

## 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 3 月 31 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22310139

研究課題名（和文） メナキノン新規生合成経路をターゲットとした抗ピロリ菌剤の開発

研究課題名（英文） Screening of natural products which inhibits a new menaquinone biosynthetic pathway

研究代表者

大利 徹 (DAIRI TOHRU)

北海道大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：70264679

研究成果の概要（和文）：微生物のメナキノン新規生合成経路（フタロシン（FL）経路）の詳細な解析を行った。その結果、FL 経路の初発反応は 3 タイプあることが解った。①FL を生成後、デヒポキサチニルフタロシン（DHFL）へ変換、②アミノデオキシフタロシン（AFL、FL が持つイノシンの代わりにアデノシンを持つ化合物）を生成後、脱アミノ化し、DHFL へ変換、③AFL 生成後、直接 DHFL へ変換。また、天然物からの抗ピロリ菌リード化合物の探索も行い、2 つの候補化合物を得た。

研究成果の概要（英文）：The futasine pathway is operating in some bacteria for the biosynthesis of menaquinone. Futasine is converted into dehypoxanthinyl futasine (DHFL) by MqnB. In this study, three routes to the formation of DHFL were suggested. DHFL may have been directly formed by MqnB in *Thermus thermophilus*. In *Streptomyces coelicolor*, aminodeoxy FL (AFL) was converted to FL by deaminases, then to DHFL. In contrast, MqnB of *Helicobacter pylori* directly converted AFL into DHFL.

To identify compounds that specifically inhibit the futasin pathway, we used *B. halodurans* that has FL pathway as a test strain. Finally, two candidate fungal culture broths were obtained.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	8,200,000 円	2,460,000 円	10,660,000 円
2011 年度	3,600,000 円	1,080,000 円	4,680,000 円
2012 年度	3,600,000 円	1,080,000 円	4,680,000 円
年度			
年度			
総計	15,400,000 円	4,620,000 円	20,020,000 円

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生体分子科学・生物分子化学

キーワード：微生物、メナキノン、生合成、フタロシン経路、阻害剤

### 1. 研究開始当初の背景

メナキノン（ビタミンK、以下MKと略す）は、微生物にとって電子伝達系成分として生育に必須である。研究開始時、筆者らは、ピロリ菌を含む一部の微生物では、MKは大腸菌で解明された経路とは全く異なる経路で生合成されることに気づき、その概略を明らかにしていた。

### 2. 研究の目的

しかし、その詳細は不明のままであったことから、その全容解明を目的に研究を開始した。さらにピロリ菌は新規経路を持つのに対し、乳酸菌など腸内有用微生物は既知の経路を有することから、新規経路の特異的阻害剤は、ピロリ菌に特異的な抗菌剤になると期待される。そこで、放線菌・カビ培養液から新規経路特異的阻害剤の探索も試みることにした。

### 3. 研究の方法

新規経路の4つの遺伝子は、多くの微生物では染色体上に点在しているが、ゲノム解析が終了している幾つかの微生物では2か所程度にクラスターを成していた。微生物では関連遺伝子がクラスターを成すことが多いことから、クラスター中の機能未知遺伝子の解析を行った。

また、阻害剤探索に関しては、*B. halodurans* がメナキノン生合成の際、新規経路を使うのに対し、*B. subtilis* は既知経路を使う。そこで、前者に対してのみ抗菌作用を示す化合物を放線菌・カビの培養液中に探索した。

### 4. 研究成果

*Acidothermus cellulolyticus* では、新規経路の4つの遺伝子は2か所でクラスターを成していると推定された。その一方には、アデ

ノシンデアミナーゼと推定される遺伝子（ADase, Acel\_0264）が含まれることから、AFLが中間体である可能性が考えられたため、その検証を行った。化学合成したAFLと*A. cellulolyticus*由来の組換えADaseを反応させた結果FLが生成した。また本株のMqnB（FLハイドロラーゼ）はAFLとは反応せずFLのみを基質としデヒポキサチニルフトロシン（DHFL）が生成した。従って本株では、AFL→FL→DHFLと生合成されると推定された。他方ピロリ菌のMqnBは、他の微生物のMqnBとの相同性が低くFLを基質としなかった。そこでAFLを基質に用いた結果、AFLからのみDHFLが生成したことから、DHFLはAFLから直接生成することが判明した。以上、FL経路の初発反応には多様性があることを示した。

