

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410174

研究課題名(和文) アミノグリコシド抗生物質の構造多様性の鍵を握るラジカルSAM酵素の精密反応解析

研究課題名(英文) Functional analysis of radical SAM enzymes involved in the biosynthesis of aminoglycoside antibiotics

研究代表者

工藤 史貴 (KUDO, FUMITAKA)

東京工業大学・理学院・准教授

研究者番号：00361783

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)：アミノグリコシド抗生物質は、放線菌などの土壌細菌が生産する抗生物質である。多種多様な構造を有する化合物が知られており、共通的な生合成中間体が特異修飾反応を受けて構築されることが考えられている。その鍵を握る酵素として、様々なラジカル反応を触媒するラジカルSAM酵素が関わりと予想した。機能解析の結果、ネオマイシン生合成におけるラジカルSAMエピメリ化酵素NeoNとアプラマイシン生合成におけるラジカルSAM脱水酵素が、それぞれの抗生物質生合成における特異な修飾反応を触媒することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Aminoglycoside antibiotics contain a unique aminocyclitol that is decorated with various aminosugars leading to a wide variety of structures including kanamycin and neomycin. A common biosynthetic scheme of kanamycin and neomycin has been elucidated, when this project started. Thus, unique enzymatic modifications of common biosynthetic intermediates were speculated to be involved in the individual biosynthetic machinery. Radical S-adenosyl-L-methionine (SAM) enzymes that are often encoded in the biosynthetic gene clusters are supposed to be responsible for such unique reaction, because radical SAM enzyme generates 5'-deoxyadenosyl radical that can trigger various radical reactions in living system. In current research program, I focused on the functional analysis of radical SAM epimerase NeoN in neomycin B biosynthesis and radical SAM dehydratase AprD4 in apramycin biosynthesis. Consequently, we could clarify the functions of NeoN and AprD4 and propose plausible reaction mechanisms.

研究分野：生物有機化学

キーワード：天然物化学 生合成 酵素 アミノグリコシド抗生物質 ネオマイシン アプラマイシン ラジカルSAM 酵素 鉄硫黄クラスター

1. 研究開始当初の背景

アミノグリコシド抗生物質は、特徴的なサイクリトールに多種多様なアミノ糖が複数連結した抗生物質の総称である。放線菌代謝産物として単離されたカナマイシンやストレプトマイシンなどが有名であり、結核菌などの真正細菌に対して抗菌活性を示す。

アミノグリコシド抗生物質の大多数は、特徴的なアミノサイクリトールとして 2-デオキシストレプタミン (2DOS) を有している (図 1)。2DOS が 2,6-ジアミノ糖と 3-アミノ糖で配糖化された化合物は擬似三糖型のカナマイシン類として知られている。2DOS が 2,6-ジアミノ糖とリボースで配糖化された化合物は擬似三糖型のリボスタマイシン類として知られている。また、リボスタマイシンのリボース部位が 2,6-ジアミノ糖で配糖化された化合物は擬似四糖型のネオマイシン類として知られている。

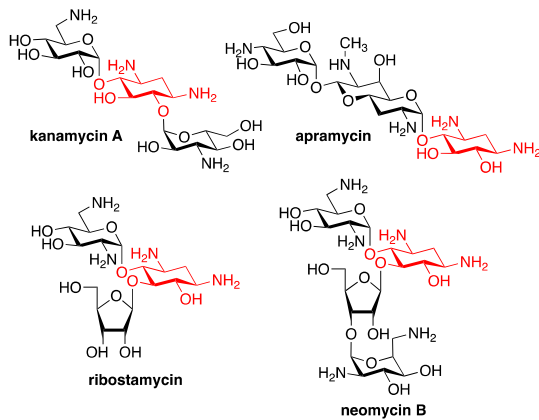


図 1. アミノグリコシド抗生物質 (赤の部位が 2DOS)

