

ブチロシンの特異生合成酵素遺伝子の機能解析と応用研究

工藤 史貴

(東京工業大学大学院 理工学研究科)

研究の目的

アミカシンやアルベカシンは、カナマイシンやジベカシンの 2-デオキシストレプトタミン (DOS) 部位に、ブチロシンに特徴的な 4-アミノ-2-ヒドロキシ酪酸 (AHBA) 側鎖を有する半合成抗生物質であり、耐性菌に対して有効である。本研究では、ブチロシン生合成中に特徴的に存在すると予想されたアミノ酸側鎖生合成システムを利用して、生合成工学的にこれら化合物を生産できるかどうか検討することにした。また、このような特異的な生合成システムは酵素化学的に興味深く、新たなタイプの反応を触媒する酵素機能を解明できるだけではなく、カナマイシンをはじめとする各種アミノグリコシド抗生物質生産菌に本生合成遺伝子群を導入することで、発酵技術によりアミカシンなど耐性菌に有効な抗生物質を生産できると期待された。

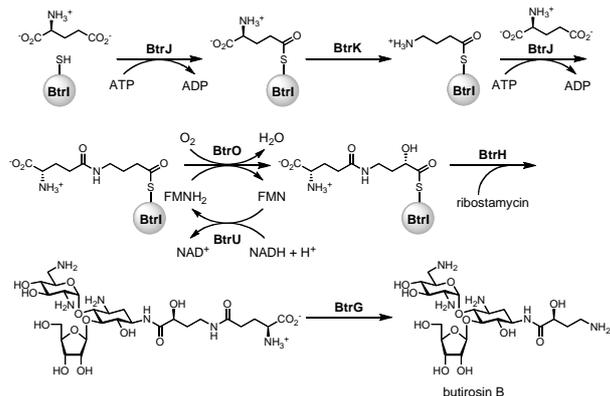
方法

我々はこれまでに、ブチロシンとネオマイシン生合成遺伝子の比較の結果、共通構造であるリボスタマイシンの生合成に関与する生合成遺伝子を推定し、その大部分の機能を酵素化学的に明らかにしてきた。一方、ブチロシン生合成遺伝子クラスターに特異的に存在する *btrF*, *G*, *H*, *I*, *J*, *K*, *N*, *O*, *U* が AHBA の生合成と転移反応に関与すると予想された。このうちの 5 つの酵素遺伝子 *btrI*, *J*, *K*, *O*, *U* が AHBA 生合成に関与することは、英国の研究グループにより 2005 年に報告にされた^[1]。したがって、残された 4 つの遺伝子 *btrF*, *G*, *H*, *N* が AHBA の転移反応に関与すると推定された。本研究では、これら遺伝子を全て大腸菌で発現させて予想される酵素反応を検討すると同時に、遺伝子破壊により生合成に関与することを確かめることにした。

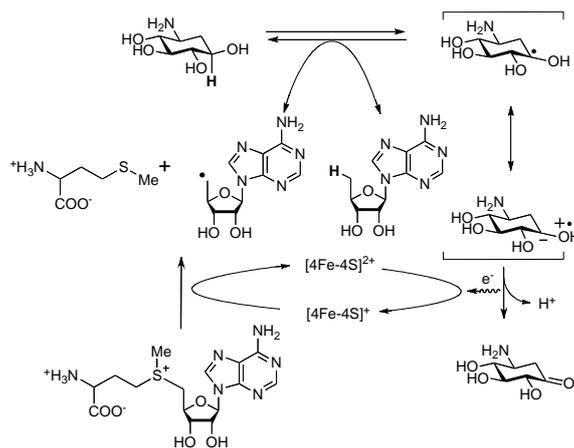
結果

まず、*BtrF*, *G*, *H*, *N* を大腸菌にて大量発現させ、可溶性タンパク質として得ることに成功した。また、AHBA 転移反応の基質も供給するために *btrF*, *G*, *H*, *I*, *J*, *K*, *O*, *U* 遺伝子を一つのプラスミドに組み込むなど、様々な発現系を構築した。しかしながら、*BtrH* による γ -L-glutamyl AHBA のアシル基転移酵素活性、つづく *BtrG* による γ -L-glutamyl シクロトランスフェラーゼ活性が英国のグループにより報告されてしまった^[2, 3]。