初発反応であるFL（ピロリ菌などでは、AFL）の生成機構は不明であることから解析を行った。これまでに初発反応に必要な酵素としてMqnA酵素を見出しているが、本酵素単独ではFL/AFL生成活性を示さない。初発反応がコリスミ酸、フォスフォエノールピルビン酸、イノシン（アデニン）と3つの基質を縮合する複雑な反応であることから、更なる酵素の関与が推定されたため、その同定を試みた。ゲノムデータベースを探索すると、*Thermus thermophilus*では、radical SAMと総称される酵素遺伝子が、MqnA遺伝子と翻訳共訳していることからFL生合成への関与が示唆された。そこで本遺伝子破壊を行った結果、破壊株はメナキノン要求性を示し、さらに生育がFLの添加で回復したことから、本radical SAM酵素が初発反応に関与することが明らかになった。そこで、両遺伝子が大腸菌で発現させFLが生成するか検討した。しかしFLの生成を検出できなかったことから、さらなる酵素の関与が示唆された。

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9件)

下記1~8 査読有、9 査読無

1. N. Sunagawa, T. Fujiwara, T. Yoda, D. Shimura, M. Sakai, S. Kawano, Y. Satoh, M. Yao, K. Tajima, and T. Dairi, CcpAx is a new member of the cellulose synthase complex (terminal complex) in *Acetobacter xylinum*, *J. Biosci. Bioeng.*, in press (2013).
2. A. Yajima, S. Kouno, M. Mogi, R. Katsuta, T. Dairi, H. Seto, and T. Nukada, Synthesis of ( $\pm$ )-cyclic de-hypoxanthine futalosine, the biosynthetic intermediate in an alternative biosynthetic pathway for menaquinones. *Tetrahedron Lett.*, **52**, 4934-4937 (2011).
3. Y. Satoh, K. Tajima, S. Nakamoto, H. Xuerong, T. Matsushima, T. Ohshima, S. Kawano, T. Erata, T. Dairi, and M. Munekata, Isolation of a Thermotolerant Bacterium Producing Medium-chain-length Polyhydroxyalkanoate, *J. Appl. Microbiol.* **111**, 811-817 (2011).
4. X. Han, Y. Satoh, T. Satoh, T. Kakuchi, K. Matsumoto, S. Taguchi, T. Dairi, M. Munekata, and K. Tajima, Enzymatic polymerization of 2-hydroxyalkanoates: copolymerization of 2-hydroxybutyrate by wild-type class I PHA synthase. *Appl. Microbiol. Biotech.* **92**, 509-517 (2011)
5. S. Takahashi, A. Toyoda, Y. Sekiyama, H. Takagi, T. Nogawa, M. Uramoto, R. Suzuki, H. Koshino, T. Kumano, S. Panthee, T. Dairi, J. Ishikawa, H. Ikeda, Y. Sakaki, and H. Osada, Reveromycin A biosynthesis uses RevG and RevJ for stereospecific spiroacetal formation, *Nat. Chem. Biol.* **7**, 461-468 (2011).
6. T. Dairi, T. Kuzuyama, M. Nishiyama, and Fujii I. Convergent strategies in biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.*, 2011, **28** (6) 1054 – 1086 (2011).
7. C. Arakawa, K. Furihata, T. Hiratsuka, N. Itoh, H. Seto, and T. Dairi, Diversity of the early step of the futalosine pathway. *Antimicrob Agents Chemother.* **55**, 913-916 (2011).
8. R. Tanaka, T. Kunisada, N. Kushida, K. Yamada, S. Ikeda, M. Noike, Y. Ono, N. Itoh, H. Takami, H. Seto, and T. Dairi, Branched fatty acids inhibit the biosynthesis of menaquinone in *Helicobacter pylori*. *J. Antibiot.*, **64**, 151-153 (2011).
9. 大利 徹、微生物におけるビタミンK合成の分子機構と生物学的意義、腎と代謝、24巻、179-186 (2011)。  
[学会発表] (計17件)
  1. 松尾 京子、石北 央、大利 徹、瀬戸 治男、新井 亮一、新規メナキノン合成経路酵素 MqnD の生成物・類似体複合体の X 線結晶構造解析、平成 25 年度 日本農芸化学会大会、東北大学、平成 25 年 3 月
  2. Tohru Dairi, An alternative menaquinone biosynthetic pathway: an attractive target for drug discovery to *Helicobacter pylori*, 17th Malaysian Chemical Congress (17MCC), October 15-17, 2012, Putra World Trade Centre, Kuala Lumpur, Malaysia.
  3. 池田駿介、池田安由美、佐藤康治、野池基義、瀬戸治男、大利 徹、放線菌が持つメナキノン新規合成経路の解明と特異的阻害剤の探索、2012 年度 (第 27 回) 日本放線菌学会大会、府中の森芸術劇場、2012 年 9 月 6 日 (木)
  4. 大利 徹、補酵素類の生合成に関する

