

機関番号：12608
 研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21710224
 研究課題名 (和文) S-アデノシルメチオニンを酸化剤とする特異ラジカルSAM酵素の探索と機能解析
 研究課題名 (英文) Identification and characterization of unique radical SAM enzymes, which use S-adenosyl methionine as oxidant
 研究代表者
 工藤 史貴 (KUDO FUMITAKA)
 東京工業大学・大学院理工学研究科・准教授
 研究者番号：00361783

研究成果の概要 (和文)：

ラジカル SAM 酵素が二次代謝産物の構造多様性に関与していると考え、新規ラジカル SAM 酵素遺伝子の探索とその機能解析を行った。放線菌ゲノム DNA を鋳型とした PCR により新規酵素遺伝子を取得し、ついで、その遺伝子を含む新規二次代謝生成遺伝子クラスターを特定することができた。また、生合成酵素を用いて酵素的に合成した基質を用いて、アミノグリコシド抗生物質ネオマイシン生合成における新規ラジカル SAM 異性化酵素の機能を解明することができた。

研究成果の概要 (英文)：

Identification of new radical SAM enzyme gene was found to be an efficient strategy to identify novel secondary metabolic biosynthetic gene cluster. Further, a novel radical SAM epimerase involved in neomycin biosynthesis was characterized.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子化学

キーワード：生合成、酵素化学、ラジカル SAM 酵素、二次代謝遺伝子、放線菌、ネオマイシン、ゲンタミシン、カルバペネム抗生物質

1. 研究開始当初の背景

ラジカル S-アデノシルメチオニン (SAM) 酵素は、高く保存された特徴的なシステインモチーフ CxxxCxxC を有し、これが[4Fe+4S]クラスターを核とする活性部位を形成しているとされている。その相同性から、3,000以上のタンパク質が存在することが知られており、DNA 修復や、ビタミン類、補酵素、抗

生物質などの生合成に関与すると推定されている。その発見からの歴史も浅く、機能解明された酵素もリシン 2,3-アミノムターゼやビオチン合成酵素などの十数個に留まっている。共通していえることは還元型の[4Fe-4S]¹⁺クラスターが SAM を還元的に開裂し、5'-デオキシラジカルを発生させ、様々なラジカル反応が触媒されるであろうということである (図1)。モチーフ検索からラ

ジカル SAM 酵素としてアノテーションされている機能未確定の酵素は数多く存在し、それらはこれまでにない興味深い新規酵素反応を触媒すると考えられ、ラジカル SAM 酵素の機能解析は世界各国で盛んに行われている。

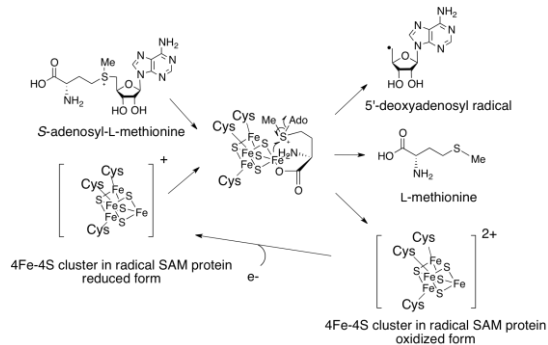


図1 ラジカル SAM 酵素による SAM の還元の開裂による 5'-デオキシアデノシルラジカル形成機構

2. 研究の目的

ラジカル SAM 酵素に着目してアミノグリコシド生合成遺伝子クラスターを眺めてみると、ネオマイシン、ゲンタミシン、フォーチミシン、リビドマイシン生合成遺伝子クラスター中にもコードされていることが分かった(論文①)。当然のことながら、これらラジカル SAM 酵素の機能を予想するのは困難であったが、多様な反応性を潜在的に有するラジカル SAM 酵素であれば、異性化反応、C-メチル化反応、デオキシ化反応など、これまで未解明であったアミノグリコシド生合成段階に関与する可能性が考えられた。

