

研究終了報告書

「微生物農薬が生産する抗生物質の生合成機構に関する研究」

研究期間：2020年11月～2023年3月

研究者：牛丸 理一郎

1. 研究のねらい

微生物は生態系における生存戦略のひとつとして特異な構造を持つ二次代謝産物を生産する。それらは抗菌活性や抗癌活性などの人類にとって有用な生物活性を示すことから、医薬品やそのシード化合物として利用されている。本研究では、本研究では新たに薬用天然物生合成システムを利用した創薬化学を展開するため、*Agrobacterium radiobacter* K84 によって生産されるヌクレオシド抗生物質アグロシン 84 の生合成経路に着目した。アグロシン 84 は 3'-デオキシアラビノアデニンヌクレオシドを基本骨格とし、2本のホスホラミデート結合を介して C5' 位と N6 位に側鎖としてそれぞれ、2,3-ジヒドロキシ-4-ペンタンアミドと D-グルコースを持つ。このことから *A. radiobacter* K84 は植物病原性 *A. tumefaciens* に対し高い抗菌活性を示すため生物防除剤として世界中で広く利用されている。

アグロシン 84 の生合成は *A. radiobacter* K84 が保有するプラスミド pAgK84 によってコードされることが知られているものの、その詳細は不明である。特に、アグロシン 84 に含まれる 3'-デオキシアラビノース骨格やホスホラミデート結合の生合成機構は他の天然物生合成経路においてもほとんど報告例はなく、その解明が待たれる。一方で、アグロシン 84 が標的とするアミノアシル tRNA 合成酵素は多剤耐性菌感染症治療薬の開発における重要な分子標的であることから、アグロシン 84 にみられるホスホラミデート側鎖の化学構造を多様化できれば、種々のアミノアシル tRNA 合成酵素阻害剤の創出につながると考えた。そこで本研究ではアグロシン 84 の生合成を担う酵素群の機能を同定し、それらの詳細な触媒メカニズムを明らかにする。さらに、同定したホスホラミデート合成酵素を人為的に改変することにより、本来の基質とは異なる様々なアミド基質をアデニル基との連結を可能にし、アミノアシル AMP 類縁体の網羅的合成法を確立する。

生合成経路に含まれるユニークな生合成酵素の詳細を明らかにすることで、天然物生合成システムを利用した新規物質生産を行うために必須である科学的基盤を与える。さらに、アグロシン 84 の生合成に含まれる N-アシルホスホラミデート合成酵素の触媒機能拡張は多様な側鎖構造を持つ非天然型ヌクレオチドのライブラリーを効率的に構築できるため、新規ヌクレオチド医薬品を見出すための画期的なアプローチとなることが期待され、基礎科学分野のみならず医薬品業界にも貢献するものと予想される。

2. 研究成果

(1) 概要

アグロバクテリア由来ヌクレオチド天然物であるアグロシン 84 の生合成経路の解析を行なった。特にアグロシン 84 の構造的特徴である 3'-デオキシアラビノアデニンヌクレオシドと 2本のホスホラミデート結合の形成機構に着目した。

In vitro 解析の結果から、NADPH 依存型還元酵素 AgnC2 と AgnD3 が共に 2-ケトイソカプロン酸を還元し、ロイシン酸を与えることが明らかになった。このことからこれらの酵素がアグロシン

84 の側鎖である 2,3-ジヒドロキシ-4-ペンタンアミドの形成に関わっていることが示唆された。2,3-ジヒドロキシ-4-ペンタンアミドがどのように、ヌクレオチド骨格にどのように連結されるかは未だ明らかとなっていないが、遺伝子解析の結果、機能未同定のアミノアシル tRNA 合成酵素ホモログである、AgnA あるいは AgnC が関わっていると考え、これらの酵素の大腸菌あるいはアグロバクテリア異種ホストを用いて発現と精製を行なった。加えて、機能未知酵素であったペプチダーゼがロイシル tRNA の阻害剤である Leu-AMS のアミド基を加水分解することが明らかとなった。このことから、この酵素はアミド加水分解活性を有しておりホスホラミデートの分解にも関わっていることが示唆された。従って、この酵素はアグロシン 84 の生合成酵素あるいはアグロシン 84 に対する耐性酵素としてはたらいっている可能性が考えられる。

