入機構の違いに興味を持たれた。生合成酵素の配列比較からだけでは、生合成経路の推定が曖昧であったので、*in vitro*で酵素機能構造解析を行うことで実証することを試みた。
- (3) アミノグリコシド系抗生物質の中には、生合成過程でデオキシ化されて構築されると考えられる化合物が知られている。イスタマイシン類に見られる 3',4'-ジデオキシ糖部位は、その一例である。デオキシ化されていると、アシル化、リン酸化、ヌクレオチジル化などのアミノグリコシド系抗生物質修飾酵素による修飾を受けないため、生合成中間体のデオキシ化は、耐性菌に有効な分子変換と考えられている。すなわち、微生物が有するデオキシ化機構を活用することで、耐性菌に有効なアミノグリコシドの創出に活用できると考えられた。そこで、デオキシ化に関わると推定された酵素の探索と機能解析を行うことにした。
- (4) 新たな関連分子創出の可能性を広げるため、アミノグリコシド系抗生物質以外の関連する(アミノ)サイクリトール含有天然物の生合成酵素の機能構造解析も行うことにした。

以上の生合成酵素の機能構造情報を蓄積することで、生合成酵素や生合成マシナリーを活用した新規アミノグリコシド抗生物質の創出につながることを期待して研究を行った。

## 3. 研究の方法

研究対象とする酵素は、大腸菌か放線菌にて異種発現させて組換えタンパク質として調製した。酵素機能構造解析に用いる基質は、これまでの研究で調製してきた化合物や入手可能な化合物を利用した。また、酵素反応生成物は、ジニトロフルオロベンゼンを用いてアミノ基をジニトロフェニル化して HPLC、および LC-ESI-MS 解析により解析した。アルデヒド中間体については、ジニトロフェニルヒドラジンをを用いてジニトロフェニルヒドラゾン化して、HPLC、および LC-ESI-MS 解析により解析した。さらに誘導体化していない生成物を、イオン交換クロマトグラフィーにより単離して、NMR 解析により化学構造を確認した。酵素反応生成物のうち、誘導体化不要な化合物や困難な化合物は、それぞれの化合物の性質に応じて分析した。

研究で取り扱った酵素については、全て結晶化を試み、単結晶が得られたものは X 線結晶構造解析した。基質認識機構を明らかにするため、基質や類縁体や生成物をリガンドとして共結晶化やソーキングによる複合体結晶構造解析も試みた。

さらに、酵素触媒反応に関わると予想されたアミノ酸残基を変異させて反応解析することで、詳細な反応機構を解明することにした。また、推定される酵素反応機構に応じて、重水置換した緩衝液中での酵素反応解析により、反応に関与すると考えられる水素原子の動きを追跡した。

## 4. 研究成果

- (1) まず、カナマイシン類に特徴的な 2DOS の 6 位水酸基に結合した 3-アミノグルコース(通称カノサミン)部位の構築機構の解明に取り組んだ。脱水素酵素 KanD2 とアミノ基糖転移酵素 KanS2 が関与することは推定されていたので、カナマイシン A, B, C が逆反応の基質となり得るか検討した。結果として、いずれもこれら酵素に認識されて 3'位のアミノ基が水酸基となった化合物に変換された。また、得られた 3"-デアミノ体はいずれも KanD2 によく認識されて脱水素化される一方で、グルコース、グルーコース 1-リン酸、グルコース 6-リン酸、UDP-グルコースなどは全く認識されなかった。すなわち、KanD2 は、擬似三糖基質を認識して脱水素化し、ついで KanS2 がアミノ基転移酵素反応を触媒することでカノサミン部位が構築されることが明らかとなった(図 3)。KanD2 については X 線結晶構造解析も行い、カナマイシン B との複合体の構造解析から、2DOS 部位と 2DOS の 6 位に結合したグルコース部位を厳密に認識しており、2DOS の 4 位に結合した糖部位については厳密に認識していなかった。

また、幾つかの推定基質を入手することができたので、6'位のアミノ基導入に関わると推定されていた脱水素酵素 KanQ とアミノ基糖転移酵素 KanB の機能解析を行なった。結果

