

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460132

研究課題名(和文)カルボキシル基形成に関与する多機能型チトクロームP450酵素の機能解明とその応用

研究課題名(英文)Functional analysis and its application of multifunctional cytochrome P450 enzymes forming carboxyl group

研究代表者

安齊 洋次郎 (ANZAI, Yojiro)

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号：20318299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：放線菌 *Micromonospora rosaria* IF013697 が生産する16員環マクロライド抗生物質 rosamicin の生合成において2段階の酸化反応(C-20位の酸化、アルコール酸化)に関与する多機能型P450酵素 RosC が更なるC-20位への酸化により rosamicin を20-carboxyrosamicin に変換することを明らかにした。また、RosC の酸化反応の制御に関与する可能性をもつアミノ酸残基の1つとして176番目のロイシンを見出した。

研究成果の概要(英文)：The multifunctional cytochrome P450 enzyme RosC catalyzes a two-step, hydroxylation and alcohol oxidation, oxidation reaction to form the C-20 formyl group in the biosynthesis of a 16-membered macrolide antibiotic rosamicin produced by *Micromonospora rosaria* IF013697. In this study, we confirmed that RosC has another oxidation activity, which a formyl group at C-20 of rosamicin is converted into a carboxyl group. Moreover, random mutation analysis was also performed for rosC gene using error-prone PCR, and Leucine-176 of RosC is one of amino acid residue controlling of oxidation reaction.

研究分野：微生物化学

キーワード：抗生物質 P450酵素 酸化反応

1. 研究開始当初の背景

抗生物質の生合成では、酸化、メチル化、アシル化、糖転移などの修飾反応が抗生物質の母核の形成とともに進められ、抗生物質の構造および生物活性の多様化に重要な役割を担っている。このような抗生物質生合成に関与する各種修飾酵素の研究は世界中で行われている。抗生物質生合成におけるチトクローム P450 酵素(P450 酵素)の酸化反応は水酸化、脱水素、エポキシ化など多種多様であり、これらを複数回触媒する多機能型 P450 酵素の機能については未解明な部分も多い。

(1)放線菌 *Micromonospora rosaria* IF013697 が生産する 16 員環マクロライド抗生物質 rosamicin の生合成に関与する P450 酵素 RosC は rosamicin の C-20 位の水酸化とアルコール酸化によりホルミル基を形成する多機能型 P450 酵素である(引用文献)。一方、Rosamicin 生産株の培養物から rosamicin の C-20 がカルボキシル基である 20-carboxyrosamicin の生産が確認されているが、その酸化反応を触媒する P450 酵素は同定されていない(図1)。

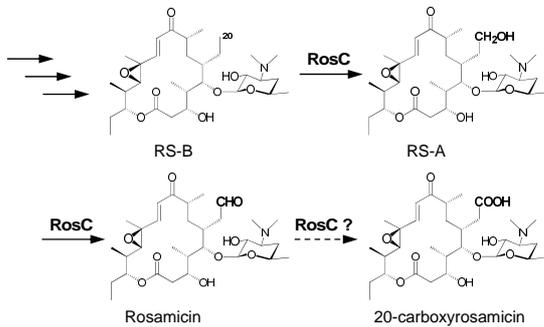


図1 Rosamicin 生合成における多機能型 P450 酵素 RosC の3段階の酸化反応

(2)放線菌株由来の抗生物質の生合成に関与すると予想される P450 酵素のアミノ酸配列の系統解析では、マクロライド抗生物質生合成でのカルボキシル基形成に関与する RosC はポリエン系抗生物質 amphotericin B (図2) や nystatin A1 のカルボキシル基形成に関与する AmphN や NysN とは別のクラスターを形成する(図3)。一方、amphotericin B や nystatin A1 を生産する放線菌菌株の *amphN* 遺伝子や *nysN* 遺伝子破壊株がカルボキシル基をもたない各生合成中間体を生産することは確認されているが(引用文献)、AmphN や NysN のカルボキシル基形成機構に関する研究の報告はない。