これまで、ブチロシンとネオマイシン生合成系を中心に、その基本骨格形成反応に関わる酵素解明を行ってきたが、これら一群の抗生物質の構造多様性を与えるには、酵素反応的にバリエーションが少ないことがわかってきた。したがって、これら天然物の構造多様性は、これまでに例のない酵素反応により付加されると考えられ、ラジカル SAM 酵素がその一端を担っていると推定された。そこで本研究では、アミノグリコシド生合成中の新規酵素反応を触媒していると考えられるラジカル SAM 酵素を機能解明し、この興味深い酵素群の多種多様な反応特異性と生成物の構造多様性に与える影響を解明することにした。

また、アミノグリコシド抗生物質に加えて、基本骨格に共通性のないチエナマイシン、ホスホマイシン、ピアラホス、クロロピオシンといった生理活性天然物の生合成遺伝子ク

ラスター中にも、ラジカル SAM 酵素がコードされていることが分かってきた。これら化合物の化学構造と取り込み実験の結果から考えられる共通点は、不活性と考えられる炭素が C-メチル化される推定生合成経路である。それらラジカル SAM 酵素はコバラミン結合部位も有していることから、ラジカル SAM メチル化酵素としてアノテーションされているが、これまでにその酵素活性を検出したという報告はない。本研究代表者は、化学構造と取り込み実験の結果から、類似 C-メチル化酵素反応が含まれると考えられたパクタマイシンの生合成遺伝子クラスターを特定するために、それら酵素に特徴的なアミノ酸配列から特異 PCR 用プライマーを設計し、生産菌ゲノムをスクリーニングして、対応すると考えられる生合成遺伝子クラスターの特定に成功した。そこで、本研究ではさらに発展させて、様々なラジカル SAM 酵素遺伝子をプローブとすることで、微生物ゲノム中の新規ラジカル SAM 酵素遺伝子含有二次代謝生合成遺伝子クラスターを特定することにした。そのような遺伝子クラスターを保持している微生物であれば、新規構造の天然物を生産することも期待され、新たな天然物探索の方法論にもなり得ると考えた。

3. 研究の方法

(1) ネオマイシン生合成におけるラジカル SAM 酵素の機能解析

ネオマイシン生合成に関しては、生合成最終段階のネオマイシン C からネオマイシン B への異性化反応だけが未解明の酵素反応であった。一方、遺伝子クラスター中で機能が未確定なのはラジカル SAM 酵素をコードする NeoN だけなので、この酵素がこの異性化反応を触媒すると推定した。そこで、ネオマイシン C を基質として、大腸菌で発現させた組換えタンパク質 NeoN を用いて予想される酵素反応を検討することにした。

(2) ゲンタミシン生合成におけるラジカル SAM 酵素の機能解析

ゲンタミシン生合成に関しては、韓国のグループによる放線菌での異種発現実験から、ゲンタミシン A2 の生合成に必要な生合成酵素が明らかにされていた。また、他の韓国のグループはラジカル SAM 酵素遺伝子 *gntE* 欠失株中にゲンタミシン A2 が蓄積されたことから、ゲンタミシン A2 を基質とするラジカ

ルSAM酵素がC-メチル化に関与すると推定していた。そこで本研究では、ゲンタミシンA2を基質として、ラジカルSAM酵素GntEの機能を組換えタンパク質を用いて解明することを目指した。

(3) ラジカルSAM酵素遺伝子含有新規二次代謝合成遺伝子クラスターの取得

二次代謝ラジカルSAM酵素間で高く保存されている領域を利用して特異プライマーを設計し、PCRにより新規ラジカルSAM酵素遺伝子をスクリーニングすることにした。本研究では特に、ラジカルSAMメチル化酵素の関与が推定される天然物の生産菌のうち、未だその合成遺伝子クラスターが取得されていない微生物ゲノムを鋳型としてスクリーニングすることにした。

