

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790492

研究課題名（和文） オーラシンアルカロイドが示す強い抗菌活性とその利用に向けた研究

研究課題名（英文） Research for the utilization of strong antibiotic activity of aurachin alkaloid

研究代表者

安武 義晃（YASUTAKE YOSHIAKI）

産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：20415756

研究成果の概要（和文）：抗生物質の探索は、多剤耐性菌や新たな病原菌への備えとして重要であり、特に既存の分子骨格とは異なる新規化合物の発見・創成は大きな意義がある。本研究では、放線菌 *Rhodococcus erythropolis* JCM6824 株が合成する新規抗菌物質であるオーラシン RE の強い抗菌活性発現に重要な役割を果たすシトクロム P450（RauA）の構造機能解析を行った。その結果、RauA はオーラシン類のキノリン環窒素を水酸化する活性を持ち、この水酸基の付加によって強い抗菌活性が生まれることが明らかとなった。また、RauA 遺伝子をノックアウトした菌株から抽出された不活性オーラシン RE 前駆体を用い、その不活性物質と RauA との複合体結晶構造の解析を行った。解析の結果、RauA のヘムポケット内にオーラシンが結合している状態が明確に観察され、キノリン環窒素の水酸化を可能とする RauA の基質認識メカニズムを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：It is important to search for novel antibiotics in order to prepare for the emergence of multi-drug resistant and/or new pathogens. In particular, antibiotics having a different molecular skeleton are needed to effectively battle such pathogens. In this study, we performed structural and functional analyzes of the cytochrome P450 RauA conferring strong antibiotic activity on aurachin RE, a novel antibiotic isolated from actinomycete *Rhodococcus erythropolis* JCM6824. It was revealed that RauA catalyzes hydroxylation of N atom of quinoline ring of aurachin skeleton. Also, the crystal structure of RauA was determined in complex with inactive aurachin RE precursor lacking N-hydroxyl group, which was isolated from Δ rauA mutant of *R. erythropolis*. As a result, structural mechanism of aurachin binding for N-hydroxylation by RauA was elucidated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、細菌学（含真菌学）

キーワード：抗生物質、シトクロム P450、結晶構造、オーラシン

1. 研究開始当初の背景

抗生物質の探索および開発は、多剤耐性菌や新たな病原菌への備えとして現在でも重要であり、とりわけ新規骨格を持つ抗菌物質の発見・創成は大きな意義がある。先行研究において、北川らは一般には抗生物質生産菌として認知されていない放線菌 *Rhodococcus erythropolis* JCM6824 株から新規抗菌物質を単離し、オーラシン RE と命名した。オーラ

シン類はキノリン環およびフェルネシル基からなる自然界で極めて稀な物質であり、その骨格がビタミン K（メナキノン）に類似することから、バクテリアの呼吸鎖を阻害し抗菌活性を発現すると考えられている（図 1）。オーラシン類は 1980 年代に *Rhodococcus* とは進化的に類縁関係にない細菌 *Stigmatella aurantiaca* からのみ発見されており、水酸化パターンの違いによりいくつかのアナログ

が知られるが、その中でオーラシン RE は最も強い抗菌活性を示すことが知られている。オーラシンの生合成経路は完全には明らかになっていない一方で、*R. erythropolis* が持つある P450 遺伝子 (*rauA*) がオーラシン類の抗菌活性発現に重要な役割を担っていることが示されていた。

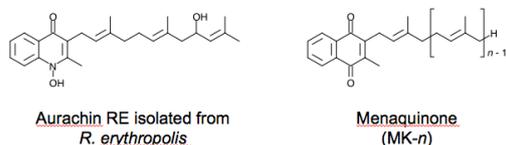


図1 オーラシン RE とメナキノンの構造

2. 研究の目的

本研究では、新規抗生物質として魅力的な *R. erythropolis* JCM6824 株が生産するオーラシン RE およびその生合成遺伝子に着目し、オーラシン RE の抗菌活性発現に必須である生合成酵素 (P450 *RauA*) の構造および機能解析を行うことを目的とした。これにより、オーラシン骨格に強力な抗菌活性能を付加する構造的特徴の解明が期待される。さらにこれら構造機能解析により得られた情報を基に、計算機化学および蛋白質工学技術を利用し、抗菌活性が付与された新たなキノリンアルカロイド物質の探索へと研究を展開することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 不活性オーラシン前駆体の抽出

