

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 24 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23510280

研究課題名(和文)立体構造を基盤とした抗生物質アシラーゼ変異体酵素の設計と合成

研究課題名(英文) Design and syntheses of antibiotic acylase mutants based on 3D structure

研究代表者

磯貝 泰弘 (Isogai, Yasuhiro)

富山県立大学・工学部・准教授

研究者番号：00201921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：セファロsporinアシラーゼ(CA)は、詳細な酵素機能や立体構造が解明されている、ラクタム抗生物質生産酵素である。一方、キャンディン系抗生物質の製造に利用されているアクレアシンAアシラーゼ(AAC)は立体構造が未解明で、大腸菌等による異種発現が困難な有用酵素である。

本研究では、AACの酵素-基質複合体3Dモデルを作製し、CAとAACの異なる基質認識機構の構造的な要因について解析した。この結果に基づいて、キャンディン系抗生物質原体を基質とするCA変異体の設計と合成を行った。合成された変異体酵素は、野生型酵素と較べてセファロsporinに対する活性が低下した一方、アクレアシンAに対する活性が増大した。

研究成果の概要(英文)：The antibiotic acylases are key enzymes for the industrial production of antibiotic drugs. Cephalosporin acylase (CA) is one of the most intensively studied enzymes that catalyze the deacylation of β -lactam antibiotics. On the other hand, aculeacin A acylase (AAC) is known to be an alternative acylase class catalyzing the deacylation of echinocandin compounds, but its structural and enzymatic properties remain to be explored.

In the present study, 3D homology models of AAC were constructed, and docking simulation with substrate ligands was performed for AAC. Based on the computation results, CA mutants have been designed to form the binding site for aculeacin A. Experimentally synthesized mutant enzymes exhibited lower enzymatic activity for cephalosporin but higher activity for aculeacin A, in comparison with the wild-type enzyme. The present results demonstrate the usefulness of the computational approaches for engineering the enzymatic properties of antibiotic acylases.

研究分野：蛋白質設計

キーワード：アシラーゼ 抗生物質 モデリング 変異体 基質特異性

1. 研究開始当初の背景

多くの市販されている抗生物質関連薬物は、微生物が産生するペニシリン G やセファロスポリン C を含む β ラクタム系化合物やエキノキャンディン B など環状化合物のアシル側鎖を一度加水分解した後、様々な化学修飾を施したものである。したがって、これらの加水分解を触媒するアシラーゼ (アミダーゼ) は、抗生物質関連医薬品の出発材料を製造する上でカギとなる重要な酵素である。

例えば、市販されているほとんどの半合成ペニシリン系製剤は、アオカビが産生するペニシリン G (ベンジルペニシリン) の 6 位側鎖を β ラクタムアシラーゼで脱アシル化して β ラクタム核 (6-アミノペニシラン酸) とし、続いて、さらに酵素的に、あるいは化学的に、新しい 6 位側鎖を導入する方法で誘導体化されたものである。また、比較的最近、注射用抗真菌剤として利用されるようになったキャンディン系抗生物質であるミカファンギンや最近社会問題となっているメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対する抗菌薬として注目されているダプトマイシン等のリポペプチド抗生物質は、 β ラクタムアシラーゼとは基質特異性が異なるキャンディンアシラーゼを利用してアシル側鎖を脱アシル化後、様々な形に誘導体化されたものである。これまでに知られているキャンディン系抗生物質は、すべて糸状菌により生産され、6 つの異形アミノ酸からなる環状リポペプチド骨格を持つ。これらの抗生物質は、主鎖骨格や骨格に結合する分子側鎖の種類に依存して、異なった薬理作用を示す。従って、微生物由来の抗生物質原体を出発分子として、新しい活性をもつ酵素変異体を利用して様々な抗生物質誘導体を作り出すことが出来れば、自然界から新規の微生物や遺伝子を採取することなく、耐性菌が存在しない、全く新しい抗生物質を作り出すことも可能となる。

