

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460119

研究課題名(和文) 抗結核薬D-サイクロセリンの生合成遺伝子を利用した創薬研究

研究課題名(英文) Application of D-cycloserine (an anti-tubercular agent) biosynthetic genes to drug production

研究代表者

熊谷 孝則 (Kumagai, Takanori)

広島大学・医歯薬保健学研究院(薬)・准教授

研究者番号：70274058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抗結核薬D-サイクロセリン(D-CS)の生合成遺伝子(dcsC, dcsD, dcsEおよびdcsG)を導入した大腸菌を用いて、D-CS自己耐性遺伝子(dcsJ)を共発現させること、および、宿主大腸菌の代謝工学的的手法による改変を通じて、大腸菌を宿主としたD-CSの高生産システムの構築に成功した。また、D-CSの生合成に関するDcsAおよびDcsGタンパク質について、それらの酵素機能を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the present study, high level heterologous production system of an anti-tubercular agent, D-cycloserine (D-CS), by *Escherichia (E.) coli* was established through co-expression of the four D-CS biosynthetic genes (dcsC, dcsD, dcsE and dcsG) and a self-resistance gene, dcsJ, in combination with metabolic engineering of the *E. coli* host. In addition, enzymatic functions of DcsA and DcsG involved in the D-CS biosynthesis were clarified by using recombinant proteins expressed in *E. coli* and purified.

研究分野：微生物薬品学

キーワード：抗結核薬 D-サイクロセリン 遺伝子破壊 代謝工学 異種生産

1. 研究開始当初の背景

D-サイクロセリン (D-CS) は、放線菌 *Streptomyces (S.) lavendulae* などにより生産される抗生物質であり、抗結核薬として実用的に用いられる。私は、D-CS 生産菌 *S. lavendulae* ATCC11924 から、世界に先駆けて D-CS 生合成遺伝子クラスターのクローニングに成功し、D-CS 生合成経路を提案するとともに [], 遺伝子破壊実験等を遂行することにより、D-CS 生合成経路を図 1 に示すとおり明らかにした。

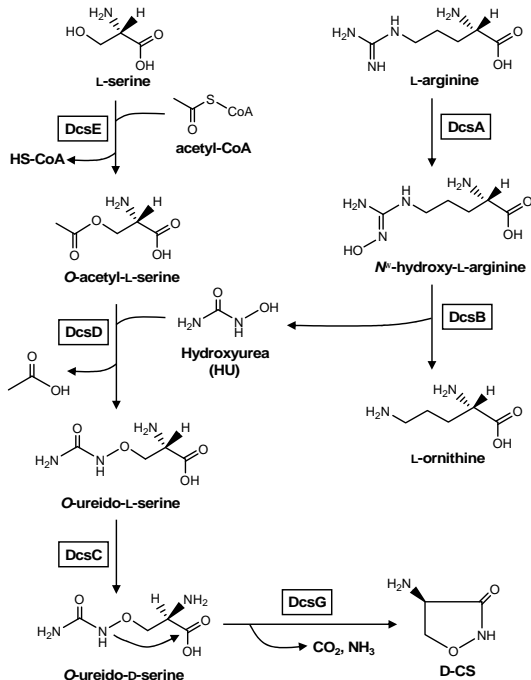


図1 D-CSの生合成経路

D-CS は少数の遺伝子産物で生合成されることから、生合成遺伝子を導入することにより、大腸菌を宿主とした D-CS 生産が可能であると考えられた。そこで、4 つの生合成遺伝子 (*dcsC*, *dcsD*, *dcsE* および *dcsG*) を連結したベクター pET-21a(+)/*dcsEDCG* を大腸菌に導入し、L-セリンとヒドロキシウレア (HU) を基質として D-CS 生産を試みた結果、大腸菌を宿主とした D-CS 生産に初めて成功したものの、その生産性は D-CS 生産菌 *S. lavendulae* ATCC11924 の 1/10 程度であった。

2. 研究の目的

(1) D-CS 生産性の向上

pET-21a(+)/*dcsEDCG* を保有する大腸菌の生育菌体を用いた場合、D-CS の生産性は D-CS 生産菌の 1/10 程度であった。そこで、休止菌体を用いた系による D-CS 生産を行い、

