

<平成17年度>

食中毒原因微生物に特異的なビタミン生合成経路の 解明と阻害剤探索による食中毒予防

大 利 徹

(富山県立大学工学部准教授)

研究の目的と結果

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。筆者は、胃がんの原因菌として知られている *Helicobacter* 属、食中毒の原因微生物として知られている *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 (図2参照) の生合成遺伝子群が全く存在しないことに気づき、以下の手法でその全容解明を試みた。

- ① 最初に、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 解析により探索し、得られた候補遺伝子を病原性のない *Streptomyces* 属放線菌を用いて組換え手法により破壊した。その結果、いずれも機能未知とされていた *S. coelicolor* の SCO4506, SCO4326, SCO4327, SCO4550 の4つの遺伝子を新規経路に関与する候補遺伝子として選抜した。
- ② バイオインフォマティクスではこれ以上候補遺伝子の絞り込みができなかったこと、また新規経路が一次代謝の何の化合物から分岐

して生合成されるか不明であったため、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。その結果、多くの変異株はバイオインフォマティクスにより絞り込んだ4つの遺伝子で相補されたが、相補されなかった変異株を用いてショットガンクローニングを行った結果、幾つかの変異株は、シキミ酸経路の遺伝子群である chorismate synthase (SCO1496), shikimate kinase (SCO1495), 3-dehydroquinate synthase (SCO1494) を含むプラスミドで相補された。そこで、この変異株を shikimate または chorismate を含む培地に添加し、生育が回復するか検討した結果、chorismate を添加した時のみ生育が回復した。chorismate synthase が触媒する反応 (5-enolpyruvylshikimate acid-3-phosphate → chorismate) は不可逆反応であること、また前述したトレーサー実験の結果も考えあわせると、新規経路は既知経路同様 chorismate を出発基質とするが、その後全く別経路を経ると考えられた。

- 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なった。上述の新規経路遺伝子破壊株 (図1, 破壊株 A) は、培地にメナキノンを追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 (図1, 破壊株 B) と混合

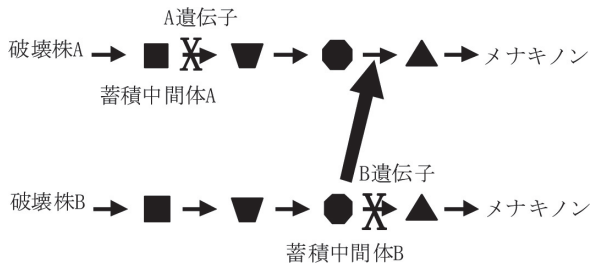


図1 バイオアッセイの原理

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 そこで次に個々の破壊株をメナキノ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繰り返し抽出・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は予想通り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。

- ⑤ 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 破壊株が蓄積する中間体を SCO4506 破壊株の生育回復を指標に精製した。SCO4327 破壊株をメナキノノン存在下で大量培養後、溶媒による添加メナキノノンの除去、各種クロマトグ