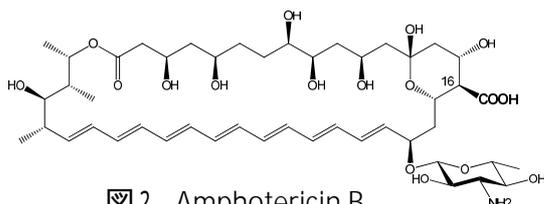


図2 Amphotericin B

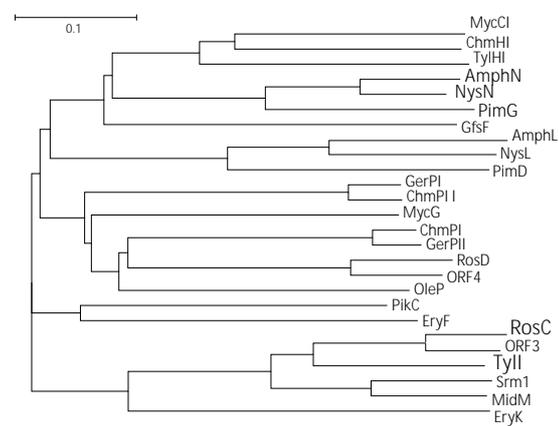


図3 マクロライド生合成に関与するP450酵素の系統解析

2. 研究の目的

(1)16 員環マクロライド抗生物質 rosamicin の生合成に関与する P450 酵素 RosC が触媒する酸化反応により rosamicin の C-20 位のホルミル基をカルボキシル基に変換し、20-carboxyrosamicin への変換する活性をもつことを確認する。

(2)(1)の酸化反応を含めた P450 酵素 RosC による rosamicin の C-20 位の3段階の酸化反応(酸化、アルコール酸化、酸化、図1)に関与する RosC のアミノ酸残基を特定する。そして、各種変異型 *rosC* 遺伝子を *rosC* 遺伝子破壊株に導入し、それら変異遺伝子の生産株での有効性を確認する。

(3) ポリエン系抗生物質 amphotericin B の生合成に関与する AmphN のカルボキシル基の形成機構を解明し、変異型 *amphN* 遺伝子を *amphN* 遺伝子欠損変異株に導入し、それら変異遺伝子の生産株での有効性を確かめる。

3. 研究の方法

(1) *M. rosaria* IF013697 がもつ P450 酵素遺伝子 *rosC* と 16 員環マクロライド抗生物質 tylosin 生産菌 *Streptomyces fradiae* ATCC 19609 がもつ P450 酵素遺伝子 *tyII* をそれぞれ PCR で増幅した DNA 断片を P450 酵素発現ベクター pCYPcamAB に挿入した pRSCcamAB と pTLIcamAB を *E. coli* BL21(DE3)に導入し、*E. coli* TPMB0002 と TPMB0004 を作成した。IPTG、5-アミノレブリン酸により P450 酵素発現誘導をしたこれら菌株の菌液に rosamicin を添加して微生物変換をした。変換物質は、精製後、HR-FAB-MS (JMS-700, JEOL)、¹H-, ¹³C-NMR (JNM-ECP500, JEOL)により構造解析をおこなった。

(2) P450 酵素遺伝子 *rosC* のランダム変異には MEGAWHOP 法を用いた。エラープローン PCR でランダム変異を導入された *rosC* 領域をもつ pRSCcamAB を *E. coli* BL21(DE3)に導入し、*rosC* ランダム変異ライブラリーを構築した。これらライブラリーの菌株は RS-B、

rosamicin を基質とした微生物変換試験にて評価した。

(3) PCR で増幅した *amphN* 上流域 (1.2 kb) と下流域 (1.1 kb) の間に *oriT-neo* を挿入した断片をもつ pGMdNneo9-7 (*neo'*, *thio'*) を *E. coli* S17-1 から接合伝達により amphotericin B 生産株 *Streptomyces nodosus* NBRC 12895 に導入した。接合株の選択には neomycin と thiostrepton を用いた。

