

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

遺伝子組換え *Micromonospora* sp. TPMA0041 による
ハイブリッドマクロライド抗生物質の創製

微生物化学講座 酒井 彩美

[序論]

マクロライド抗生物質は、大環状ラクトンに数個の糖がグリコシル結合した構造を持つ化合物で、14、15、16 員環マクロライド抗生物質はグラム陽性細菌、マイコプラズマに対する強い抗菌活性をもち、これらの細菌に対する感染症治療薬として広く利用されている。マクロライド抗生物質は抗菌作用のみならず、*avermectin* における抗寄生虫作用、*FK506* や *rapamycin* における免疫抑制作用など多種多様の生物活性を有する化合物であり、その有用性は計り知れないものがある。また、本抗生物質の母核であるラクトン環のみでは抗菌活性は認められず、糖がラクトン環に付加することで抗菌活性が現れることより、本抗生物質の活性には糖の付加が不可欠である。現在、既存の抗生物質に対する耐性菌の蔓延に伴い、新たな化学療法剤の開発が急務となっているが、構造が複雑なマクロライド抗生物質の糖の修飾やラクトン環の構造変換を行うことは有機化学的手法では非常に難しい。しかし、分子生物学的技術が発展した今日では遺伝子組換え技術を用いることで、複雑な構造をもつ種々のマクロライド誘導体の生産も可能となりつつある。

当研究室では、16 員環マクロライド抗生物質 *mycinamicin* を生産する *Micromonospora griseorubida* A11725 の *mycinose* 生合成遺伝子を大腸菌放線菌シャトルベクター pSET152 に挿入した pSETmycinose を構築している。pSETmycinose を 16 員環マクロライド抗生物質 *rosamicin* 生産株 *Micromonospora rosaria* IFO 13697 に導入した *Micromonospora rosaria* TPMA0001 は新規化合物を含む *mycinose* が付加した *rosamicin* 誘導体 IZI, IZII, IZIII を生産した。^{1,2)} *Izenamicin* は *Micromonospora* sp. FERM BP-1076 により生産される C5 位に D-desosamine が結合した 16 員環マクロライド抗生物質である (Fig 1)。本研究では pSETmycinose を FERM BP-1076 に導入し、*mycinosyl-izenamicin* 誘導体の生産を試みた。また、FERM BP-1076 の pSET152 特異的挿入領域 *attB* site を同定した。さらに、*izenamicin* 生合成酵素の機能解析のため、FERM BP-1076 のポリケタイド生合成酵素 (PKS) 内の Module 5 の *acyltransferase* (AT) を含む領域の塩基配列を解析し、他のマクロライド抗生物質の生合成酵素の同領域を構成するアミノ酸配列との比較を行った。

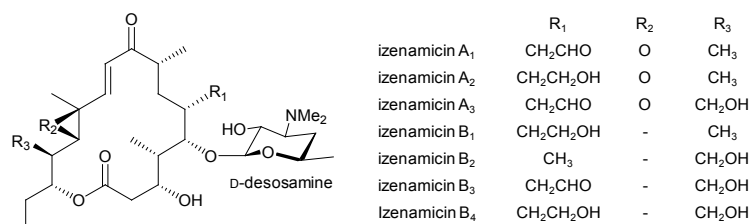


Fig 1. *Izenamicin* の構造式

【方法】

FERM BP-1076 への pSETmycinose 導入は *Escherichia coli* S17-1 からの接合により行い、遺伝子導入は PCR で確認した。TPMA0041 の生産物質の確認は HPLC、LC-MS により行い、構造は NMR 解析により決定した。抗菌活性評価は各被検菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC) の測定により行った。*attB* site の同定は、pSET152 の *attP* を probe とした TPMA0041 に対するサザンハイブリダイゼーションから *attL* を持つクローンを取得し、*attL* を持つ領域を probe とした FERM BP-1076 に対するサザンハイブリダイゼーションから *attB* を含む領域を特定し、その領域の DNA をセルフライゲーションし inverse-PCR を行うことで *attB* を含む領域の塩基配列を決定した。16 員環マクロライド抗生物質の PKS の Module 5 内には enoyl reductase (ER) が特徴的に存在する。Module 5 内の AT 領域 (AT5) のアミノ酸配列の比較は、Module 5 内の ER 領域 (ER5) をコードする DNA 断片を probe に用いたコロニーハイブリダイゼーションにより FERM BP-1076 及び IFO 13697 の ER5 及び AT5 をコードする遺伝子を持つクローンを取得し、その塩基配列解析を行い、アミノ酸配列を推定することで行った。