D-CS 生産性が向上するか否か検討する。

4 つの生合成遺伝子に加え、D-CS の排出を担うと考えられるタンパク質をコードする *dcsJ* を共発現させることにより、D-CS 生産性の向上を試みる。

D-CS の生合成中間体である O-アセチル-L-セリンのプール増大を狙い、染色体 DNA 上に存在する *cysJ*, *cysK* および *cysM* を破壊した大腸菌を作製し、これらを宿主とすることにより D-CS 生産性の向上を試みる。

(2) 放線菌を宿主とした抗癌剤 HU の生産系の構築

D-CS の生合成経路において、L-アルギニンから一連の反応を経て生成する HU は、慢性骨髄性白血病などの治療に用いられる抗癌剤である。これまで、微生物を宿主とした HU の生産は報告されていないことから、HU の生成に関与する *dcsA* および *dcsB* を放線菌 *S. lividans* 66 に導入することにより、L-アルギニンから HU を生産する系を構築する。

(3) DcsA の解析

これまで、遺伝子破壊および組換えタンパク質を用いた実験により、DcsA は L-アルギニンの水酸化に関与するヘムタンパク質であることを明らかにしているが [], *in vitro* における DcsA の活性は検出していない。そこで、*in vitro* における DcsA 活性の検出を試みる。

(4) DcsG の解析とその応用

D-CS 生合成の最終ステップを触媒する DcsG について、その速度論的解析を行うとともに、D-アミノ酸および D-アミノ酸誘導体を基質として、それらの環状化体の生成を試みる。

3. 研究の方法

(1) *cysJ*, *cysK*, *cysM* 破壊大腸菌株の作製

大腸菌 BL21(DE3) 株の *cysJ*, *cysK* および *cysM* の単独破壊株 ($\Delta cysJ$, $\Delta cysK$ および $\Delta cysM$)、二重破壊株 ($\Delta cysJ\Delta cysK$, $\Delta cysJ\Delta cysM$ および $\Delta cysK\Delta cysM$)、および三重破壊株 ($\Delta cysJ\Delta cysK\Delta cysM$) は、Red/ET recombination 法により作製した。

(2) 休止菌体による D-CS 生産

D-CS 生産用ベクターを保有する大腸菌を所定時間培養後、10 mM のリン酸カリウムバッファー (pH 7.2) に OD = 1.0 となるように懸濁し、2.5 mM の L-セリンおよび HU 存在下、

28°C にて 4 時間 D-CS 生産を行った。

(3) pET-21a(+)/*dcsEDCGJ* の構築

pET-21a(+)/*dcsEDCG* における *dcsG* の下流に, *dcsJ* を XbaI/SpeI カセット法により連結し, pET-21a(+)/*dcsEDCGJ* を構築した。

(4) D-CS の定量

D-CS の検出は, 陽イオン交換カラムを用いた HPLC により行い, 内部標準法により D-CS 濃度を算出した。

(5) HU 生産用放線菌の作製

dcsA および *dcsB* 遺伝子を発現ベクター pIJ8600 に挿入し, pIJ8600/*dcsAB* を構築後, 接合伝達法により *S. lividans* 66 に導入することで, *S. lividans* 66::pIJ8600/*dcsAB* を作製した。

(6) HU の検出

S. lividans 66::pIJ8600/*dcsAB* による HU 生産の確認は, TLC により行った。

(7) DcsA および DcsG の発現および精製

DcsA および DcsG の発現は, pET-21a(+)/ベクターを用いて行い, 各タンパク質はニッケルアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

(8) DcsA および DcsG の酵素機能解析

DcsA および DcsG の酵素機能解析は, 反応生成物を HPLC 解析することにより行った。

4. 研究成果

(1) D-CS 生産性の向上

まず, pET-21a(+)/*dcsEDCG* を保有する大腸菌を用いて, 休止菌体による D-CS 生産を試みた結果, 生育菌体を用いた系と比べ, 約 3 倍生産性が向上した。そこで, 以下の検討は全て, 休止菌体を用いた生産系により行った。