申請者の研究グループでは 2DOS 生合成機構を解明し、それを起点として、アミノグリコシド抗生物質の全生合成機構解明を目指し研究を行ってきた。そして、本研究課題時までに、カナマイシン類とネオマイシン類に共通する生合成酵素の機能を解明してきた (図 2)。すなわち、D-グルコース 6-リン酸から、2-デオキシ-scyllo-イノソース合成酵素により炭素六員環サイクリトールが生成し、これがアミノ基転移酵素と脱水素酵素により 2DOS へと変換される。2DOS は糖転移酵素により N-アセチルグルコサミニル化され、脱アセチル化酵素により擬似二糖型のパロマミンへと変換される。さらに、脱水素酵素とアミノ基転移酵素によりネアミンが生合成される。ネアミンが 3-アミノ糖で配糖化されるとカナマイシン B となり、リボシル化されるとリボスタマイシンとなる。リボスタマイシンは、さらにネオマイシン系擬似四糖型のアミノグリコシド抗生物質の生合成に特徴的な糖転移酵素により N-アセチルグルコサミニル化される。そして、ネアミン生合成時に用いられた脱アセチル化酵素、脱水素酵素、アミノ基転移酵素により同様に修飾されてネオマイシン C が生合成される。

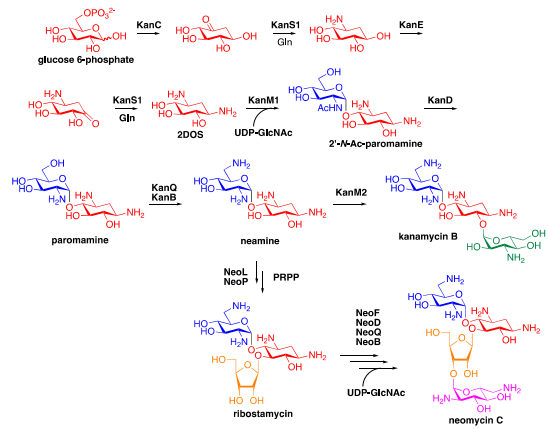


図 2. 2-デオキシストレプタミン含有アミノグリコシド抗生物質の共通的な生合成経路

アミノグリコシド抗生物質の構造多様性は、前述の共通的な生合成中間体から派生して生み出されると推定され、その特異な修飾反応は、それぞれのアミノグリコシド抗生物質の生合成遺伝子クラスターにコードされる特異酵素によって構築されると予想された。アミノグリコシド抗生物質の生合成遺伝子クラスターの多くは、ラジカル S-アデノシル-L-メチオニン (SAM) 酵素スーパーファミリーに属する酵素遺伝子を有している。ラジカル SAM 酵素は、活性部位に 4Fe-4S クラスターを有し、還元型の 4Fe-4S クラスターが還元的に SAM を開裂することで 5'-デオキシアデノシルラジカルを生成し、これにより様々なラジカル反応を触媒することが知られている (図 3)。したがって、アミノグリコシド抗生物質の生合成遺伝子クラスターにコードされるラジカル SAM 酵素も特徴的なラジカル機構により、共通的な生合成中間体の修飾に関与すると推定した。

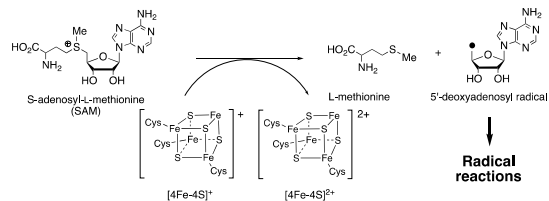


図 3 ラジカル SAM 酵素反応の初期段階

このようなラジカル SAM 修飾酵素の基質特異性を人為的に改変することで、毒性が軽減された有用性の高いアミノグリコシドを生合成することも期待される。また、そのような特徴的なラジカル SAM 酵素遺伝子をクエリーとすることで、新規アミノグリコシド抗生物質生合成遺伝子クラスターのゲノムマイニングと新規アミノグリコシド抗生物質の発見にもつながると期待される。

様々な生物種のゲノム解読が進むにつれて、数多くのラジカル SAM 酵素の存在が明らかとなっているが、その機能に関しては不明な点が多く、現在、世界中の多くの研究者がその機能解析を進めている。アミノグリコ

シド抗生物質の生合成におけるラジカル SAM 酵素の精密機能解析を行うことは、アミノグリコシド抗生物質の構造多様化機構を明らかにするだけでなく、一般的なラジカル SAM 酵素の機能解明においても重要な位置付けにあると考えられた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、アミノグリコシド抗生物質の構造多様化に参与すると推定した特異ラジカル SAM 酵素の機能解明と反応機構の解明を目指した。

(1) まず、研究基盤のあるネオマイシン生合成系におけるラジカル SAM 酵素 NeoN の機能解明と精密反応解析を起点とすることで、アミノグリコシド抗生物質の構造多様化にラジカル SAM 酵素が関与することを明確にすることにした。