4. 研究成果

(1) ネオマイシン合成におけるラジカルSAM酵素の反応機構解析

まず、ネオマイシンB合成最終段階における異性化反応の基質として推定されたネオマイシンCを、入手可能なリボスタマイシンから4つの酵素を利用して大量に調製することに成功した(論文②)。次にラジカルSAM酵素NeoNを大腸菌にて発現させて、アルゴン雰囲気下で細胞破碎して調製したNeoN含有無細胞抽出液を用いてネオマイシンCからネオマイシンBへの異性化反応を検討した。様々な条件を検討した結果、二価の鉄と硫黄を添加して鉄硫黄クラスターを再構成し、さらにジチオナイトで還元した酵素を用いた時にだけ高い酵素活性を見いだすことに成功した。当然のことながら、SAM存在下でのみ酵素活性を検出することができたので、他のラジカルSAMタンパク質と同様に、NeoN活性部位に存在する1価の[4Fe-4S]⁺クラスターがSAMを還元的に開裂し5'-デオキシラジカルを発生させ、それがネオマイシンの異性化反応に関与することが推定された。また、ネオマイシンBからネオマイシンCへの逆反応は全く観測されなかったことから、厳密な反応制御機構が存在することが分かった。本酵素を精製し詳細な反応機構解析を行なう必要があるが、二次代謝合成においてラジカルSAM酵素が異性化反応に関与することを明らかにした初めての例であり、学術的価値は非常に高いと考えられる。

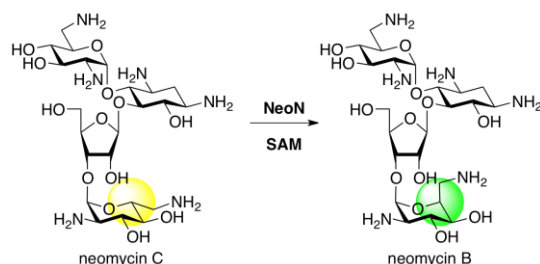


図2 ラジカルSAM異性化酵素NeoMによるネオマイシンB合成の最終段階

(2) ゲンタミシン合成におけるラジカルSAM酵素の機能解析

ラジカルSAM酵素GntEの基質として推定されたゲンタミシンA2は、先述の韓国のグループによる方法で調製可能であるが、酵素反応を検討するための基質供給方法としては、その収量は極めて低いものであった。そこで、入手可能なパロマミンを基質とする酵素反応により調製する方法を検討することにした。

糖供与体UDP-キシロース(UDP-Xyl)は、購入可能なUDP-グルクロン酸からのNAD依存型脱炭酸酵素反応により調製できると考えられたが、ゲンタミシン合成遺伝子クラスターには該当する酵素がコードされていない。そこで、アビラマイシン合成遺伝子クラスターにコードされているNDP-グルコース-4,6-デヒドラターゼ類似酵素がUDP-グルクロン酸脱炭酸酵素として解明されているので、ゲノム解読菌である*Streptomyces coelicolor* A3(2)にコードされるホモログSCO6170を利用してUDP-キシロースを大量調製した。

パロマミンの配糖化を触媒する糖転移酵素GntDの大腸菌での組換え酵素を用いた酵素反応検出の報告がなかったため、GntEの推定基質を大量に供給するためにはこの糖転移酵素反応を最適化する必要があった。また、糖転移酵素の大腸菌での活性発現は困難であることが多いので、カナマイシン合成におけるGntDホモログであるKanM2も同時に大腸菌にて発現させて酵素反応を検討することにした。

まず、発現条件を種々検討した結果、GntDとKanM2を共に可溶性タンパク質として得ることができた。次にパロマミンを基質として各種糖供与体を用いた配糖化反応を検討した結果、GntDはUDP-Xylを供与体として、KanM2はUDP-Glcを供与体として特異的に認識し配糖化反応を触媒することが明らかとなった。KanM2に関しては、酵素反応のスケー

ルアップに成功し、配糖化物を 8 mg 調製することができた(論文③)。GntD を用いた反応に関しても、GntE の機能解析に基質を供するために、大量スケールでの酵素反応を検討している。