一方、*BtrN* に関しては、その遺伝子破壊株を作製した結果、抗生物質非



生産性を示したことから、ブチロシンの生合成に関与することが明らかとなった^[4]。さらに生合成中間体による相補実験の結果、DOS生合成中の2-デオキシ-*scyllo*-イノサミン脱水素酵素反応に関わると推定された。BtrNは、そのアミノ酸配列からラジカルSAM (S-adenosyl-L-methionine) タンパク質と考えられたが、どのように生合成に関わるのかが興味を持たれたため、大腸菌で発現させた組換え酵素を用いて酵



BtrN reaction mechanism

素反応解析を進めた。嫌気条件下で細胞破碎、BtrNを精製し、二価の鉄イオンと硫化ナトリウム存在下でBtrNの鉄硫黄クラスターを再構成、さらに亜ジチオン酸ナトリウムで還元することにより、活性を有すると考えられる還元型の鉄硫黄クラスターを有するタンパク質を調製することができた。次に、基質として考えられる2-デオキシ-*scyllo*-イノサミン (DOIA) とSAMを混合し、生成すると考えられるアミノジデオキシ-*scyllo*-イノソース (アミノ-DOI) をオキシム誘導体へと変換して酵素反応を追跡した。その結果、嫌気条件下でSAMを添加した場合のみ本酵素活性が検出された。また本酵素反応では、1等量のDOIAに対して1等量のSAMを消費し、等量のアミノ-DOI、5'-デオキシアデノシン、メチオンinが生成した。さらに3位重水素化DOIAを別途酵素的に調製し、BtrN酵素反応に付した結果、重水素化された5'-デオキシアデノシンの生成を確認することができた。すなわち、本酵素反応ではまず、ラジカルSAM酵素であるBtrNがSAMを還元的に開裂して5'-デオキシアデノシルラジカルを発生させ、次に、5'-デオキシアデノシルラジカルがDOIAの3位水素を引き抜きDOIAラジカル中間体を形成、最後に1電子と1プロトンを放出する酵素反応機構が推定された。さらにEPRによりBtrN反応を追跡した結果、DOIAラジカル中間体を分光学的に検出することに成功した^[4, 5]。

結論

ブチロシン生合成に特異的に存在する生合成酵素機能を解析した結果、酵素化学的に興味深いラジカルSAM脱水素酵素を機能解明することができた。本酵素に関しては、さらにEPRを用いた反応解析からラジカル機構で進行することを証明することができた。ラジカルSAM酵素は、酸素に対して極めて不安定で取扱いが困難とされており、これまで数例の機能解析に留まっていた。今回のラジカルSAM脱水素酵素BtrNの機能解明は、今後のラジカルSAM酵素の機能解析において重要な知見を与えたと考えている。一方、AHBA生合成酵素と転移酵素に関しては、英国のグループに先を越されて報告されてしまったが、本研究計画が妥当であったことを示している。これで、ブチロシン生合成遺伝子のうち機能解明されていない酵素は、先述のBtrFと、BtrNが機能解明される前にDOIA脱水素酵素として推定されていたBtrEである。これら酵素は、

未解明生合成段階であるブチロシン B から A への異性化反応に関与すると推定される。この反応もアミノグリコシドの修飾酵素反応として重要である。今後はブチロシン生合成系だけではなく、他のアミノグリコシド抗生物質生合成に見られる特異的な修飾酵素の機能解析を通じて、耐性菌にも効果の高い新たな機能を有するアミノグリコシドの創製へと展開していく。

文献

- [1] Y. Li, N. M. Llewellyn, R. Giri, F. Huang and J. B. Spencer, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 665-675.
- [2] N. M. Llewellyn, Y. Li and J. B. Spencer, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 379-386.
- [3] N. M. Llewellyn and J. B. Spencer, *Chem. Commun.* **2008**, 3786-3788.
- [4] K. Yokoyama, M. Numakura, F. Kudo, D. Ohmori and T. Eguchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15147-15155.
- [5] K. Yokoyama, D. Ohmori, F. Kudo and T. Eguchi, *Biochemistry* **2008**, *47*, 8950-8960.