(2) トブラマイシンとアブラマイシンは、パロマミンもしくはネアミンが 3' 位デオキシ化を受けて生合成されると考えられている。生合成遺伝子クラスターにコードされるラジカル SAM 酵素 AprD4 が関与すると推定されたので、その機能解析を行うことにした。

(3) さらに、他のアミノグリコシド抗生物質生合成遺伝子クラスターにコードされているラジカル SAM 酵素の機能解析を通じて、ラジカル SAM 酵素によるさらなる構造多様化機構を明らかにすることにした。

3. 研究の方法

研究対象とするラジカル SAM 酵素は、すべて大腸菌にて異種発現させて組換えタンパク質として調製する。また発現の際には、鉄硫黄クラスター生合成に参与すると知られている生合成マシナリーを強化することで、活性型の鉄硫黄クラスター含有タンパク質を調製することにした。また、酸素に極めて敏感な鉄硫黄クラスター含有タンパク質は、グローブボックス内で精製して酵素反応に用いることにした。候補として考えられたアミノグリコシド抗生物質生合成中間体は、入手可能な化合物を用いて、化学変換もしくは酵素合成により調製することにした。酵素反応生成物は、ジニトロフルオロベンゼンを用いてアミノ基をジニトロフェニル化して HPLC、および LC-ESI-MS 解析により解析した。さらに、イオン交換クロマトグラフィーにより単離して、NMR 解析により化学構造を確認することにした。

さらに、酵素触媒反応に関わると予想されたアミノ酸残基を変異させて反応解析することで、詳細な反応機構を解明することにした。また、重水素標識した基質や補酵素を用いた反応や、重水置換した緩衝液中での酵素反応解析により、反応に参与すると考えられる水素原子の動きを追跡することにした。

4. 研究成果

(1) ネオマイシン生合成におけるラジカル

SAM 酵素の解析

ネオマイシン生合成系におけるラジカル SAM 酵素 NeoN はネオマイシン C の 5''' 位をエピメリ化してネオマイシン B へと変換する酵素であることを明らかにしていたが、その反応機構の詳細は不明であった。重水置換した緩衝液中での酵素反応解析の結果、水分子と交換可能な水素原子がネオマイシン B の 5''' 位に取り込まれることがわかった(図 4)。これにより、反応点が 5''' 位であること、また、推定されるラジカル中間体がシステインのチオールやチロシンのフェノール性水酸基の水素原子を引き抜くことでエピメリ化反応が完結すると考えられた。

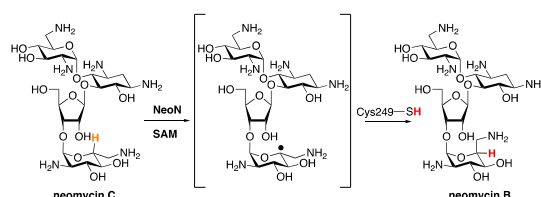


図 4. ラジカル SAM エピメリ化酵素 NeoN によるネオマイシン C からネオマイシン B へのエピメリ化

そこで、反応に参与すると推定されたシステイン残基のアラニンスキャンニングにより C249 が反応に参与することが明らかとなった。C249A 変異体を用いて酵素反応を開始し、電子スピン共鳴 (Electronic Paramagnetic Resonance, EPR) 解析を行った結果、5''' 位に生じたと考えられるラジカル中間体を検出することに成功した。これにより、ラジカル機構によりエピメリ化を触媒することが強く示唆された。また、C249A 変異体を用いた酵素反応を長時間行くと、炭素五員環サイクリトールが生成することがわかった。これは、5''' 位に生じたと考えられるラジカル中間体が β -開裂により開環し 1''' 位にラジカルが生じ、これが 5''' 位炭素と再結合することで炭素環が形成したと考えられた。この実験事実も、ラジカル酵素反応機構を支持する。

ラジカル SAM エピメリ化酵素 NeoN の構造解析を行うために、嫌気性条件下での結晶化も検討したが期待するような結晶を得ることはできなかった。そこで、ラジカル SAM 酵素などの結晶構造解析の専門家であるサウサンプトン大学の Peter Roach 教授との共同研究として、NeoN の結晶構造解析を進めている。