として、KanQ/KanB も擬似三糖基質を認識し、中でも 3"位がアミノ化されたカナマイシン C が最も変換されやすいことが明らかとなった。

さらに、2'位のアミノ基の脱アミノ化に関わる 2-オキソグルタル酸依存非ヘム鉄酸化酵素 KanJ については基質特異性と X 線結晶構造解析を行なった。その結果、KanJ は 6'位にアミノ基を有する基質であれば比較的寛容に認識することが明らかとなった。

以上の結果をまとめると、カナマイシン A の生合成経路ではまず、パロマミンが糖転移酵素 KanM2 により配糖化を受けて 3"-デアミノカナマイシン C が生成し、ついで KanD2/KanS2 によりカナマイシン C が生成する。このように配糖化と 3"位にアミノ基が導入されてから KanQ/KanB が 6'位にアミノ基を導入する。最後に KanJ と還元酵素 KanK により 2'位のアミノ基が水酸基に変換されることで生合成されることが明らかとなった。カナマイシン A の生合成経路については、これまで複数の経路が並行して動いて最終産物に至ると提唱されていたが、in vitro での酵素機能解析を通じてそれを正すことができた。これにより、本研究課題で目指した最低限の成果は得られたと考えている。

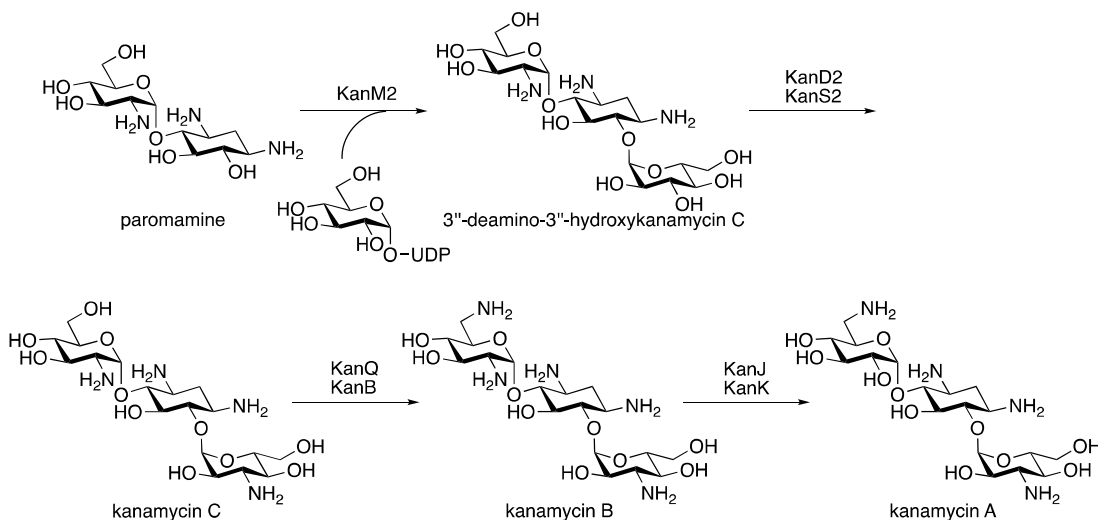


図3 カナマイシンAの生合成経路

- (2) イスタマイシン類の 1,4-ジアミノサイクリトールの 2 つ目のアミノ基は、1,3-ジアミノサイクリトールである 2DOS の生合成と同様に 2-デオキシ-scyllo-イノサミン (2DOIA) が脱水素化 / アミノ化されて生合成されるか、もしくは配糖化以降に脱水素化 / アミノ化されるか不明であった。イスタマイシン生産菌からモノアミノサイクリトールが配糖化された化合物が得られていることから、配糖化が先に起こると予想して in vitro で酵素機能解析を行った。結果として、2DOIA が配糖化される酵素活性を見出すことができた (図 4)。今後、機能構造解析を進めることで、サイクリトール部位のアミノ基導入機構について新たな知見が得られると考えている。