4. 研究成果

(1) 合計 8 mg の rosamicin を pRSCcamAB をもつ *E. coli* TPMB0002 を用いて微生物変換を行ったところ rosamicin よりも分子量が 16 大きい物質を 3.6 mg 得た。本物質を NMR 解析したところ、rosamicin の C-20 位のホルミル基がカルボキシル基に変換した 20-carboxyrosamicin であることを確認した (図 4)。16 員環マクロライド抗生物質 tylosin の生合成に関与する P450 酵素 TyII は放線菌株由来の抗生物質の生合成に関与すると予想される P450 酵素のアミノ酸配列の系統解析では RosC と同じクラスターを形成する (図 3)。また、TyII についても rosamicin の微生物変換試験を行ったところ、20-carboxyrosamicin への変換が確認された (図 4)。16 員環マクロライド抗生物質 rosamicin の生合成に関与する P450 酵素 RosC は rosamicin の C-20 位の 3 段階の酸化反応 (酸化、アルコール酸化、酸化、図 1) に関与する多機能型 P450 酵素であることが確認された (雑誌論文)。

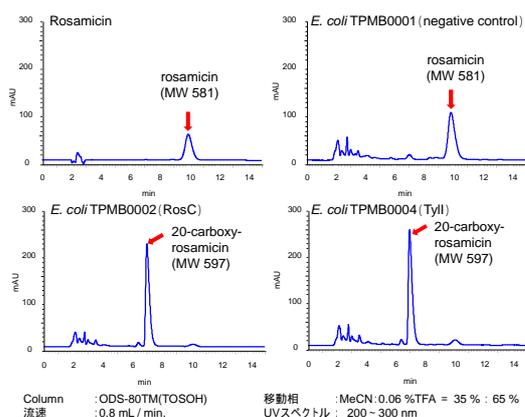
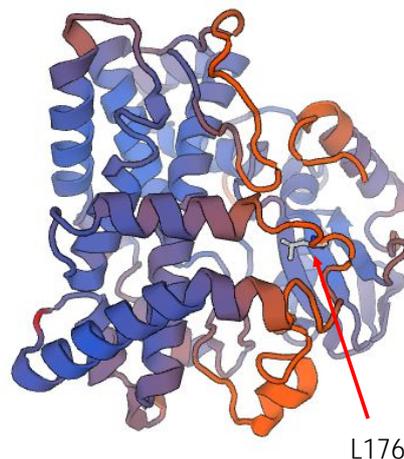


図4 RosC および TyII による rosamicin 微生物変換試験

(2) RosC の 3 段階の酸化反応に関与するアミノ酸残基の同定のためにエラーブローン PCR を用いたランダム突然変異を行った。合計 80 のライブラリー菌株を RS-B、rosamicin を基質とした微生物変換試験にて評価したところ、2 株で変換能の低下が観察された。そのうち 3 段階の酸化反応を触媒する活性を有するものの、変換効率が低下するアミノ酸変異が生じたクローンとして RM21、1 段階目の水酸化の触媒能を保持しつつ、2 段階目以降の酸化反応の触媒能を欠失するアミノ酸変異が生じたと考えられるクローンとして

RM30 を取得した。これらクローンは 5 カ所の塩基で変異が確認されており、RM30 で確認された変異から生じるアミノ酸残基の変異 L176Q は基質認識や基質結合時の構造変化に関連しているとされる FG ループ領域で変異が生じていることが Swiss model により予測した RosC の立体構造から推定された (図 5)。今後、更なる変異クローンの取得とその変異の解析を行うことにより、多機能型 P450 酵素の複数回の酸化反応を自由に制御することが可能となり、新たな抗生物質のデザインや生産法の開発に新たな展開を生み出すことが出来ると考える。