(2) アブラマイシン生合成におけるラジカル SAM 酵素の解析

アブラマイシン、トブラマイシン、リビドマイシンに共通する構造的特徴として 3' 位がデオキシ化されていることが挙げられる(図 1)。これらの生合成遺伝子クラスターにだけ特徴的に存在するラジカル SAM 酵素遺伝子 (AprD4, LivW) とニコチンアミノアデニンヌクレオチドリン酸 (NADPH) 依存酸化還元酵素 (AprD3, LivY) が 3' 位デオキシ化反

応に關与すると推定された。アブラマイシンとトブラマイシン生合成に共通すると考えられる擬似二糖型生合成中間体 *N*-アセチルパロマミン、パロマミン、ネアミンを候補基質として AprD4, AprD3 の組換えタンパク質を用いて酵素反応を行った (図5)。その結果、パロマミンを用いた時にデオキシ化された化合物が生成することがわかった。生成物は単離して ¹H-NMR 解析を行い、3'位がデオキシ化されたりビダミンであることを確認した。また、キラル重水素標識化した NADPH を用いて酵素反応を行った結果、*pro-S* の重水素がリビダミンに取り込まれた。この結果は、ラジカル SAM 酵素 AprD4 によって脱水反応が触媒されて、4-オキシリビダミンが生じ、AprD3 が NADPH の *pro-S* の重水素を用いてケトン還元してリビダミンを生成するという示唆を示している。さらに、重水素置換した緩衝液中での酵素反応生成物の NMR 解析の結果、3'位のエクアトリアルに重水素が取り込まれることがわかった。したがって、ラジカル SAM 酵素 AprD4 による脱水反応において、3'位にラジカルが生じて、これが立体特異的に水素原子を引き抜くことで生成物が生じることを示唆している。水とプロトン交換可能なチオールを有するシステイン残基やフェノール性水酸基を有するチロシン残基が、この反応に關与すると推定される。

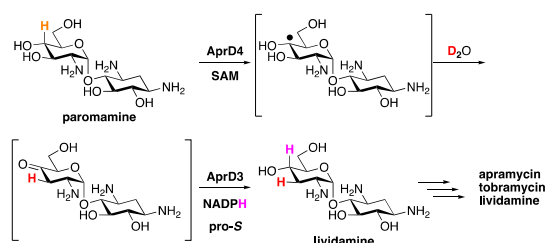


図 5. アブラマイシン生合成におけるラジカル SAM 脱水酵素 AprD4 による脱水と AprD3 による還元によるデオキシ化機構

AprD4 と AprD3 の基質特異性についても検討した (図6)。擬似三糖型カナマイシン B とカナマイシン C を基質とした場合、カナマイシン C がデオキシ化からはデオキシ化体が得られたのに対し、カナマイシン B からはほとんど得られなかった。一方、ラジカル SAM 酵素反応における副反応生成物 5'-デオシアデノシンはいずれの場合にも検出された。すなわち、AprD4 はいずれの化合物も基質として認識し脱水反応を触媒するが、AprD3 はカナマイシン C から生成する脱水化合物は受け入れるが、カナマイシン B からの脱水化合物は認識しにくいということを示唆している。この傾向は擬似二糖型のパロマミンとネアミンを用いた時も同じであった。したがって、AprD3 は、6'位が水酸基の化合物は受け入れるが、6'位がアミノ基の化合物は受け入れにくいということがわかった。また、擬似四糖型のパロモマイシンは全く変換されなかつ

た。

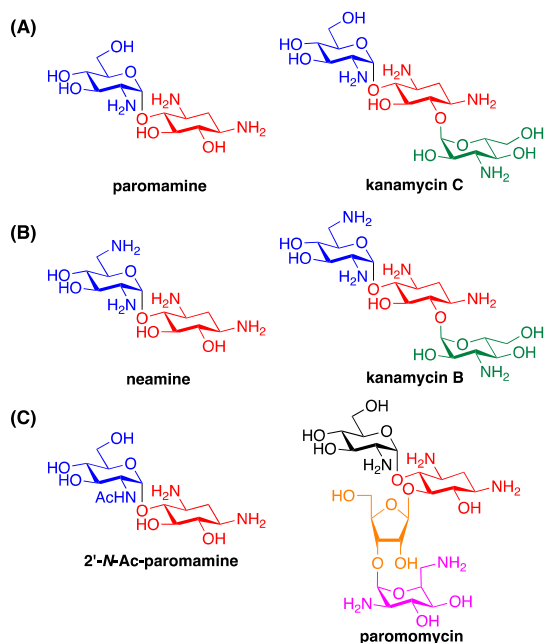


図 6. AprD4 と AprD3 の基質特異性 (A) AprD4, AprD3 によりデオキシ化された基質、(B) AprD4 により脱水を受けるものの、AprD3 による反応が進行しにくい基質、(C) AprD4 によって脱水されない基質