RauA 蛋白質をコードする遺伝子 *rauA* を破壊した *R. erythropolis* 変異株を大量培養し、培地中に蓄積したオーラシン様物質を HPLC により精製し、取得した。取得した物質が抗菌活性を示さないことを確認するとともに、NMR 法により構造決定を行った。これら実験は、研究協力者である北川航博士 (産総研) および葛山智久博士 (東京大学) のサポートのもと行った。

(2) P450 *RauA* の組換え大量発現・精製

rauA 遺伝子は、*NdeI* および *XhoI* 制限酵素サイトをを用いて pET26 に挿入し、C 末端側にヒスタグ (His₆) が融合するように発現ベクターの構築を行った。発現ベクターを用いて大腸菌 BL21(DE3) を形質転換し、IPTG を用いて *RauA* の発現を誘導した。培地にはヘム前駆体 (5-アミノレブリン酸) および FeSO₄ を添加し、ヘムを含有した active なホロ酵素が大量に生産できるように最適化を行った。遠心分離によって菌体を回収し、破碎バッファに再懸濁後、ソニケーションによって菌体を破碎、Ni アフィニティクロマトグラフィー (HIS-SELECT) に供した。イミダゾール

グラジエントにより目的蛋白質を溶出後、陰イオン交換クロマトグラフィー (DEAE Sepharose)、ゲル濾過クロマトグラフィー (sephacryl S-100) によりさらなる精製を行った。精製サンプルは SDS PAGE によりほぼ単一バンドを示した。このサンプルを各種アッセイ、結晶化に用いた。サンプルの濃度は一酸化炭素結合スペクトルアッセイにより求めた。

(3) 基質結合スペクトルアッセイ

精製 *RauA* および不活性オーラシン RE 前駆体を混合し、*RauA* のヘム鉄に由来する吸収スペクトル変化を紫外可視分光光度計 (JASCO V-630) によってモニターした。420 nm および 390 nm 付近の吸収変化と前駆体物質濃度から、*RauA* と前駆体物質の親和性を推定した。

(4) *in vitro* 水酸化アッセイ

精製 *RauA* により不活性オーラシン前駆体が抗菌活性のあるオーラシン RE に変換されるかどうか、*in vitro* での酵素変換反応を行った。酵素反応に必須な *RauA* への電子伝達蛋白質として、P450 assay に一般的に使用される市販のハウレンソウ由来フェレドキシンおよびフェレドキシン還元酵素を用いた。NADPH 再生系としてグルコース脱水素酵素およびその基質のグルコースを添加した。NADPH を添加し反応をスタートさせ、30°C で 2-5 min ほどインキュベートした。酢酸エチルを添加して反応を停止させ、目的の反応産物の抽出を行った。反応産物は HPLC により解析した。また、前駆体濃度を変化させ、Michaelis-Menten カイネティクスに従い、 K_m および V_{max} を算出した。

(5) 結晶化

精製 *RauA* を約 20 mg/mL にまで濃縮し、シッティングドロップ蒸気拡散法によって結晶化を行った。結晶化前にモル比において数倍量の精製前駆体物質と混合し、基質複合体を形成させ、結晶化を行った。初期結晶化スクリーニングおよび結晶化条件の最適化実験を行った結果、MES バッファ pH6.5 および PEG20000 を含む条件で単結晶を得た。

