

病原菌が持つメナキノン新規生合成経路の全容解明と経路特異的阻害剤の探索

●大利 徹

富山県立大学工学部生物工学科

<研究の目的と進め方>

メナキノン（ビタミン K）は、微生物にとって電子伝達系成分として生育に必須である。我々は、*Helicobacter* 属、*Campylobacter* 属、*Wolinella* 属などの病原微生物や、放線菌 *Streptomyces* 属などの微生物では、メナキノンを生合成するにもかかわらず、既知の生合成経路として知られているコリスミ酸からメナキノンに至る 5 ステップの生合成遺伝子群が全く存在しないことに気づき、その全容解明を試みている。

<2008 年度の研究の当初計画>

これまでに、新規経路は既知経路同様コリスミ酸を出発基質とするが、その後全くの別経路を経て、少なくとも機能未知の 4 つの遺伝子産物（放線菌 *Streptomyces coelicolor* の遺伝子番号、SCO4506、SCO4326、SCO4327、SCO4550）により生合成されることを明らかにした。また、これら遺伝子の破壊株を構築した結果、破壊株は何れも生育にメナキノンを要求したことから、4 つの遺伝子が新規経路に関与することも証明した。そこで今年度は、破壊株が蓄積する生合成中間体を同定するためのアッセイ系の構築と、全破壊株からの生合成中間体の同定・精製・構造決定を行うことにした。また、新規経路遺伝子の組換え酵素を用いた *in vitro* アッセイも行い新規経路の全容を解明することを目的とした。

<2008 年度の成果>

最初に、破壊株が蓄積すると期待される生合成中間体の同定を試みた。上述したように SCO4506、SCO4326、SCO4327、SCO4550 の破壊株はメナキノンを添加しないと生育できない。しかし、4 つの破壊株の内、任意の 2 つをメナキノン非存在下で混合培養した結果、程度の差はあるものの全ての組み合わせで生育が認められた。この事実は、① 4 つの遺伝子産物は、生合成上異なるステップに関与すること、② 生合成上、下流に関与する遺伝子の破壊株 | 中間体分泌菌 (secretor) | が中間体を蓄積し、生合成上、上流に関与する遺伝子の破壊株 | 中間体変換菌 (converter) | が中間体をメナキノンへと変換したと推定された。そこで、4 つの変異株をメナキノン存在下で培養した後、添加したメナキノンを酢酸エチルで抽出・除去し、残った水溶性画分を

凍結乾燥後、培地に添加し、他の 3 つの破壊株の生育が回復するか検討した。その結果、SCO4506 破壊株から調製した抽出物を添加した際、他の 3 株の生育は認められなかったが（このことは、SCO4506 が生合成上、最上流の反応に関与することを示唆する）、残りの 3 つの破壊株から調製した抽出物を加えた際、少なくとも他の 1 つの破壊株の生育が認められた。従って、これら破壊株培養液中に生合成中間体が蓄積していることが分かり、さらに 4 つの遺伝子が関与する生合成上の相対位置も SCO4506 → SCO4327 → SCO4550 → SCO4326 と決定することができた。

次に本手法を用い生合成中間体の同定、精製、構造決定を行った。最初に SCO4327 破壊株を secretor に、SCO4506 破壊株を converter に用い、SCO4327 破壊株が蓄積する中間体の単離を行った。SCO4327 破壊株をメナキノン存在下で大量培養後、溶媒による添加メナキノンの除去、各種クロマトグラフィーによる分画、SCO4506 破壊株を用いた bioassay を繰り返すことにより蓄積中間体を均一に精製することができた。NMR や MS による解析の結果、本化合物は、以前、放線菌から単離報告のある fufalosine であることが分かった（図 1- B）。

SCO4327 破壊株が fufalosine を蓄積したことから、SCO4327 産物は fufalosine を次の中間体に変換すると考えられた。そこで SCO4327 産物を His-tag タンパク質として発現・精製後、酵素 assay を行ったが予想に反し反応産物は検出できなかった。その理由は不明であるが、おそらく組換え酵素が不安定であるためと考え、高度好熱細菌である *Thermus thermophilus* HB8 株の組換え酵素を用いて assay を試みた。SCO4327 の ortholog と考えられる TTHA0556 の His-tag 組換えタンパク質を fufalosine と反応させた結果、2 つの反応産物が生成した。SCO4327 産物 / TTHA0556 産物はヌクレオシダーゼと極弱い相同性を有していたことから (e-value, 10^{-6})、これらの酵素は fufalosine の塩基部分である hypoxanthine の脱離反応を触媒すると考えられた。実際、反応産物の 1 つは hypoxanthine であることを LC-MS で確認し、もう一方の反応産物も精製後、NMR や MS による解析の結果、de-hypoxanthine (dehypoxanthinyl) fufalosine (DHFL) であることを確認した（図 1- B）。