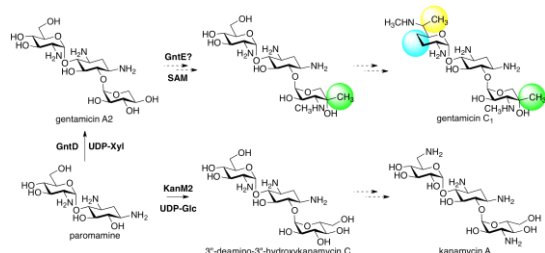


図3 ゲンタミシン、カナマイシン生合成における配糖化酵素の機能解析

(3) ラジカル SAM 酵素遺伝子含有新規二次代謝生合成遺伝子クラスターの取得

まず、二次代謝ラジカル SAM 酵素遺伝子を取得するために、相同性解析にて高く保存されている領域を特定し、特異 PCR プライマーを設計した。次に、カルバペネム抗生物質を生産するとして理研バイオリソースセンターで保存されている放線菌のゲノム DNA を鋳型として PCR を行なった結果、3 株のうち 2 株からラジカル SAM 酵素遺伝子を見いだすことができた。

そのうち 1 株に関してはドラフトゲノム解析を行い、PCR で取得したラジカル SAM 酵素遺伝子が推定カルバペネム抗生物質生合成遺伝子クラスターを形成する遺伝子の一つであることが分かった。生産されるカルバペネム抗生物質の生合成には、ラジカル SAM 酵素が関与すると推定されるので、本方法により特異的に二次代謝生合成遺伝子クラスターを特定できたと言える。また、取得した遺伝子は全ゲノム DNA 配列の中で、この遺伝子クラスターだけに特異的に存在しており、ラジカル SAM 酵素遺伝子の取得が、二次代謝生合成遺伝子クラスターの特定に直結することが明らかとなった。現在、この遺伝子クラスターを異種放線菌株で発現させて、カルバペネム生合成に関与することを明らかにすべく検討している。

最近では、高速 DNA シークエンサーを用いて低コストで微生物ゲノムのドラフト解析が行なえるようになっており、世界各国で様々な微生物のゲノムが解読されている。従って、ラジカル SAM 酵素遺伝子を *in silico* スクリーニングすることで新規二次代謝生合成遺伝子クラスター、並びに、新規二次代謝産物の取得につながると期待される。もちろ

ん、微生物ゲノム解析はコストと時間がかかるので、新規ラジカル SAM 酵素遺伝子を包括的に探索するには、本研究で利用した PCR 法と併用することが重要と考えられる。

今後も興味深い触媒活性を有するラジカル SAM 酵素の機能解析と探索を行なうことで、生物科学の発展に貢献できると考えている。

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 3 件)

① F. Kudo, T. Eguchi, Biosynthetic genes for aminoglycoside antibiotics, *Journal of Antibiotics*, 62, 471-481, 2009, 査読有り

② F. Kudo, T. Kawashima, K. Yokoyama, T. Eguchi, Enzymatic Preparation of Neomycin C from Ribostamycin, *Journal of Antibiotics*, 62, 643-646, 2009, 査読有り

③ F. Kudo, H. Sucipto, T. Eguchi, Enzymatic activity of a glycosyltransferase KanM2 encoded in the kanamycin biosynthetic gene cluster, *Journal of Antibiotics*, 62, 707-710, 2009, 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

① Hilda Sucipto, Fumiaka Kudo, Tadashi Eguchi, Functional analysis of kanamycin biosynthesis enzymes, International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Biosynthesis of Natural Products, 2010. 12. 17, Honolulu, HI (USA)

② 川島大輝・横山健一・工藤史貴・江口正、アミノ配糖体抗生物質ネオマイシン C の酵素的調製、日本化学会第 90 春季年会、2010. 3. 27、近畿大学

③ 工藤史貴、横山健一、木下俊佑、山本恭士、藤井拓也、天貝啓太、川島大輝、江口正、アミノ配糖体抗生物質ネオマイシン C の全生合成の解明、第 51 回天然有機化合物討論会、2009. 10. 7、名古屋市公会堂

[その他]

ホームページ

<http://www.cms.titech.ac.jp/~eguchi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 史貴 (KUDO FUMITAKA)

東京工業大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：00361783