(6) 結晶構造解析

得られた *RauA* の結晶はシンクロトロン放射光施設 Photon Factory (つくば市) において X 線回折実験を行い、回折データの収集を行った。得られたデータは HKL2000 等のソフトウェアによって結晶空間群の決定、回折スポットの積分、回折強度のスケールリングを行った。構造解析は P450 BioI の座標モデルを利用した分子置換法により行った。分子置換法はプログラム MOLREP を用い、モデルの

原子座標・温度因子の精密化にはプログラム REFMAC5 を利用した。

4. 研究成果

(1) RauA の機能解析

①オーラシン RE 前駆体の分離・構造決定

R. erythropolis *rauA* 破壊株を大量培養し、培地中に蓄積したオーラシン様物質を HPLC により精製、取得した。阻止円形成実験により、取得した物質が抗菌活性を示さないことを確認し、また NMR による構造解析により、本前駆体物質が、キノリン環の窒素が水酸化されていない物質であることが確認された。これにより、オーラシン類の抗菌活性がキノリン環の窒素が水酸化されることで発現すること、また RauA がこの窒素の水酸化反応を触媒することが示唆された。

②基質結合スペクトルアッセイ

一般に P450 分子は、ヘム鉄の基質結合ポケット側に水が配位子として結合し、420 nm 付近に強い吸収を示す (low-spin state)。一方、基質結合ポケットに基質が進入すると、この水分子は追い出され、390 nm 付近に吸収のピークが移動する (high-spin state)。よって基質と P450 を混合し、スペクトル変化を測定することで、基質との親和性を解析することが可能となる。精製 RauA 溶液に対してオーラシン RE 前駆体を添加したところ、421 nm の吸収が減少し、代わって 387 nm の吸収が増大することが観察され、オーラシン RE 前駆体は RauA に結合親和性を持つことが確認された。基質濃度を変化させながらスペクトル変化を計測し、解離定数を見積もったところ、 $K_d = 120$ nM と非常に高い親和性を示した。RauA がオーラシン骨格に対して高い特異性を持つことが示された。

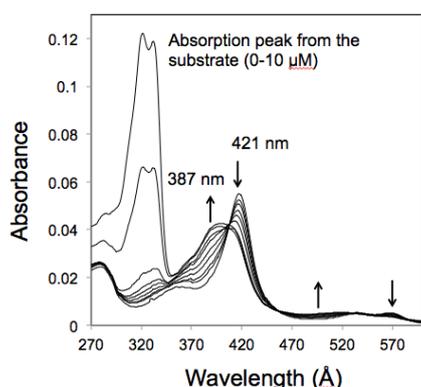


図2 オーラシン RE 前駆体を用いた基質結合スペクトルアッセイ

③in vitro でのオーラシン変換実験

次に、in vitro で精製 RauA、ハウレンソウ由来フェレドキシン・フェレドキシン還元酵素を用いて反応系の再構成を行い、オーラシ

ン RE 前駆体を基質として酵素反応を進行させ、反応生成物の解析を HPLC により行った。結果、RauA 存在下においてオーラシン RE が生成することを確認した (図3)。このことから、RauA はオーラシン RE 前駆体を基質として認識し、キノリン環窒素を水酸化する反応を触媒し、最終産物であり、かつ強い抗菌活性を示すオーラシン RE に変換することが明確となった。また、前駆体濃度を変化させて反応速度を算出し、Michaelis-Menten の式に従ってカインティックパラメータを求めた結果、 $V_{max} = 4.0 \pm 0.45$ (min^{-1})、 $K_m = 0.82 \pm 0.12$ (μM)であった。

オーラシン生合成遺伝子クラスターの構造は *Stigmatella* と *Rhodococcus* で大きく異なっており、*Stigmatella* には RauA に相当する P450 は存在しない。オーラシンの抗菌活性発現に重要なキノリン窒素の水酸化に関わる蛋白質は両者で異なっており、収斂的に獲得されたものであると考えられる。