次に上記と同様の手法で、SCO4326 破壊株を secretor に、

SCO4506 破壊株を convertor に用い、SCO4326 破壊株が蓄積する中間体の単離を行った。本中間体の蓄積量は極めて少なく、また後で分かったことであるが、中間体が不安定でアルドール縮合により容易に他の化合物に変換されることから、大量精製に苦勞したが最終的に極微量ではあるがほぼ純品を得ることができ構造を明らかにすることができた。その結果、本化合物は DHFL が環化した構造を持つ cyclic DHFL であることが分かった (図 1-B)。本化合物は、上述した混合培養の結果から、SCO4550 により DHFL から生成すると考えられた。実際、SCO4550 破壊株培養液中には微量の DHFL の蓄積が認められたことから、SCO4550 および *T. thermophilus* HB8 株の ortholog である TTHA1092 の組換え酵素を調製し DHFL との反応を行った。SCO4550/TTHA1092 は radical SAM タンパク質の特異的モチーフを持っていることから、これらのタンパク質を扱う際、通常行われる嫌気条件下での組換え酵素の精製と酵素反応を行ったが cyclic DHFL の生成は認められなかった。そこで現在、更なる反応条件の最適化、補酵素の要求性などの検討を行っている。

次に、MK 生合成上 cyclic DHFL の次の中間体の同定を行った。SCO4326 破壊株が cyclic DHFL を蓄積したことから、SCO4326 の *T. thermophilus* HB8 株の ortholog である TTHA1568 を組換え酵素として発現・精製後、cyclic DHFL と反応させた結果、特異的の反応産物が検出できた。LC-MS による解析の結果、本産物は 1,4-dihydroxy-6-naphthoate で (DHNA) あることが分かった。

<国内外での成果の位置づけ>

本研究は、申請者が気付いた独創的な研究であり、今年 Science 誌に成果を発表した。今回解明した新規経路はピロリ菌などに特異的な経路であり、乳酸菌など有用な腸内細菌群は既知経路のみを有している。従って、この新規経路の阻害剤は副作用が無い有用な抗ピロリ菌薬になると期待できる。

<今後の課題>

- ① *in vitro*による確認ができていない、futasolineが生成する初発反応 (MqnA)、DHFLからcyclic DHFL (MqnC)、および cyclic DHFLからDHNA (MqnD) への変換反応の詳細な解析
- ② 経路阻害剤の探索による抗ピロリ菌薬の開発

<成果公表リスト>

1)論文/プロシーディング

1. 0801151009

Seto, H., Jinnai, Y., Hiratsuka, T., Fukawa, M., Furihata, K., Itoh, N., and Dairi, T.: Studies on A New Biosynthetic Pathway for Menaquinone, *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 5614-5615 (2008)

2. 0812181649

Hiratsuka, T., Furihata, K., Ishikawa, J., Yamashita, H., Itoh, N., Seto, H., and Dairi, T.: An alternative menaquinone biosynthetic pathway operating in microorganisms, *Science*, 321, 1670-1673 (2008)

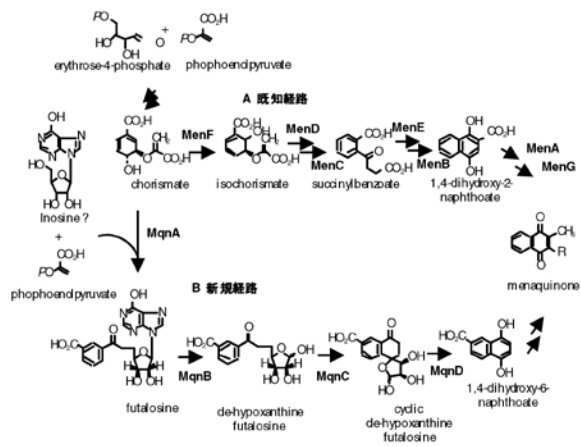


図1 メナキノンの既知、および新規経路