次に, *dcsJ* の共発現による効果を検討した。その結果, pET-21a(+)/*dcsEDCGJ* を保有する大腸菌の D-CS 生産性 ($660 \pm 31 \mu\text{M}$) は, pET-21a(+)/*dcsEDCG* を保有する大腸菌のそれ ($350 \pm 20 \mu\text{M}$) に比べ, 有意に向上することが明らかになった。

続いて, 宿主大腸菌 BL21(DE3) の染色体 DNA に存在する *cysJ*, *cysK* および *cysM* 遺伝子の破壊効果を検討した。2 種の D-CS 生産用ベクターを, 作製した 7 つの遺伝子破壊株 (ΔcysJ , ΔcysK , ΔcysM , $\Delta\text{cysJ}\Delta\text{cysK}$, $\Delta\text{cysJ}\Delta\text{cysM}$, $\Delta\text{cysK}\Delta\text{cysM}$, $\Delta\text{cysJ}\Delta\text{cysK}\Delta\text{cysM}$) に導入し, D-CS の生産性を調査した。その結果, いずれ

の D-CS 生産用ベクターを用いた場合でも, $\Delta\text{cysJ}\Delta\text{cysK}$ を宿主とした時, 親株に比べ, 有意に D-CS 生産性が向上した。D-CS 生産用ベクターとして pET-21a(+)/*dcsEDCGJ*, 宿主として $\Delta\text{cysJ}\Delta\text{cysK}$ 株を用いた場合, D-CS 生産性は $980 \pm 57 \mu\text{M}$ となり, D-CS 生産菌である *S. lavendulae* ATCC11924 の生産性 ($930 \pm 36 \mu\text{M}$) に匹敵するまで向上させることができた。

(2) 放線菌を宿主とした抗癌剤 HU の生産

dcsA および *dcsB* 遺伝子を保有する *S. lividans* 66::pIJ8600/*dcsAB* を作製し, HU 生産を試みたが, 検討した条件下において, HU の生産は認められなかった。

(3) DcsA の解析

DcsA はヘムタンパク質であることから, その活性発現には電子伝達系が必要であると考えられた。そこで, ホウレン草由来のフェレドキシン, フェレドキシン NADP+レダクターゼおよび NADPH 再生系 (グルコースおよびグルコースデヒドロゲナーゼ) の存在下, L-アルギニンを基質として, DcsA 活性の検出を試みた。HPLC 解析の結果, L-アルギニンから *N*⁰-ヒドロキシ-L-アルギニンの生成が認められたことから, DcsA は新規の L-アルギニン水酸化酵素であることを明らかにすることができた。

(4) DcsG の解析とその応用

精製した組換え DcsG を用いて速度論的解析を行った結果, 基質である *O*-ウレイド-D-セリンに対する K_m 値は $10 \pm 1 \text{ mM}$, k_{cat}/K_m は $210 \pm 30 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であると算出された。また, 50 mM の *O*-ウレイド-D-セリン存在下, ATP に対する K_m 値を求めた結果, $73 \pm 8 \mu\text{M}$ であった。

続いて, 数種の D-アミノ酸および D-アミノ酸誘導体を基質として, DcsG による環状化反応を行った。その結果, *O*-ウレイド-D-セリンには劣るものの, D-ホモシステインが良好な基質となることが明らかになり, D-ホモシステインチオラクトンを生成させることができた。

< 引用文献 >

Kumagai, T., Koyama, Y., Oda, K., Noda, M., Matoba, Y., and Sugiyama, M., Molecular cloning and heterologous expression of a biosynthetic gene cluster for the antitubercular agent D-cycloserine produced by *Streptomyces lavendulae*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 54,

2010, 1132-1139.

Kumagai, T., Takagi, K., Koyama, Y., Matoba, Y., Oda, K., Noda, M., and Sugiyama, M., Heme protein and hydroxyarginase necessary for biosynthesis of D-cycloserine, *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2012, 3682-3689.