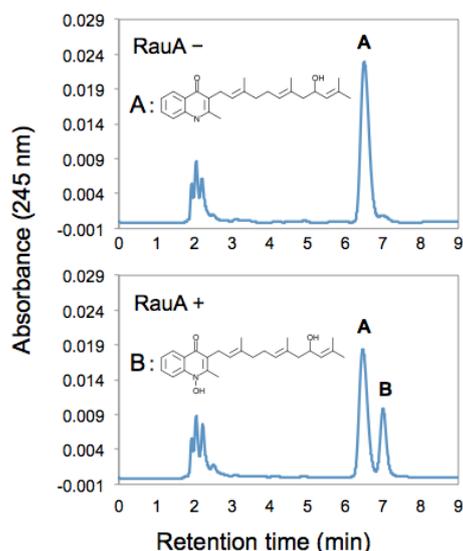


図3 in vitro 再構成系におけるオーラシン変換実験の結果

(2) RauA の結晶構造と基質認識機構

①結晶化および構造解析

RauA の結晶は基質非存在下でも得られたが、良質なデータを収集することが可能な単結晶を得る事が難しかった。一方、オーラシン RE 前駆体と複合体を形成させることで、良質な回折パターンと分解能を示す結晶を得る事に成功した。結晶は空間群 $P2_1$ に属し、2.2 Å 分解能までの回折を与えた。構造解析に用いたデータの結晶学パラメータとモデル精密化の統計を表1に示す。

表1 結晶学的パラメータとモデル精密化の統計

Beamline	PF BL-5A
Resolution (Å)	50-2.19 (2.31-2.19)
Space group	$P2_1$
Unit cell (Å, deg.)	$a = 41.5, b = 100.0, c = 52.3,$ $\beta = 108.7$
R_{merge}	0.056 (0.335)
$I/\sigma(I)$	11.4 (3.0)
Completeness (%)	99.5 (99.1)
Redundancy	3.6 (3.5)
Phasing method	Molecular replacement
Starting model	P450 BioI (30% sequence identity)
R_{work}	0.216
R_{free}	0.263
No. atoms	3,203
Average B (Å ²)	55.7

②RauA の全体構造

RauA は、典型的な P450 フォールドを形成し、分子のほぼ中心に heme、その近傍の基質結合ポケットに基質であるオーラシン RE 前駆体に相当する電子密度を観察した (図4)。DALI server を用いた立体構造相同検索の結果、ビタミン D 水酸化酵素 (P450 Vdh)、エリスロマイシン水酸化酵素 (P450 EryK) 等と構造的に相同であった。しかし、これら P450 との間でも、アミノ酸配列の相同性も 30% 前後、主鎖 C α 炭素同士の平均二乗偏差 (RMSD) は 2 Å 以上の値であった。実際に、これら P450 の構造は同一のフォールドを共有しながらも、部分的には大きく歪んでおり、特に基質結合サイトを形成する通称 BC ループ、FG ヘリックスと呼ばれる領域は大きく異なる構造をとっていた。

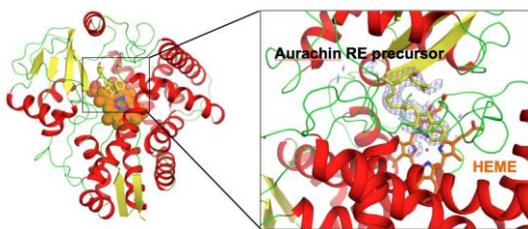


図4 RauA の全体構造と基質結合サイト

③基質結合サイトの詳細

基質結合ポケットにはオーラシン RE 前駆体に相当する明瞭な電子密度を観察し、モデルを構築することができた (図5)。結合したオーラシン RE 前駆体は、そのキノリン環をヘムのポルフィリン環と平行になるように結合し、Lys とキノリン環のカルボニル酸素が水素結合を形成していた。また、ヘム鉄とキノリン環窒素との間に水に相当するピ