(3) 他のアミノグリコシド抗生物質の生合成遺伝子クラスターにコードされているラジカル SAM 酵素についてもクローニングして大腸菌にて発現させた。現在、その機能解析を進めている。

以上、本研究期間では、アミノグリコシド抗生物質の多様化の鍵を握る二つのラジカル SAM 酵素 NeoN と AprD4 の機能を明らかにした。さらに、これら酵素の反応機構を理解することができた。これにより、アミノグリコシド抗生物質の構造多様化には、それぞれの生合成において、ラジカル SAM 酵素が関わることが強く示唆された。今後は、機能道のラジカル SAM 酵素の機能解析を進め、すべてのアミノグリコシド抗生物質の生合成機構を明らかにする。また、それら酵素の結晶構造解析を進め、原子レベルで酵素反応機構を解明する。そして、これらを統合し、合成生物学などを駆使して新たな抗生物質の創製につなげる。また、ユニークなラジカル SAM 酵素をクエリーとしてゲノムマイニングを行うことで、新規構造を有するアミノグリコシド抗生物質の発見を目指す。

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. Fumitaka Kudo, Takahiro Tokumitsu, Tadashi Eguchi, Substrate specificity of radical *S*-adenosyl-L-methionine dehydratase AprD4 and its partner reductase AprD3 in the

C3'-deoxygenation of aminoglycoside antibiotics, *J. Antibiot.*, **70**[4], 423-428 (2017). 査読有
DOI: 10.1038/ja.2016.110

2. Fumitaka Kudo, Tadashi Eguchi, Aminoglycoside Antibiotics: New Insights into the Biosynthetic Machinery of Old Drugs, *Chem. Rec.*, **16**[1], 4-18 (2016). 査読有
DOI: 10.1002/tcr.201500210

3. Fumitaka Kudo, Shota Hoshi, Toshiaki Kamachi, Tadashi Eguchi, Characterization of a Radical S-Adenosyl-L-methionine Epimerase, NeoN, in the Last Step of Neomycin B Biosynthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**[39], 13909-13915 (2014). 査読有
DOI: 10.1021/ja507759f

〔学会発表〕(計6件)

1. Fumitaka Kudo, Radical SAM enzymes involved in natural product biosynthesis, 18th International Symposium on the Biology of Actinomycetes (ISBA18), 26 May 2017, Jeju (Korea).

2. Fumitaka Kudo, Takahiro Tokumitsu, Tadashi Eguchi, Functional analysis of radical SAM enzyme AprD4 and reductase AprD3 in the C3'-deoxygenation in apramycin biosynthesis, Directing Biosynthesis V, 22 March 2017, Coventry (United Kingdom).

3. Fumitaka Kudo, Shota Hoshi, Tadashi Eguchi, Reaction mechanisms of radical SAM enzymes involved in the biosynthesis of aminoglycoside antibiotics, PacifiChem2015, 19 December 2015, Honolulu, HI (USA).

4. 徳光 貴洋、工藤 史貴、江口 正、アミノグリコシド抗生物質アプラマイシン生合成における C-3' 位デオキシ化機構、日本化学会第 95 春季年会 (2015) 2015 年 3 月 29 日、日本大学船橋キャンパス (千葉県・船

橋市)

5. Fumitaka Kudo, Radical SAM Enzymes Involved in the Biosynthesis of Aminoglycoside Antibiotics, The 9th International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia under Asian Core Program (ICCEO-9), 3 December 2014, Eastin Hotel, Petaling Jaya (Malaysia).

6. 工藤 史貴、星 正太、Hilda Sucipto、江口 正、アミノグリコシド抗生物質の生合成におけるラジカル活性化を契機とする修飾酵素反応機構、第 56 回天然有機化合物討論会 (2014) 2014 年 10 月 16 日、高知県立県民文化ホール、高知市 (高知県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 史貴 (Kudo Fumitaka)
東京工業大学・理学院・准教授
研究者番号: 00361783