3'-デオキシアラビノアデニンヌクレオシドの形成に関わっていると予想された、[4Fe-4S]クラスター結合型のラジカル S-アデノシル酵素の精製に成功した。しかしながら現在のところこのタンパク質の機能の同定には至っていない。

研究開始当初の研究目的であったアグロシン 84 生合成経路の解明と生合成酵素機能拡張による新規ヌクレオチド化合物の開発には至っていないものの、本研究において、アグロシン 84 生合成酵素発現系の整備といくつかの酵素機能を明らかにした。特に、新規アミド分解酵素はアグロシン 84 の生合成酵素あるいはアグロシン 84 に対する耐性酵素としては機能している可能性があり、その生物学的意義を明らかにする。

(2) 詳細

本研究ではアグロシン 84 の生合成経路の解析を行うことで、ユニークな構造要素である 3'-デオキシアラビノアデニンヌクレオシドと 2 本のホスホラミデート結合の形成機構を明らかにすることを目的とした。研究期間内にこの目的は完全には達成することができなかったものの、アグロシン 84 の生合成について重要な知見を得ることができた。以下に詳細を記す。

相同性クラスターの探索と異種発現系の構築

アグロシン 84 の生合成は *A. radiobacter* K84 が保有するプラスミド pAgK84 によってコードされることが知られているものの、その他の微生物種からの生産は報告されていない。そこで、pAgK84 がコードする生合成酵素をクエリーとして用いることで、アグロシン 84 の生合成をコードする可能性のある微生物種を探索した。その結果、根粒菌 *Ensifer* sp. ENS09 のゲノム中に pAgK84 に含まれる agn クラスターと部分的に高い相同性(70-80%)を示す遺伝子クラスター(ens)が新たに発見された。ens 遺伝子クラスターは agn クラスター内の agnA-C7 と G に対応する遺伝子を有している一方で、agn D1-F に対応する遺伝子は ens 遺伝子クラスターには含まれ例ないことが明らかとなった。このことから、agnA-C7 と G はアグロシン 84 の部分骨格である TM84 の生合成を担う遺伝子であり、agn D1-F は D-グルコースとのホスホラミデート結合形成を担う遺伝子であると示唆された。

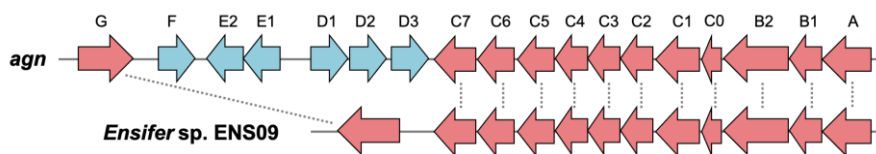


図 1. *Ensifer sp.* ENS09 の agn 相同性遺伝子クラスター

アグロシン 84 の生合成に関する情報を得るため、agn クラスターに含まれる A-C7 をクローニングし、ブロードホスト発現プラスミドである pRL662 や pCAP05 を用いて、アグロバクテリウムホスト *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 に導入した。しかしながら、遺伝子導入特異的に生産される代謝物は検出されなかった。また、CRISPR-CAS9 を用いて pAgK84 に耐性遺伝子を挿入し、同じく *A. tumefaciens* LBA440 に導入したものの、アグロシン 84 あるいは関連する代謝物は検出されなかった。アグロシン 84 の生産が検出限界を下まわっていることが原因であると考えられるため、今後は生物活性を元にアグロシン 84 の検出を試み、アグロシン 84 生産株が得られ次第遺伝子破壊実験を行い、生合成についてのより詳細な情報を得る。

ホスホラミデート側鎖形成機構の解明

pAgK84 の詳細な配列解析に基づき、分枝鎖アミノ酸生合成経路の中間体であるロイシンが 2,3-ジヒドロキシ-4-ペンタンアミド部位の前駆体であると予想した。すなわち、NADH 結合領域を持つ AgnC2 (または AgnD3) と非ヘム鉄 2-ケトグルタル酸 (2OG) 依存酵素 AgnC6 がそれぞれ 2-ケトイソカプロン酸の C2 位の還元と C3 位の水酸化を触媒し、2,3-ジヒドロキシ-4-ペンタンアミドの前駆体が生成する。アスパラギンとアンモニアの縮合反応を触媒するアスパラギニル tRNA 合成酵素が知られていることから、それと相同性を示す AgnA がアミノ酸とアンモニアからアミドを生成すると予想した。また、pAgK84 は機能未知のアミノアシル tRNA 合成酵素ホモログをコードする遺伝子 agnC1 を含んでいる。一般にアミノアシル tRNA 合成酵素はカルボン酸の AMP 化を触媒することから、AgnC1 は ATP を用いてアミドの窒素原子を AMP 化しアデノシン側鎖のホスホラミデートを構築すると仮説を立てた。