新規酵素の解析と応用、第 13 回酵素応用シンポジウム、名古屋メルパルク、平成 24 年 6 月 8 日

5. 大利 徹、微生物に見出されたメナキノ  
ン新規生合成経路の全容解明と抗ピロ  
リ菌薬開発への応用、公益財団法人発酵  
研究所 第 6 回研究報告会、千里ライフ  
サイエンスセンター 大阪、平成 24 年 6  
月 7 日
6. 大利 徹、微生物に見出されたメナキノ  
ン新規生合成経路の全容解明と抗ピロ  
リ菌剤の開発、公益財団法人野田産業科  
学研究所、平成 24 年度研究成果発表会、  
平成 24 年 6 月 1 日（東京会館）
7. Tohru Dairi, Microorganisms evolved  
vitamin biosynthetic enzymes in response to  
various environments, an example in  
menaquinone biosynthesis, The IUMS  
2011, Sapporo, Sep 6 to 10, 2011（札幌  
国際会議場）
8. Tohru Dairi (invited), An alternative  
menaquinone biosynthetic pathway: an  
attractive target for drug discovery to  
*Helicobacter pylori*. The Third International  
Conference on Cofactors 03 (ICC-03), The  
University of Turku, Finland, July 10 to 15,  
2011
9. 大利 徹、微生物におけるビタミン生合  
成経路の多様性、福井県立大学、生物資  
源学特別セミナー、平成 23 年 5 月 23 日
10. 田中友理、國定孝夫、櫛田伸明、山田恵  
子、池田駿介、伊藤伸哉、瀬戸治男、大  
利 徹、メナキノ  
ン（MK）新規生合成  
経路阻害剤の探索、平成 23 年度 日本  
農芸化学会大会、京都女子大学、平成 23  
年 3 月
11. 荒川知里、倉都将宏、伊藤伸哉、瀬戸治  
男、大利 徹、フタロシン（FL）経路の

初発反応の多様性、平成 23 年度 日本  
農芸化学会大会、京都女子大学、平成 23  
年 3 月

12. Tohru Dairi, Studies on the early  
biosynthetic step of the futasine  
(menaquinone) pathway, Pacificchem 2010,  
Honolulu, December 16, 2010（シェラトン  
ワイキキ）
13. 大利 徹、ピロリ菌が持つ特異的ビタミ  
ン生合成経路の解明と抗ピロリ菌薬開  
発への挑戦、第 3 回 北大工学系一道総  
研 連携フォーラム、北大創成科学研究  
棟、平成 22 年 10 月 26 日
14. Tohru Dairi, An alternative menaquinone  
biosynthetic pathway: an attractive target for  
drug discovery to pathogenic *Helicobacter*  
and *Chlamydia* strains., 12<sup>th</sup> Japanese-Swiss  
Meeting on Biotechnology and Bioprocess  
Development, Toyama, 2010.10.11（富山国  
際会議場）
15. 大利 徹、放線菌が持つメナキノ  
ン新規  
生合成経路の解明、平成 22 年度 日本  
放線菌学会大会、東京、平成 22 年 9 月 2  
日（タワーホール船堀）
16. 荒川 知里、倉都 将宏、瀬戸 治男、  
大利 徹、放線菌におけるフタロシン経  
路の初発反応の多様性、平成 22 年度 日  
本放線菌学会大会、東京、平成 22 年 9  
月 3 日（タワーホール船堀）
17. 大利 徹、微生物に見出されたメナキノ  
ン新規生合成の解明にいたるストーリ  
ー、第 45 回天然物化学談話会、愛知  
県蒲郡市、平成 22 年 7 月 7 日（ホテル  
明山荘）

〔図書〕（計 1 件）

T. Dairi, Menaquinone biosyntheses in  
microorganisms, *Methods in Enzymol.* **515**,  
107-122 (2012).

〔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

<http://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/tre/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

大利 徹 (DAIRI TOHRU)

北海道大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：70264679