ペニシリン G やセファロスポリン C を分解する β ラクタムアシラーゼのいくつかは、すでに結晶構造解析が行われており、原子レベルでの詳細な立体構造が解明されている。例えば、大腸菌由来ペニシリン G アシラーゼは、様々な条件下で結晶化、構造解析され、それらの立体構造データが、プロテインデータバンク (PDB) に、PDB code 1AI4、1E3A、1GM7 等々として登録されている。これらの立体構造情報により、 β ラクタムアシラーゼの詳細な触媒機構が明らかとなっている。 β ラクタムアシラーゼは、いわゆる N-terminal (Ntn) hydroxylase スーパーファミリーに属する一群の加水分解酵素であり、蛋白質分子の基質結合ポケットの中心付近に位置するセリン残基 (Ser β 1) が加水分解反応触媒の活性中心である。これらの酵素は、700~800 残基からなる単量体で活性を持たない前駆体蛋白質として発現する。前駆体として発現した後、翻訳後修飾を受け、N 末から数え

て 150~200 残基程度 C 末側の領域にある、数~数十残基のスペーサー配列が切り取られ、活性化することが知られている。さらに、 β ラクタムアシラーゼについては、多くの変異体酵素が作成されており、それらの酵素活性に関する詳細な実験データが得られている。

一方、環状リポペプチド系抗生物質を基質とするキャンディンアシラーゼのいくつかは、遺伝子の塩基配列から全長のアミノ酸配列が推定可能で、 β ラクタムアシラーゼとの配列相同性も検出されている。しかし、これまでに知られているキャンディンアシラーゼは、大腸菌の組換え体を使った蛋白質の合成が困難であり、その立体構造や詳しい酵素的な性質については不明な点が多かった。

2. 研究の目的

本研究では、アシラーゼ酵素の変異体設計に有効な計算法を見出し、その計算法を用いて、キャンディン系基質を脱アシル化出来る β ラクタムアシラーゼ変異体を設計する。このようにして設計した変異体酵素を遺伝子工学技術を用いて実際に合成し、構造解析と酵素化学的な実験を行い、計算結果と比較する。実験データを計算にフィードバックして、さらに計算法の改良を行う。このような作業を繰り返し行うことにより、創薬に利用出来る変異体酵素の設計と合成を行う。本研究で対象とする基質と酵素の組み合わせだけでなく、他の蛋白質や活性化化合物の機能設計を行うための計算科学的手法の開発にも貢献する。

これまでの創薬研究では、製薬に利用される酵素の改変を含めて、多検体を対象とした特定の機能アッセイや結合アッセイにより、目的とする活性分子を探索する実験的手法が主流であった。一方、本研究は、近年のゲノムプロジェクト等による蛋白質の立体構造データベースの拡充や飛躍的に進歩しつつある計算機のハードおよびソフトを活用して、目的とする機能をもった分子を合理的に設計しようとするものである。

また、糸状菌や放線菌由来のキャンディンアシラーゼを大腸菌やキャンディン系抗生物質原体生産菌内で異種発現することにより、効率良くキャンディン系抗生物質原料を生産するための基礎研究も行った。

3. 研究の方法

3.1 モデリングとドッキング

アクレアシン A アシラーゼ (AAC) のアミノ酸配列は、放線菌 *Actinoplanes utahensis* NRRL 13244 株由来の遺伝子配列 (accession No. AB576189 in the DDBJ/EMBL/GenBank databases) から推定した。AAC の立体構造は、緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* 由来クオラムセン

シング酵素 PvdQ の立体構造 (PDB code 2wye (アポ体), 2wyc (基質結合型), 2wyb (アシル-酵素反応中間体)) をテンプレートとしたホモロジーモデリングにより推定し、基質とのドッキングシミュレーションに使用した。セファロsporin アシラーゼ (CA) の立体構造は、1oqz (前駆体) と 1or0 (活性化型)、1jvz (基質結合活性化型) を用いた。ホモロジーモデリングとドッキングシミュレーションは、それぞれ、Accelrys 社製分子モデリングソフト Discovery Studio に組み込んである Modeler と CDOCKER を用いて行った。