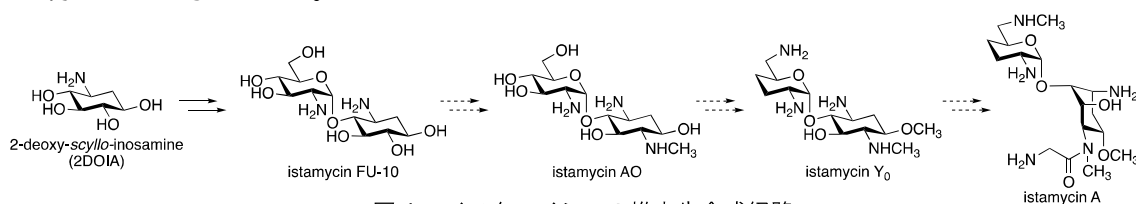


図4 イスタマイシンの推定生合成経路

- (3) デオキシ化されて生合成されると考えられる化合物は幾つか知られているが、本研究では、4'-デオキシプチロシン生合成における 4'-デオキシ化機構の解明に取り組んだ。結果として、ヌクレオチド転移酵素が生合成中間体の 4'位水酸基をアデニル化することが引き金となっていることを示唆することができた。さらに、フラビン依存還元酵素が還元してデオキシ化中間体が生成することを示唆することができた。
- (4) アミノグリコシド系抗生物質以外の関連する(アミノ)サイクリトール含有天然物として、アリステロマイシン、パクタマイシン、バクテリオホパンポリオールが生合成酵素の機能解析を行なった。

アリステロマイシン生合成に関しては、炭素 5 員環サイクリトール合成酵素 Ari2 の反応における立体化学を明らかにした (図 5)。また、Ari2 の結晶構造解析に基づき、相同タンパク質である myo-イノシトールリン酸合成酵素との類似点と相違点を見出すことができた。

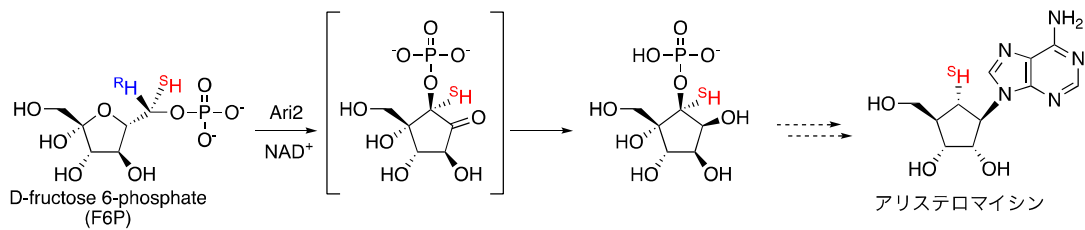


図5 アリステロマイシン生成におけるユニークなサイクリトールの形成機構

パクタマイシン生成に関しては、アデニル化酵素 PctU が選択的に 3-アミノ安息香酸を認識してアシルキャリアープロテイン PctK にロードすることを明らかにした(図6)。また生成した 3-アミノベンゾイル-PctK は、糖転移酵素 PctL により効率よく配糖化されることが明らかとなった。