【結果・考察】

1. *Miromonospora* sp. TPMA0041 の構築及び TMC-016 の構造解析、抗菌活性試験

FERM BP-1076 へ pSETmycinose を導入した TPMA0041 は mycinose が付加された 23-*O*-mycinosyl-20-deoxy-izenamicin B₁ (=IZI, 分子量 741) を生産した。また、TPMA0041 は分子量 727 のマクロライド化合物も生産し、培養液に propionate を添加することで本化合物の生産は増加した。本化合物は Fujiwara らにより化学合成された高い抗菌活性を持つ 16 員環マクロライド抗生物質 TMC-016 (22-*O*-mycinosyl-izemamicin B₂) と推定された。³⁾ TMC-016 は IZI と比較し C6 位の ethyl が methyl となった構造である (Fig 2)。TMC-016 の生産量はごく僅かであるため、生産性向上のために培地及び培養液に添加する propionate の濃度とその添加のタイミングを検討した。その結果、FMM 培地、27°C、6 日間培養で、培養 2 日目及び 4 日目に 10 mM の propionate (pH 7.2) (合計 20 mM) を添加した場合に、TMC-016 の生産が最大 (1.0 mg/L) となった。この条件で得た 7.8 L の培養液から 3.32 mg の TMC-016 を単離精製し NMR 解析から TMC-016 であることを確認した。⁴⁾ また、[1-¹³C] propionate sodium の取り込み実験から、TMC-016 の C6 位の methyl は培養液に添加した propionate 由来であることが確認できた。放線菌によるマクロライド抗生物質の生産を向上させる方法には様々な報告があるが、本研究では培養液に直接前駆物質の低級脂肪酸を加えることで生産を向上させることができた。

TPMA0041 から単離精製した TMC-016 の抗菌活性はグラム陽性菌には高く、グラム陰性菌では低く、これら抗菌活性パターンは、Fujiwara らが報告した TMC-016 の活性と同様であった。^{3,4)} 化学合成された TMC-016 はマイコプラズマや嫌気性菌に有効性を示し、動物試験で安全性も確認されている。TPMA0041 により生産された TMC-016 は化学合成された TMC-016 と同様の有効性・安全性が期待される。また、化学合成の際の TMC-016 の収率は 41.6% と高くないため、TPMA0041 は TMC-016 の生産に有用である。

2. MF-1 の構造解析及び抗菌活性試験

TMC-016 の生産がピークに達した後も TPMA0041 の培養を継続すると、生産量は IZI より少ないが、分子量 727、 UV_{max} 286 nm のマクロライド抗生物質と推定される MF-1 が培養液中に蓄積してくる。IZI の生産は 8 日間の培養でピークを迎えるが、MF-1 はその後も増え続けた。TPMA0041 の培養液 6 L より 13.45 mg の MF-1 を単離精製し、NMR 解析を行ったところ、MF-1 は IZI と比較し D-desosamin の *N*-dimethyl 基が *N*-monomethyl 基となった新規化合物 23-*O*-mycinosyl-20-deoxy-3'-desmethyl-izenamicin B₁ と同定した (Fig 2)。抗菌活性を測定したところ、MF-1 は IZI より活性が低く、desosamine の *N*-dimethyl 基が抗菌活性に関与していることが分かった。