3.2 酵素タンパク質の合成と精製

Pseudomonas sp. SY-77 株由来の野生型 CA 遺伝子は、韓国ソウル大の Kyung Hyun Kim 教授から提供していただいた。この遺伝子は、5'側に 6×His 配列を融合した状態で pET23d プラスミドベクターの NcoI と HindIII の間に組み込まれていた。変異体 CA 遺伝子は、この遺伝子をテンプレートにして、PrimeSTAR® PCR polymerase (タカラバイオ) を用いた変異 PCR により作製した。各アミノ酸置換は、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer による塩基配列解析により確認した。作製した遺伝子ベクターで大腸菌 BL21(DE3)株を形質転換し IPTG 誘導により酵素蛋白質を合成した。蛋白質の精製は、Ni アフィニティークロマトグラフィーで行った。

3.3 酵素活性の測定

アミノ基蛍光ラベル化試薬フルオレスカミンが第一級アミンと反応して強い蛍光を発することを利用して、分解された基質のアミド基を蛍光により定量することで、酵素活性の測定を行った。glutaryl-7-amino cephalosporanic acid (GL-7-ACA) または aculeacin A を、それぞれβラクタムおよびキャンディン系の基質として用いた。一定濃度の精製酵素と様々な濃度の基質を 20mM リン酸バッファー中 (pH7.5) で混合し、37°C でインキュベートした後、酢酸の添加により反応を停めた。様々な反応時間を経過した酵素-基質水溶液に、フルオレスカミンを加えて室温で 40 分間反応させた。これらの溶液に、マイクロプレートリーダーを用いて、360nm の励起光を当て 470nm の蛍光を測定した。

4. 研究成果

4.1 モデリングとドッキング

βラクタム系抗生物質を基質とする代用的なアシラーゼである CA の一連の変異体と二種類の基質分子 GL-7-ACA および adipyl-7-amino cephalosporanic acid (AD-7-ACA) について、それぞれの立体構造に基づいたドッキングシミュレーションを行った。CA 変異体の立体構造は、野生型 CA の X 線結晶構造からアミノ酸置換により作成した。変異体モデルの作成法とドッキング計算の方法を

変えることにより、複数セットの計算結果を得た。得られた結合エネルギーの計算値を既に報告されている酵素変異体の K_m の実験値の対数に対してプロットし、理論値と実験値の比較を行った。その結果、置換したアミノ酸残基のみのコンフォーメーションを最適化した変異体モデルと GL-7-ACA を用いた計算値が相関係数 0.65 で、もっとも良好な実験値との相関を得た (図 1)。

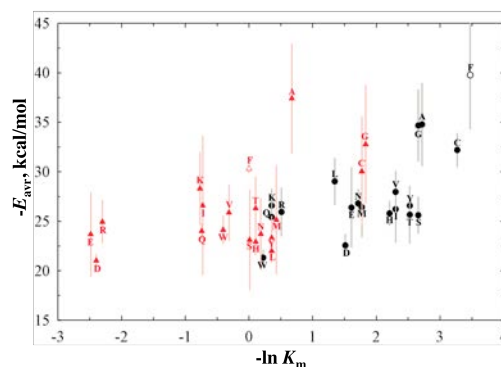


図 1. CA 変異体の二種類の基質に対するミカエリス定数 K_m (実験値) とドッキングエネルギー (計算値) の比較. CA 変異体は F177(β)X (X=置換した各アミノ酸) で、各データについて X のアミノ酸を一文字記号で図中に示した。ドッキングエネルギー ($-E_{avr}$) は、計算で得られた 10 個の最小エネルギーの平均値±標準偏差を示す。黒丸のデータは、GL-7-ACA を基質としたもの、赤三角は、AD-7-ACA を基質としたもの。GL-7-ACA に関して、実験値と計算値の間に相関係数 0.65 を得た。