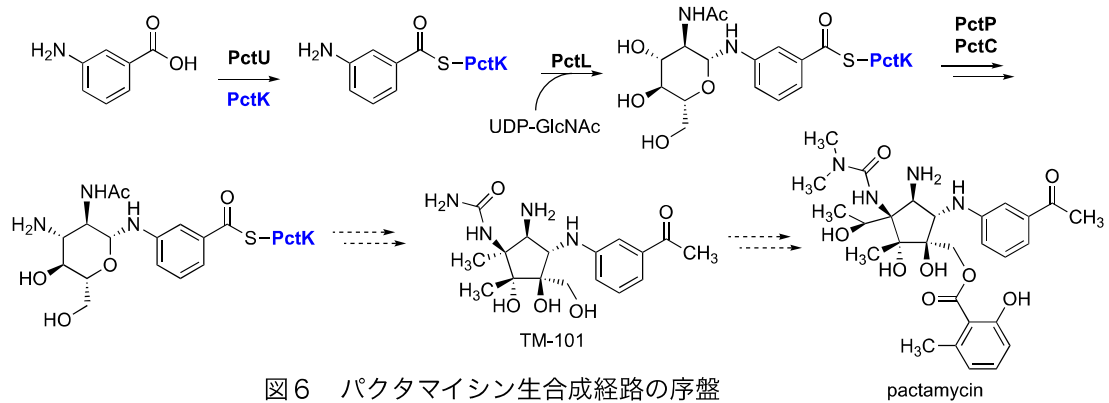


図6 パクタマイシン生成経路の序盤

バクテリオホパンテロール サイクリトール エーテルの生成に関しては、アミノグリコシド系抗生物質の生成との類似性もあることから研究を進めており、トリテルペンであるジプロプテンと *S*-アデノシル-L-メチオン(SAM)から生じる 5'-デオシアデノシルラジカルとの炭素-炭素結合形成反応を触媒するラジカル SAM 酵素 HpnH の酵素活性を明らかにすることができた(図7)。

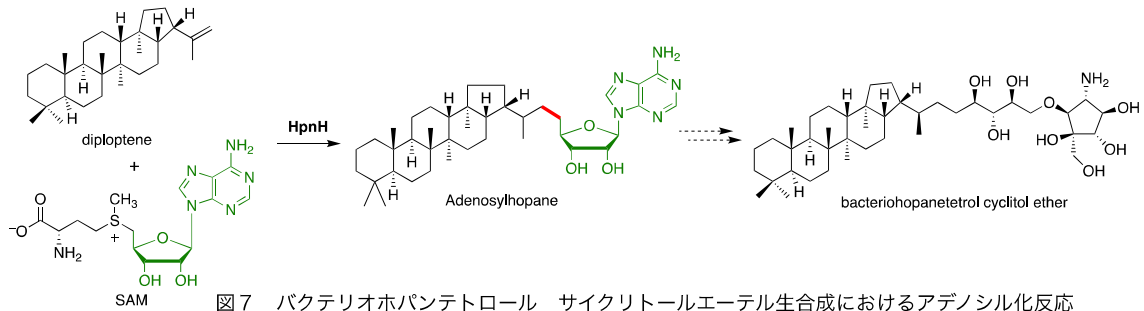


図7 バクテリオホパンテロール サイクリトールエーテル生成におけるアデノシル化反応

以上の生成酵素の機能構造解析から、アミノグリコシド系抗生物質の生成酵素を含めオリゴ糖を認識する酵素は、CH- $\pi$  相互作用を多く利用して選択的に基質を認識することが分かってきた。現在も、アミノグリコシド系抗生物質や関連化合物の生成に関わる酵素の機能構造解析を進めており、これら知見を蓄積することで、新規なアミノグリコシド系抗生物質の創出に向けた研究に展開していきたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fumitaka Kudo, Tadashi Eguchi	4. 巻 39
2. 論文標題 Biosynthesis of cyclitols	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nat. Prod. Rep.	6. 最初と最後の頁 1622_1642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2NP00024E	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 Fumitaka Kudo, Ayaka Mori, Mai Koide, Ryo Yajima, Ryohei Takeishi, Akimasa Miyanaga, Tadashi Eguchi	4. 巻 85
2. 論文標題 One-pot enzymatic synthesis of 2-deoxy-scylllo-inosose from D-glucose and polyphosphate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biosci. Biotechnol. Biochem.	6. 最初と最後の頁 108_114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbba025	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 Fumitaka Kudo, Ykinobu Kitayama, Akimasa Miyanaga, Mario Numakura, Tadashi Eguchi	4. 巻 22
2. 論文標題 Stepwise post-glycosylation modification of sugar moieties in kanamycin biosynthesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 1668_1675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.202000839	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 Shusuke Sato, Fumitaka Kudo, Michel Rohmer, Tadashi Eguchi	4. 巻 60
2. 論文標題 Biochemical and Mutational Analysis of Radical S-Adenosyl-L-Methionine Adenosylhopane Synthase HpnH from Zymomonas mobilis Reveals that the Conserved Residue Cysteine-106 Reduces a Radical Intermediate and Determines the Stereochemistry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2865 ~ 2874
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.1c00536	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

