

# 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>

メナキノンは、人間にとっては血液凝固に必要なビタミンであり、また微生物では電子伝達系成分として生育に必須である。大腸菌や枯草菌では、メナキノンの生合成は、コリスミ酸からスクシニル安息香酸を経る経路が既に明らかにされている。筆者は、土壌微生物である *Streptomyces* 属放線菌、胃潰瘍・胃がんの原因菌として知られている *Helicobacter* 属細菌、食中毒原因菌として知られている *Campylobacter* 属細菌や *Wolinella* 属細菌では、メナキノンを生合成するにもかかわらず、既知メナキノン生合成遺伝子のオーソログが全く存在しないことに気づいた。そこで本新規経路の全容解明に向けて研究を展開している。

これまでに筆者は、

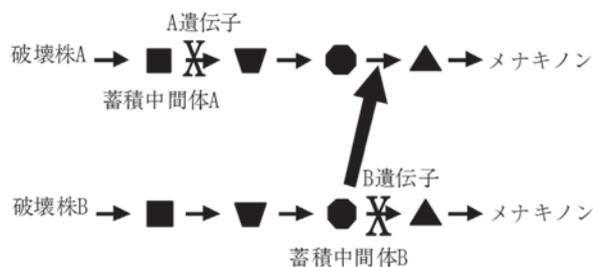
①既知メナキノン生合成経路を持つ大腸菌や枯草菌などが持たず、新規経路を有すると考えられる *Helicobacter* 属、*Campylobacter* 属、*Streptomyces* 属放線菌が共通に持つ遺伝子を、個々の菌株が持つ ORF の総当り BLAST・FASTA 解析により探索し、さらに病原性のない *Streptomyces* 属放線菌を用いて、これらの遺伝子を組換え手法により破壊した結果、少なくとも機能未知とされている 7 つの遺伝子群が新規経路に関与することを明らかにした（これらの成果については未発表のため、これら遺伝子群を以下 men06, men26, men27, men50, men90, men92, men94 と略号で記載する）。

②また新規経路遺伝子の網羅的取得を目指し、病原性の無い *Streptomyces* 属放線菌を用いて変異剤によるメナキノン生合成欠損株の誘導と相補遺伝子の取得も行った結果、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、その後全く別経路を経ることも分かった。

③さらに、新規経路の化合物レベルでの解明を目的とし、生合成中間体を同定するためのアッセイ系の構築も行った。上述の新規経路遺伝子破壊株（右図、破壊株 A）は、培地にメナキノンを添加しないと生育できない。しかし、右図に示したように生合成上、下流に位置する破壊株（右図、破壊株 B）と混合培養すると、破壊株 B から中間体 B が供給され、破壊株 A は生育可能になると考えられる。そこで実際に上述の破壊株を 2 つ組み合わせてメナキノン非存在下で混合培養を行った結果、予想通り幾つかの菌株の組み合わせで生育が認められた。

④そこで次に、混合培養で生育した 2 株の内、どちらが生合成上、上流、あるいは下流の生合成反応に関与するのか調べるための検討も行った。混合培養に用いた 2 株を個別にメナキノン存在下で培養し、培養後、添加メナキノンを溶媒抽出により除去した残渣をメナキノンの代わりに培地に添加し、混合培養に用いた相

方の菌株の生育が回復するか検討した。その結果、何れか一方の破壊株の生育のみ回復したことから、（1）破壊株培養液中に生合成中間体が存在すること、（2）混合培養に用いた破壊株が関与する生合成上の相対的な位置を以下のように明らかにすることができた。



(men06) → (men26, men27, men50) → (men90, men92, men94) → メナキノン

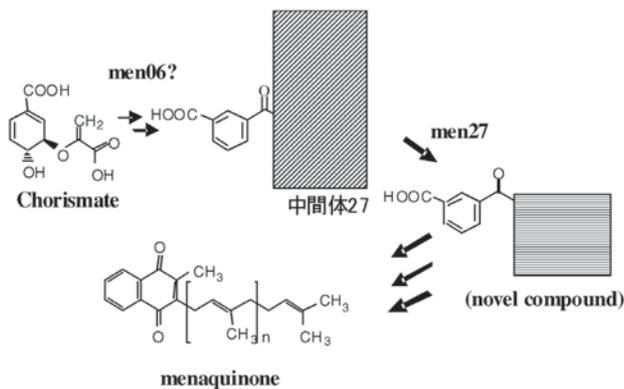
## <2007 年度の研究の当初計画>

上述した中間体を同定するためのアッセイ系を用い、上記破壊株が蓄積する中間体の精製・構造決定を行い、これらの株が蓄積する化合物の構造を決定する。さらに、これら中間体を基質に用い、新規経路遺伝子の組換え酵素を用いた *in vitro* の酵素反応実験も行い、コリスミ酸からメナキノンに至る全経路の生化学的な全容解明も試みる。

## <2007 年度の成果>

上記 men06 破壊株を被検菌に用い、men27 破壊株が蓄積する中間体の精製・構造決定を行い、本化合物は放線菌が生産することが知られている既知化合物であることを明らかにした（図を参照。本成果も未発表のため、ここで本化合物を中間体 27 と記載する）。

さらに、中間体 27 は組換え men27 酵素により新規化合物へと変換され、本化合物もバイオアッセイにより生合成中間体であることを実証した。現在、men26 破壊株が蓄積する化合物の精製を進めている。



#### <国内外での成果の位置づけ>

本研究は、イソプレノイド化合物の生合成研究を契機として申請者が気付いた独創的な研究であり、現時点でこの新規経路に関する報告は全く無い。最終的に新規経路の全容を解明し、これら経路の生合成に関与する酵素群の阻害剤を探索することによる抗胃潰瘍薬、天然素材由来の食中毒予防添加剤開発への展開が期待できる。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

全体的には計画に従い順調に進展した。しかし上述した新規経路遺伝子破壊株の中には、バイオアッセイでは蓄積する中間体を検出できないものもあった。これらは、生合成中間体が不安定であることや、蓄積量がごく微量であることなどが考えられるが、いずれにせよ他の方法による検討が必要である。また、各生合成遺伝子産物を組換え酵素として大腸菌で発現させることも行なったが、幾つかの酵素は種々条件を検討したにもかかわらず、全く発現しないか、発現しても封入体になり活性型として発現できなかった。

#### <今後の課題>

上で述べたように、破壊株が蓄積する中間体を検出する方法は万全ではないことから、各生合成遺伝子を組換え酵素として発現させ、精製・構造決定できた中間体を基質に用いた *in vitro* の酵素反応も検討する。最終的に、全ステップについて *in vitro* 解析を行ない、新規経路の全容を解明する。そのために現時点で活性型として発現できていない酵素に関しては、他のタンパク質との融合タンパク質としての発現検討や、大腸菌以外の宿主・ベクター系を用いた発現検討も行う。

さらに、構造決定できた中間体に関しては、それらの構造類似体を化学合成後、新規経路の阻害剤となりえるか検討し、抗胃潰瘍薬、天然素材由来の食中毒予防添加剤開発への展開を図る。

#### <成果公表リスト>

1. 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.*, *in press* (2008). (受付番号: 0801151009)