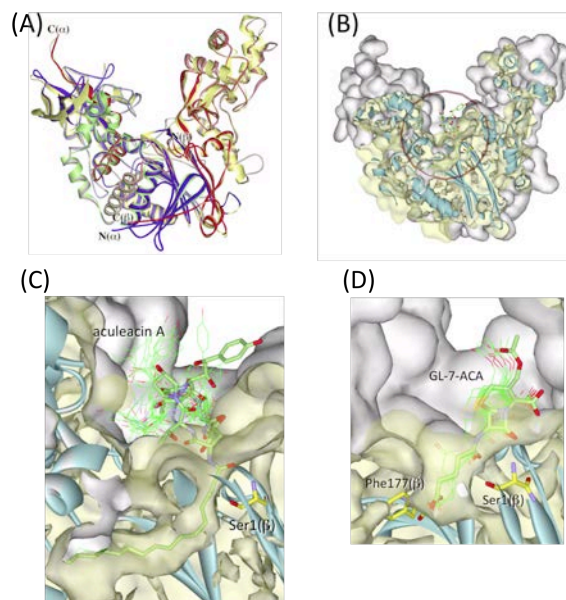


図 2. アシラーゼのモデリングとドッキング。(A) 緑膿菌酵素 Pvdq をテンプレートとして作成した AAC のホモロジーモデル。幅広リボンが Pvdq、細いリボンが AAC。(B, C) AAC とアクレアシン A のドッキングモデル。(D) CA と GL-7-ACA ドッキングモデル。

次に、抗真菌薬として重要なキャンディン系抗生物質の製造に利用されているアクレアシン A アシラーゼ (AAC) について計算を行った。AAC の立体構造は未解明なので、立体構造データベースに登録されている蛋白質のうち最も配列が似ている緑膿菌由来のクオラムセンシング酵素 PvdQ の立体構造をテンプレートとしてモデリングを行った (図 2A)。

既述の計算法と AAC モデルを使って、アクレアシン A を含む基質とのドッキング計算を行ったところ、AAC はアクレアシン A に対して、良好な結合エネルギーを示した。一方、CA はアクレアシン A に対してほとんど結合親和性を示さなかった。これらの計算結果は、これまで報告されている実験結果と一致した。

4.2 基質認識機構

AAC とアクレアシン A とのドッキングモデルの詳細を観察すると、AAC の活性中心近傍の基質結合部位の底に、細長い結合ポケットが存在し、この部分にアクレアシン A の長いリポペプチドアシル側鎖を捕捉することで高い結合親和性をもつことが分かった (図 2B, C)。一方 CA の基質結合部位には、 β ラクタムの短いアシル側鎖と相互作用する浅い窪みしか無く、キャンディン化合物の長い側鎖を格納することは出来ない (図 2D)。

このことから、AAC と CA の基質特異性の違いは、アシル基結合部位の形状にその主因があると推定された。このことを確かめ、合成が容易なアシラーゼ酵素を取得することを目的として、計算機上で CA の変異体を作製した。CA のアシル基結合ポケットの底部に存在する Phe 残基 (F177(β)) を小さなアミノ酸に置換することにより、ポケットの奥行きを深くすることを試みた。CA 変異体 F177(β)G や F177(β)A の立体構造モデルを用いてドッキング計算を行ったところ、アクレアシン A に対する結合エネルギーに改善が見られた。

4.3 変異体酵素の合成と活性測定

CA 変異体 F177(β)G および F177(β)A の二つの遺伝子を、野生型 CA 遺伝子から変異プライマーを用いた PCR 法により作製した。これらの変異体遺伝子を大腸菌に導入し、酵素の発現と精製を行った。得られた変異体