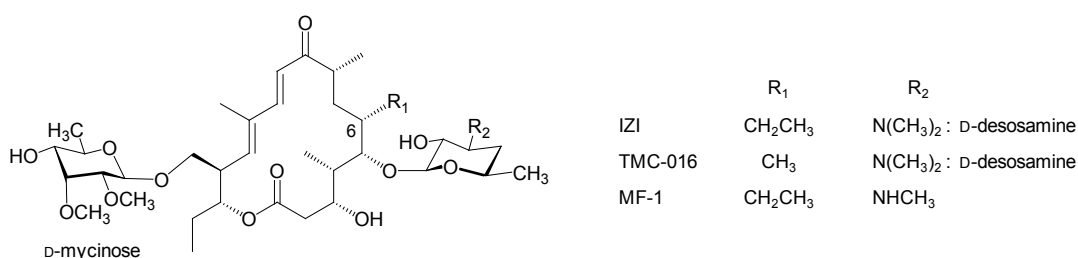


Fig 2. IZI、TMC-016 及び MF-1 の構造式

3. *Miromonospora* sp. FERM BP-1076 の ϕ C31 *attB* site 同定⁴⁾

当研究室では、pSETmycinose の導入により得られた *M. rosaria* TPMA0001 について、その親株である *M. rosaria* IFO 13697 の遺伝子操作法の至適化のために pSETmycinose の挿入位置の確認が必要であると考え、その挿入位置の同定と塩基配列の解析を行い、*Miromonospora* 属で初めて ϕ C31 *attB* site を同定している。⁴⁾ 本研究では、FERM BP-1076 の pSETmycinose の挿入位置の確認するために、FERM BP-1076 の 50 bp の *attB* site を含む領域をクローニングし、その塩基配列を解析した。その結果、IFO 13697 と同様に pSETmycinose が FERM BP-1076 染色体上の *attB* site に *attP* との組換えにより導入されていることを確認した。また、FERM BP-1076 の *attB* site は IFO 13697 や他の *Streptomyces* 属と同じように Pirin homolog をコードする領域に位置していた。BLAST 解析及び文献から特定した放線菌 43 株の *attB* の塩基配列と FERM BP-1076 と IFO 13697 の *attB* の塩基配列について CLUSTAL W を用いクラスター解析したところ、*Miromonospora* 属は *Streptomyces* 属とは別の独立したクラスターを形成した。本研究で得られた *attB* に関する知見は、*Miromonospora* 属における遺伝子操作にとって貴重な情報となる。

4. *Micromonospora* sp. FERM BP-1076 を含む 16 員環マクロライド抗生物質における PKS 内の acyltransferase のアミノ酸配列の比較

TPMA0041 はラクトン環の C6 位の炭素数が 1 の TMC-016 及び C6 位の炭素数が 2 の IZI を生産するが、*M. rosaria* IFO 13697 に pSETmycinose を導入した *M. rosaria* TPMA0001 は C6 位の炭素数が 2 の IZI~IZIII を生産し^{1,2)}、propionate 添加による生産物質の変化はない。この違いは、PKS 内の AT5 により取り込まれる低級脂肪酸の違いに由来する。Butyrate を出発物質とした ethylmalonyl-CoA (Em-CoA) が取り込まれれば 16 員環マクロライド抗生物質の C6 位側鎖の炭素数は 2 に、propionate を出発物質とした methylmalonyl-CoA (Mm-CoA) が取り込まれれば C6 位側鎖の炭素数は 1 となり、FERM BP-1076 と IFO13697 では AT の基質特異性が異なると考えられる。そのため、FERM BP-1076 及び IFO13697 の AT5 をコードする領域をクローニングし、その塩基配列を解析した。FERM BP-1076 及び IFO13697 の AT5 の推定アミノ酸配列の相同性は 87%、類似性は 98%であった。FERM BP-1076 及び IFO13697 と塩基配列が解析されている他の 16 員環マクロライド抗生物質生産放線菌の PKS における AT5 のアミノ酸配列 7 配列を合わせた 9 配列を CLUSTAL W を用いクラスター解析したところ、FERM BP-1076 及び IFO 13697 は共に Em-CoA を基質とする AT のグループに含まれた。TPMA0041 は TMC-016 より IZI を多く生産し、また、野生株 FERM BP-1076 においても C6 位が methyl の izenamicin B₂ の生産が高くないことから、FERM BP-1076 の AT5 は Em-CoA を基質として利用する能力が高いと推定できる。しかし、FERM BP-1076 の AT5 のアミノ酸配列と IFO13697 と AT5 のアミノ酸配列との間には僅かなアミノ酸配列の違いがあり、その違いが Mm-CoA の取り込みに影響を与えている可能性も考えられる。

【参考文献】

- 1) Anzai Y *et. al.* 2009. Production of rosamicin derivatives in *Micromonospora rosaria* by introduction of D-mycinosyl biosynthetic gene with ϕ C31-derived integration vector pSET152. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36: 1013-1021. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 2009;
- 2) Anzai Y, **Sakai A** *et. al.* 2010. Isolation and characterization of 23-O-mycinosyl-20-dihydro-rosamicin: a new rosamicin analogue derived from engineered *Micromonospora rosaria*. *J Antibiot (Tokyo)* 63: 325-328.
- 3) Fujiwara T *et. al.* 1989. 19-Deformyl-4'-deoxydesmycosin (TMC-016): synthesis and biological properties of a unique 16-membered macrolide antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)* 42: 903-912.