ークが観察され、水と窒素との間にも水素結合があると考えられた。一般に基質が結合した場合、ヘム鉄の水は追い払われ、完全な high-spin state へ移行する分子が多い。しかしながら、RauA の場合、水は完全に追い払われていない。この事実はスペクトルアッセイにおいて、基質結合状態においても 420 nm 付近の吸収ピークが消失しないことと矛盾しない。さらなる構造変化が触媒反応の進行のために必要であると考えられる。一方、ファルネシル基はカーリングした構造をとり、疎水性アミノ酸からなるポケットに収まっていた。ファルネシル側鎖に相当する電子密度は、キノリン環と比較して多少不明瞭であり、ポケット内で複数のコンフォメーションをとっている可能性がある。キノリン環においては、ポルフィリン環のπ電子スタッキング相互作用、および複数の水素結合が見られることから、キノリン環単独、もしくはこの部位を含むアナログ物質に対しても RauA は活性を示し、水酸化反応を触媒できるかもしれない。

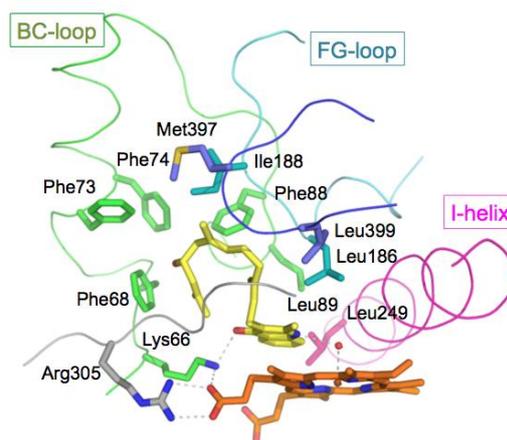


図5 基質結合サイトの詳細

(3) まとめ・課題

今後、RauA を用いたオーラシンアナログ物質の水酸化により、同様に抗菌活性を持つ物質を創成することができるか、さらに強い抗菌活性を付加することができるか探索する必要がある。予備的実験の結果、ファルネシル基を簡略化した新規物質において、RauA がその物質に結合能を示す事、また窒素の水酸化で抗菌活性が生まれる事を確認している。

RauA の機能解析に関しては ChemBioChem 誌に受理され掲載が決まっている (下記参照)。また RauA の結晶構造に関する論文は現在執筆中である。

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1件)

- ① 北川航、尾崎太郎、西岡大樹、安武義晃、波多美弥子、西山 真、葛山智久、田村具博、Cloning and heterologous expression of the aurachin RE biosynthesis gene cluster afford a novel cytochrome P450 for quinoline N-hydroxylation. *ChemBioChem*, 査読有、Vol. 14, 2013, 印刷中
DOI: 10.1002/cbic.201300167

〔学会発表〕(計4件)

- ① 安武義晃、北川航、西岡大樹、田村具博、オーラシン類に強い抗菌活性を付与するシトクロムP450 RauAの構造機能解析、物構研サイエンスフェスタ、2013年03月14日、エポカルつくば(茨城県)
- ② 安武義晃、北川航、西岡大樹、尾崎太郎、西山真、葛山智久、田村具博、Structural and functional analysis of a novel cytochrome P450 RauA responsible for conferring antibiotic activity on aurachin alkaloid. A Joint Meeting of the Asian Crystallographic Association (AsCA), Society of Crystallographers in Australia and New Zealand (SCANZ) and the BRAGG Symposium, 2012年12月04日、アデレードコンベンションセンター(オーストラリア)
- ③ 北川航、安武義晃、田村具博、Intraspecies competition by antibiotics in *Rhodococcus erythropolis* strains. International Symposium on Microbial Ecology, 2012年08月24日、ベラセンター・コペンハーゲン(デンマーク)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安武 義晃 (YASUTAKE YOSHIAKI)

産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：20415756