精製した酵素を用いて *in vitro* 反応解析を行った。まずはじめに、NADH (または NADPH) の存在下 2-ケトイソカプロン酸と AgnC2 を反応させたところ、予想通りロイシン酸の生成を確認した。ロイシン酸は N-クロロメチルフルタルイミドによって誘導化し、液体クロマトグラフ質量分析計 (LCMS) によって検出し、標品の保持時間とも一致した。また AgnD3 も同様に 2-ケトイソカプロン酸を還元しロイシン酸を与えることが示された。この結果から AgnC2 または AgnD3 が 2,3-ジヒドロキシ-4-ペンタンアミド部位の形成に関わっていることが示唆されたが、NADH (NADPH) 依存性還元酵素は広範な基質選択性を示すことがあるため、2-ケトイソカプロン酸が本来の基質であるか確認するため、より詳細な調査が必要である。

3'-デオキシアラビノース骨格形成機構の解明

一次代謝経路において 2'-デオキシリボヌクレオチドはリボヌクレオシドレダクターゼが触媒するリボヌクレオチドの C2' 位脱酸素化によって生成する。この反応はラジカル機構を介して進行するため、アグロシン 84 の 3'-デオキシアラビノース骨格も同様にラジカル反応によって構築される可

能性がある。したがって、pAgK84 がコードするラジカル S-アデノシルメチオニン (rSAM) 酵素 AgnC7 が C3'位脱酸素を触媒すると仮説を立てた。様々な可溶性タグを検討した結果、TF を用いた場合に、可溶性タンパク質として発現できることが明らかとなった。また、嫌気性で鉄と硫黄源によって再構成したところ4鉄4硫黄クラスターの生成が UV によって確認された。精製した酵素を用いて、SAM とアデノシン誘導体(アデノシン、AMP, ADP, ATP)を用いて様々な条件下 *in vitro* 反応を行なったが想定される脱酸素化体は検出されなかった。このことから、AgnC7 によるヌクレオチドの脱酸素化反応は生合成後期に起こっていることが考えられる。

3. 今後の展開

自身の研究としては、ACT-X の研究期間内には達成できなかった目標に向けて研究を続ける。特に、ホスホラミデート側鎖形成機構と 3'-デオキシアラビノース骨格形成機構を明らかにする。同定したホスホラミデート合成酵素を人為的に改変することにより、本来の基質とは異なる様々なアミド基質をアデニル基との連結を可能にし、アミノアシル AMP 類縁体の網羅的合成法を確立する。

本研究において開発する手法は、アミノアシル tRNA 合成酵素の反応中間体であるアミノアシル AMP の構造を模倣するホスホラミデート含有ヌクレオチドの分子構造多様化を可能にするため、新規抗生物質創出を志向した種々アミノアシル tRNA 合成酵素阻害剤の探索に貢献する。さらに、抗癌活性や抗ウイルス活性などを示すいくつかの実用的な核酸アナログが P-N 結合を有することを考えると、提案するホスホラミデート含有ヌクレオチド合成法は新規核酸アナログ製剤を見出すための新たなアプローチとなることも十分予想されるため、基礎創薬科学のみならず医薬品産業にもたらす波及効果は大きい。具体的には、今後、生合成経路の解明(2年)、酵素機能、構造、メカニズムの解明(2年)、合成化学への応用(2年)が必要であると考えられる。

4. 自己評価

研究目的は完全には達成できなかったものの、自身の今後の研究につながる結果と経験が得られた。予定通り研究が進まなかった理由としては、生合成酵素の精製に予想以上の時間と労力を費やしたこと、また、コロナ禍の影響で当初予定していた、アグロシンの過剰生産菌を海外研究者から得ることができず、*in vivo* での実験が計画通り実施できなかったことが挙げられる。本研究を推進するにあたって十分な研究環境であったため研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)には特段の問題はなかった。本研究は完成には至っていないため、現段階では研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果は限定的であると評価する。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:0件

(2) 特許出願

公開

研究期間全出願件数:0件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)
0件