1. 著者名 Kudo Fumitaka, Kitayama Yukinobu, Miyanaga Akimasa, Hirayama Akane, Eguchi Tadashi	4. 巻 59
2. 論文標題 Biochemical and Structural Analysis of a Dehydrogenase, KanD2, and an Aminotransferase, KanS2, That Are Responsible for the Construction of the Kanosamine Moiety in Kanamycin Biosynthesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1470 ~ 1473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.0c00204	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 Shusuke Sato, Fumitaka Kudo, Michel Rohmer, Tadashi Eguchi	4. 巻 59
2. 論文標題 Characterization of radical SAM adenosylhopane synthase, HpnH, which catalyzes the 5'-deoxyadenosyl radical addition to diploptene in the biosynthesis of C35 bacteriohopanepolyols	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angew. Chem. Int. Ed.	6. 最初と最後の頁 237 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201911584	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

1. 著者名 Fumitaka Kudo, Takeshi Tsunoda, Kaito Yamaguchi, Akimasa Miyanaga, Tadashi Eguchi	4. 巻 58
2. 論文標題 Stereochemistry in the Reaction of the myo-Inositol Phosphate Synthase Ortholog Ari2 during Aristeromycin Biosynthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 5112 ~ 5116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.9b00981	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 Fumitaka Kudo, Jiahao Zhang, Shusuke Sato, Akane Hirayama, Tadashi Eguchi	4. 巻 20
2. 論文標題 Functional characterization of 3-aminobenzoic acid adenylation enzyme PctU and UDP-N-acetyl-D-glucosamine: 3-Aminobenzoyl-ACP glycosyltransferase PctL in pactamycin biosynthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 2458 ~ 2462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201900239	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 金子 黎音、佐藤 秀亮、Michel Rohmer、江口 正、工藤 史貴
2. 発表標題 Zymomonas mobilisが生産するバクテリオホパンポリオール生合成におけるサイクリトール部位の構築に関わる酵素の機能解析
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会（2024）（日本大学理工学部 船橋キャンパス）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 工藤史貴
2. 発表標題 アミノグリコシド系抗生物質とポリケチド系抗生物質の構造多様性創出機構解明に向けた精密酵素機能解析
3. 学会等名 住木・梅澤記念賞 受賞講演（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂本 葵、千菅 太一、宮永 顕正、工藤 史貴、江口 正
2. 発表標題 アミノグリコシド系抗生物質4 -デオキシブチロシンの生合成研究
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会（2023）（東京理科大学 野田キャンパス）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安富 里菜、工藤 史貴、江口 正
2. 発表標題 アミノグリコシド系抗生物質イスタマイシンとスポラリシンの生合成研究
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会（2023）（東京理科大学 野田キャンパス）
4. 発表年 2023年



1. 発表者名 Fumitaka Kudo, Yukinobu Kitayama, Akimasa Miyanaga, Tadashi Eguchi
2. 発表標題 Kanamycin biosynthesis; Post-glycosylation modification of sugar moieties
3. 学会等名 Directing Biosynthesis online (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 秀亮、工藤 史貴、Michel Rohmer、江口 正
2. 発表標題 バクテリオホパンポリオール生合成において炭素-炭素結合形成反応を触媒するラジカルSAM酵素HpnHの機能解析
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会(2021)(オンライン開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田 一步、平山 茜、工藤 史貴、江口 正
2. 発表標題 抗腫瘍抗生物質パクタマイシン生合成における脱水素酵素PctPの基質特異性
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会(2021)(オンライン開催)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>工藤研ホームページ  <a href="http://www.chemistry.titech.ac.jp/~kudo/">http://www.chemistry.titech.ac.jp/~kudo/</a></p>
---

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
---------	---------