L176Q

図5 P450 酵素 RosC の Swiss model

(3) ポリエン系抗真菌薬 amphotericin B のカルボキシル基形成機構に関与すると考えられている P450 酵素 AmphN の遺伝子欠損株の作成を試みた。*amphN* 遺伝子の上流域と下流域の領域を PCR で増幅した DNA 断片で neomycin 耐性遺伝子 *neo* と接合開始点 *oriT* を挟み込んだ pGMdNneo9-7 を *E. coli* S17-1 から接合伝達により amphotericin B 生産株 *S. nodosus* NBRC 12895 に導入した。得られた neomycin 耐性株はすべて thiostrepton にも耐性を示したため、単胞子分離法による thiostrepton 感受性株の取得を行った。thiostrepton 感受性株として得られた 2 株の単胞子分離株では amphotericin B の生合成中間体の生産は確認されなかった。PCR 等でこれら 2 株の *amphN* 遺伝子の欠損の状況を調べたところ、2 株とも *amphN* 遺伝子の欠損は確認され、更にその周辺領域においても欠損が認められた。

< 引用文献 >

Iizaka Y, Higashi N, Ishida M, Oiwa R, Ichikawa Y, Takeda M, Anzai Y, Kato F., Function of cytochrome P450 enzymes RosC and RosD in the biosynthesis of rosamicin macrolide antibiotic produced by *Micromonospora rosaria*, Antimicrob Agents Chemother. 57:1529-31, 2013

Byrne B, Carmody M, Gibson E, Rawlings B, Caffrey P., Biosynthesis of deoxyamphotericins and deoxyamphoteronolides by engineered strains of *Streptomyces nodosus*. Chem Biol, 10:1215-24, 2003
Brautaset T, Sletta H, Degnes KF, Sekurova ON, Bakke I, Volokhan O, Andreassen T, Ellingsen TE, Zotchev SB., New nystatin-related antifungal polyene macrolides with altered polyol region generated via biosynthetic engineering of *Streptomyces noursei*, Appl Environ Microbiol, 77:6636-43, 2011

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)

Iizaka Y, Takeda R, Senzaki Y, Fukumoto A, Anzai Y., Cytochrome P450 enzyme RosC catalyzes a multistep oxidation reaction to form the non-active compound 20-carboxyrosamicin, FEMS microbiology letters, 査読有, 364, 2017
doi:10.1093/femsle/fnx110, 2017

[学会発表](計 5件)

飯坂洋平、金井大、鈴木智子、丸山結菜、福本敦、安齊洋次郎、多機能型 P450 酵素 RosC の多段階酸化反応に關与するアミノ酸残基の同定、日本薬学会、2018 年
Iizaka Y, Fukumoto A, Kato F, Anzai Y, Effective Production of New Rosamicin Derivatives by Engineered *Micromonospora rosaria* Mutants with Disruption of a Cytochrome P450 Gene and Introduction of the D-mycinose, Biosynthetic Genes, 18th International Symposium on the Biology of Actinomycetes, 2017
飯坂洋平、福本敦、安齊洋次郎、加藤文男、16 員環マクロライド抗生物質 rosamicin 生合成の酸化反応経路の解明と *Micromonospora rosaria* 遺伝子組み換え株による新規 rosamicin 誘導体の生産、日本生物高分子学会、2016 年
飯坂洋平、先崎勇貴、武田里奈、福本敦、安齊洋次郎、多段階酸化反応を触媒するシトクロム P450 酵素 RosC と TyII のカルボキシル基形成機構の解析、日本放線菌学会、2016 年
飯坂洋平、先崎勇貴、福本敦、加藤文男、安齊洋次郎、Rosamicin 生合成におけるカルボキシル基形成に關与する多機能型 P450 酵素 RosC の機能解析、日本薬学会、2016 年

[図書](計 0件)

[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.lab.toho-u.ac.jp/phar/microbio/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

安齊 洋次郎 (ANZAI, Yojiro)
東邦大学・薬学部・教授
研究者番号：20318299

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()