【対象文献】

- 4) **Sakai A** *et. al.* 2012. Production of a hybrid 16-membered macrolide antibiotic by genetic engineering of *Micromonospora* sp. TPMA0041. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39: 1693-1701.

酒井 彩美氏の学位申請論文「遺伝子組換え *Micromonospora* sp. TPMA0041 によるハイブリッドマクロライド抗生物質の創製」に対する審査意見

Waksman による *Streptomyces griseus* からのストレプトマイシンの分離を端緒に、テトラサイクリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコールなどの多様な骨格をもつ抗生物質が放線菌より分離され、感染症治療に飛躍的な進歩をもたらした。エリスロマイシンに代表されるマクロライド抗生物質は、現在でも、グラム陽性菌やマイコプラズマ、クラミジアなどの細胞内寄生細菌による感染症の治療に用いられる重要な治療薬の 1 つである。更に、14 員環マクロライド抗生物質には、消化管蠕動ホルモンであるチモリン様作用による消化管運動の活性化、サイトカイン放出阻害による免疫調整作用、クオラムセンシングを介した緑膿菌のバイオフィルムの形成阻害など抗菌作用以外の活性が認められ、少量長期投与によるびまん性汎細気管支炎の治療が行われている。酒井氏は、抗菌活性のみならず、様々な生理活性をもつマクロライド抗生物質の生産菌の遺伝子操作により、有機化学的手法では合成が困難な、複雑な構造をもつマクロライド抗生物質誘導体の生産を行った。

対象とした TMC-016 は、16 員環マクロライド抗生物質 mycinamicin に類似した構造を持つ半合成マクロライド抗生物質であり、マイコプラズマや嫌気性菌に対する高い抗菌活性を示すことが報告されている。TMC-016 と類似した構造の izenamicin B₂ は、*Micromonospora* sp. FERM BP-1076 の代謝産物で、C6 位の側鎖が methyl であり、C22 位に D-mycinosose を導入できれば TMC-016 となる。酒井氏は、izenamicin 生産株 *Micromonospora* sp. FERM BP-1076 へ mycinosose 生合成遺伝子を導入することにより、mycinosose の付加した izenamicin B₂ 誘導体 TMC-016 の生産株 TPMA0041 を作成した。TMC-016 の収量を高めるため培養条件の検討を行い、プロピオン酸の添加により生産量の増加することを明らかにした。また、副産物である MF-1 の構造を 23-*O*-mycinosyl-20-deoxy-3'-*N*-desmethyl-izenamicin B₁ と決定した。新規物質である MF-1 とその構造類似体である IZI の構造上の相違は desosamine のメチル基が *N*-dimethyl か *N*-monomethyl かであり、両者の抗菌活性の比較から *N*-monomethyl desosamine の MF-1 では大きく抗菌力が低下することを明らかにし、*N*-dimethyl desosamine が抗菌活性に強く関与することを示した。

本論文では、多様な二次代謝に関わる遺伝子を保持する放線菌を利用することにより、有機化学的手法では合成が困難な 14 員環マクロライド TMC-016 の生産株を作成した。また、その生合成経路からプロピオン酸の関与を推定し、プロピオン酸の添加により 7.8 L の培養から 3.32 mg の TMC-016 を得ることができた。感染症治療薬に対する耐性菌が蔓延する現状において、耐性菌に有効な新たな抗菌薬を供給していく必要があるが、本研究で用いた手法を応用することにより、有用な新規物質あるいは化学修飾の出発物質を発酵により安価に、かつ大量に供給することが可能と思われる。

本論文は博士（薬学）に値するものとする。

平成 26 年 2 月 26 日

加藤 文男