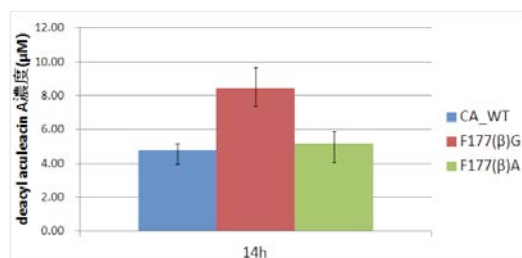


図 3. 野生型 CA と変異体 CA のアクレアシン A 分解活性. 野生型および変異体の精製酵素をアクレアシン A と反応させて、14 時間経過後にフルオロスカミンを用いて脱アシル体濃度を測定した。

CA および野生型 CA について、GL-7-ACA およびアクレアシン A を基質として活性測定を行った。その結果、CA 変異体 F177(β)G は、GL-7-ACA に対する活性が低下し、アクレアシン A に対する活性の増大が検出された (図 3)。

CA 変異体 F177(β)G をベースとして、さらに結合ポケットを深くするような複数の CA 変異体の立体構造モデルを作製した。これらのモデルと基質とのドッキング計算を行った結果、F177(β)G/M145(α)A (CAAC1) と F177(β)G/M145(α)A/Y149(α)V (CAAC2) の二つの変異体は、F177(β)G に比べて、アクレアシン A に対してさらに良好なドッキングエネルギーを与えた。そこで、これらの変異体遺伝子を、すでに作製済みの F177(β)G 変異体遺伝子をテンプレートとし、変異プライマーを用いた PCR を行って作製した。これらの遺伝子を使って変異体酵素の合成と精製を行い、活性を測定したところ、顕著な活性の増大が認められた (図 4、表 1)。

これらの結果は、AAC と β ラクタムアシラーゼの基質認識機構の違いを解明し、本研究で用いたモデリングとドッキングの手法が、アシラーゼ酵素の変異体設計に有効であることを示す。

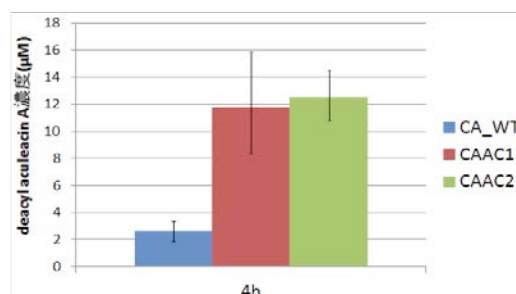


図 4. 野生型 CA および変異体 CA のアクレアシン A 分解活性. 野生型および変異体 CA をアクレアシン A と反応させ、4 時間後の蛍光強度を測定し、脱アシル体濃度を測定した。

	GL-7-ACA			aculeacin A		
	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($mM s^{-1}$)	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($mM s^{-1}$)
CA_WT	0.2	3.8	19	8.0	0.029	0.0036
CAAC1	0.8	1.7	2.1	0.4	0.025	0.063
CAAC2	0.5	1.9	3.9	0.3	0.025	0.083