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)

Kumagai, T., Ozawa, T., Tanimoto, M., Noda, M., Matoba, Y., and Sugiyama, M., High level heterologous production of D-cycloserine by *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 査読有, 81, 2015, 7881-7887.

DOI: 10.1128/AEM.02187-15

Uda, N., Matoba, Y., Oda, K., Kumagai, T., and Sugiyama, M., The structural and mutational analyses of O-ureido-L-serine synthase necessary for D-cycloserine biosynthesis, *FEBS J.*, 査読有, 282, 2015, 3929-3944.

DOI: 10.1111/febs.13386

Uda, N., Matoba, Y., Kumagai, T., Oda, K., Noda, M., and Sugiyama, M., Establishment of an *in vitro* D-cycloserine-synthesizing system by using O-ureido-L-serine synthase and D-cycloserine synthetase found in the biosynthetic pathway, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 査読有, 57, 2013, 2603-2612.

DOI: 10.1128/AAC.02291-12

[学会発表](計 10 件)

的場康幸, 宇田成利, 熊谷孝則, 杉山政則: D-サイクロセリン合成酵素 DcsG の構造生物学的研究, 第 67 回日本生物工学会大会, 2015 年 10 月 26 日~28 日, 鹿児島

古川裕貴, 的場康幸, 柳澤幸子, 宇田成利, 工藤真子, 熊谷孝則, 小倉尚志, 杉山政則: D-サイクロセリン生合成に関わるアルギニン水酸化酵素の構造と性質, 第 9 回バイオ関連化学合同シンポジウム, 2015 年 9 月 10 日~12 日, 熊本

熊谷孝則, 小澤智紀, 的場康幸, 野田正文, 杉山政則: *cysJ* および *cysK* 遺伝子の二重破壊大腸菌株の使用による D-サイクロセリン生

産性の向上, 2015 年度日本放線菌学会大会, 2015 年 9 月 7 日~8 日, 富山

古川裕貴, 的場康幸, 柳澤幸子, 宇田成利, 工藤真子, 熊谷孝則, 小倉尚志, 杉山政則: D-サイクロセリン生合成に関わるアルギニンヒドロキシラーゼの構造化学的研究, 第 25 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 2015 年 5 月 30 日~31 日, 長崎

熊谷孝則, 小澤智紀, 青田達明, 的場康幸, 野田正文, 杉山政則: 大腸菌を宿主とした抗結核薬 D-サイクロセリン高生産システムの開発 第 66 回日本生物工学会大会, 2014 年 9 月 9 日~11 日, 札幌

小澤智紀, 熊谷孝則, 青田達明, 的場康幸, 野田正文, 杉山政則: *cysJ*, *cysK* および *cysM* を破壊した大腸菌による D-サイクロセリン高生産システムの構築, 2014 年度日本放線菌学会大会, 2014 年 6 月 19 日~20 日, つくば

宇田成利, 的場康幸, 小田康祐, 熊谷孝則, 野田正文, 杉山政則: O-ウレイド-L-セリン合成酵素 DcsD の活性発現に重要なアミノ酸残基の特定, 第 65 回日本生物工学会大会, 2013 年 9 月 18 日~20 日, 広島

熊谷孝則, 高木紀抄, 的場康幸, 野田正文, 杉山政則: D-サイクロセリンの生合成において N^o-ヒドロキシ L-アルギニンの生成に関与する *dcsA* 遺伝子の解析, 第 65 回日本生物工学会大会, 2013 年 9 月 18 日~20 日, 広島

宇田成利, 的場康幸, 小田康祐, 熊谷孝則, 野田正文, 杉山政則: X 線結晶構造に基づいた D-サイクロセリン合成酵素 DcsG の触媒機構の解明 2013 年度日本放線菌学会大会, 2013 年 9 月 5 日~6 日, 広島

熊谷孝則, 青田達明, 的場康幸, 野田正文, 杉山政則: 大腸菌を宿主とした抗結核薬 D-サイクロセリンの生産, 2013 年度日本放線菌学会大会, 2013 年 9 月 5 日~6 日, 広島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊谷 孝則 (TAKANORI KUMAGAI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院

・准教授

研究者番号: 70274058