表 1. 酵素の動力学パラメーター

CA のアミノ酸置換により、GL-7-ACA に対する活性は減少したが、アクレアシン A に対する活性は上昇した。

4.4 AACの異種発現

深在性真菌症治療薬 micafungin は糸状菌 *Coleophoma empetri* F-11899 株が生産する FR901379 のアシル側鎖を放線菌由来のアシラーゼを用いて脱アシル化し、最適化されたアシル側鎖を有機合成により化合させて生産されている。この製造工程は、*C. empetri* F-11899 株と放線菌の発酵培養と、脱アシル体を原料にした多段階工程で行われている。この多段階工程を簡略・効率化することができれば環境負荷やコスト削減が期待できる。本研究では脱アシル体を直接生産できる *C. empetri* F-11899 株の取得を目的として、放線菌からアシラーゼ遺伝子をクローニングし、*C. empetri* F-11899 株に導入し、脱アシル体直接生産株の取得を試みた。しかしながら、脱アシル体の生産は確認できなかった。この原因として、放線菌由来アシラーゼ遺伝子配列は GC 含量が糸状菌のそれらと比べて高く、またコドンの選択性が放線菌とカビでは異なることが予想された。そこで、放線菌由来のアシラーゼ遺伝子配列を *C. empetri* F-11899 株のコドンに最適化した人工アシラーゼ遺伝子を作成し *C. empetri* F-11899 株に導入した。人工アシラーゼ遺伝子を発現プラスミドに導入し ATMT (*Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation) 法により形質転換した。脱アシル体直接生産株のスクリーニングを行った結果、変異糸状菌株で micafungin 原体に対するアシラーゼ活性の発現を確認することが出来た。

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 4 件)

S. Ueda, M. Kinoshita, F. Tanaka, M. Tsuboi, S. Shimizu, N. Oohata, M. Hino, M. Yamada, Y. Isogai, S. Hashimoto, Strain selection and scale-up fermentation for FR901379 acylase production by *Streptomyces* sp. No. 6907, *J. Biosci. Bioeng.* 112, 409-414, 2011

S. Ueda, T. Shibata, K. Ito, N. Oohata, M. Yamashita, M. Hino, M. Yamada, Y. Isogai, S. Hashimoto, Cloning and expression of FR901379 acylase gene from *Streptomyces* sp. No. 6907, *J. Antibiot.* 64, 169-175, 2011

N. Itoh, K. Isotani, M. Nakamura, K. Inoue, Y. Isogai, Y. Makino, Efficient synthesis of optically pure alcohols by asymmetric hydrogen-transfer biocatalysis: application of engineered enzymes in a 2-propanol-water medium, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 1075-1085, 2012

Y. Isogai, Y. Sunakawa, M. Yamada, S. Hashimoto, Modeling and docking of cephalosporin acylase for evaluation of the computational methods, *Bulletin Toyama Pref. Univ.* 22, 28-33, 2012

[学会発表] (計 6 件)

境井千佳子, 山田雅人, 織野陽介, 磯貝泰弘, 橋本正治, 糸状菌 *Coleophoma empetri* F-11899 の FR901379 非生産株の T-DNA 挿入変異箇所の解析, 第 11 回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2011 年 9 月, 東京

磯貝泰弘, 山田雅人, 橋本正治, 抗生物質製造酵素のモデリングによる有用変異体設計, 富山産官学金交流会, 2011 年 11 月, 富山

境井千佳子, 山田雅人, 織野陽介, 大内卓也, 鶴海泰久, 磯貝泰弘, 橋本正治, Echinocandin B 生産菌と非生産同種菌における NRPS 遺伝子と生産能の関連性, 第 64 回日本生物工学会大会, 2012 年 10 月, 神戸

中谷和也, 山田雅人, 大内卓也, 磯貝泰弘, 橋本正治, 糸状菌 *Coleophoma empetri* F-11899 株への人工アシラーゼ遺伝子の導入, 第 12 回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2012 年 11 月, 名古屋

中山和毅, 山田雅人, 西田洋巳, 磯貝泰弘, 3D モデリングを利用した抗生物質アシラーゼの変異体設計, 第 13 回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2013 年 11 月, つくば市

Y. Isogai, K. Yamamoto, H. Imamura, Design and syntheses of de novo heme proteins with an α/β fold, 第 52 回日本生物物理学会年会, 2014 年 9 月, 札幌

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯貝 泰弘 (ISOGAI YASUHIRO)
富山県立大学・工学部・生物工学科・准教授
研究者番号: 00201920

(2) 連携研究者

山田 雅人 (YAMADA MASATO)
富山県立大学・工学部・生物工学科・助教
研究者番号: 40448692

(3) 連携研究者

橋本 正治 (HASHIMOTO SEIJI)
富山県立大学・工学部・生物工学科・教授
研究者番号: 20423832