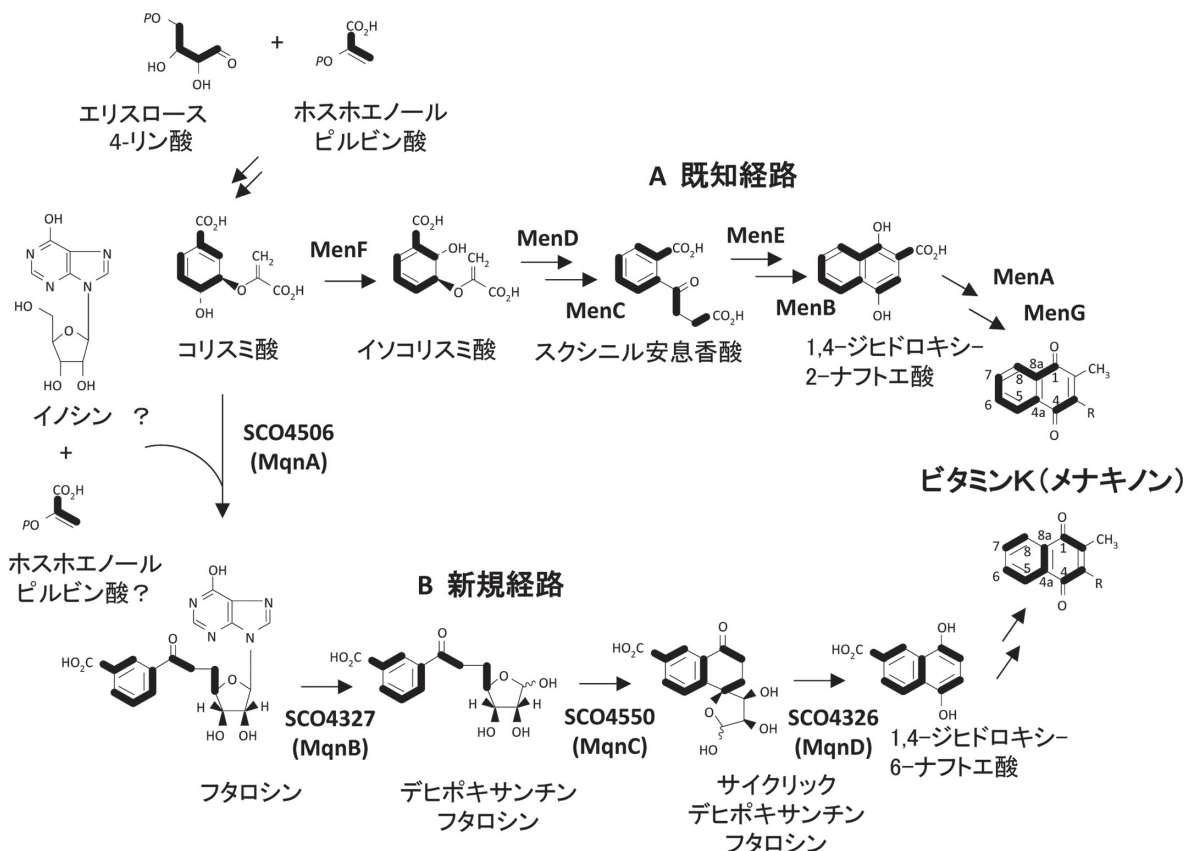


図2 メナキノノンの既知、および新規経路

ラフィーによる分画, SCO4506 破壊株を用いたバイオアッセイ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 と判明した (図 2)。

⑥ 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, 酵素アッセイ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アッセイを試みた。SCO4327 のオーソログと考えられる 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^{-5}), 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, dehypoxanthine (dehypoxanthinyl) fufalosine (DHFL) であることを確認した (図 2)。

⑦ 生合成上 SCO4327 の次の反応は SCO4550 により触媒されると推定された。そこで SCO4550 および *T. thermophilus* HB8 株のオーソログである TTHA1092 の組換え酵素を調製し DHFL との反応を行ったが生成物は認められなかった。その原因は未だ不明であるが, DHFL の次の中間体を得るため, 生

合成上 SCO4550 の次の反応を触媒すると考えられる SCO4326 の破壊株が蓄積する中間体 (本化合物は DHFL から SCO4550/TTHA1092 により生成する化合物と同一と考えられる) の精製を行った。SCO4506 破壊株の生育回復を指標に精製を試みたが, 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 aldol 縮合により容易に他の化合物に変換されることから, 大量精製に一年以上費や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 dehypoxanthine fufalosine (cyclic DHFL) であることが分かった (図 2)。

⑧ 次に, メナキノン生合成上 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 株のオーソログである 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 であることが分かった

以上述べてきたように, バイオインフォマティクスと生化学実験を上手く組み合わせることにより, これまで機能未知遺伝子として扱われていた 4つの遺伝子が, メナキノンの新規生合成経路に関与することを証明し, また生合成中間体の構造も明らかにし, 新規経路の概要を明らかにすることができた。本新規経路は上記病原菌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。本研究結果が掲載された Science 誌, Perspectives (pp1644-1645) で D. J. Payne (GlaxoSmithKline) も言及しているが,

H. pylori のように迅速な診断方法が確立されている病原菌であれば、この新規経路の阻害剤を探索することにより副作用が無い有用な抗生物質の開発が期待できると考えられる。近年、新しい作用機作を持つ薬の開発が難しくなりつつあること、また非特異的な抗生物質の使用は多剤耐性菌の出現にもつながることから、今回見出した経路のように、特定の菌株のみが持つ特定の代謝経路をターゲットとした抗生物質の開発は今後の薬剤開発のための1つの方向性を示していると考えられる。

本研究は、平塚知成 博士（現在 Cornell 大学博士研究員、生化学実験担当）、東京農業大学 瀬戸治男 教授（トレーサー実験）、国立感染症研究所 石川 淳 博士（バイオインフォマティクス）、東京大学 降旗一夫 博士（中間体の構造決定）との共同研究で得られた成果である。また本研究を遂

行するに当たりご支援いただいた（財）浦上食品・食文化振興財団にこの場を借りて深謝申し上げます。

文 献

- 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.*, 130, 5614-5615 (2008)
- 2) 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)
- 3) Hiratsuka, T., Itoh, N., Seto, H., and Dairi, T.: Enzymatic properties of futasine hydrolase, an enzyme essential for a newly identified menaquinone biosynthetic pathway, *Biosci. Biotech. Biochem.* in press (2009).

An Alternative Menaquinone Biosynthetic Pathway Operating in Actinomycetes

Tohru Dairi

(Biotechnology Research Center, Toyama Prefectural University)

In prokaryotes, ubiquinone and menaquinone (MK) are obligatory component of the electron-transfer pathway. *Escherichia coli*, which is a facultative anaerobe, utilizes ubiquinone under aerobic conditions, but uses MK 8 when it is grown anaerobically. By contrast, many Gram-positive aerobes such as *Streptomyces* strains contain only MKs. MK biosynthesis is therefore essential for the survival of these strains. In *E. coli*, MK is biosynthesized from chorismate by seven enzymes (MenA- MenG, see below). However, a bioinformatic analysis of whole genome sequences has suggested that some microorganisms such as *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces avermitilis*, *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni* do not have orthologs of the *men* gene, even though they synthesize MK. Here, we investigated this novel pathway in a nonpathogenic *Streptomyces* strain. On the basis of bioinformatic screenings, gene knockouts, shotgun cloning with isolated mutants and *in vitro* studies with recombinant enzymes, we deduced the outline of the pathway, which is branched at chorismate in a manner similar to the known pathway, but then follows a different route [1, 2]. As humans and some useful intestinal bacteria, such as lactobacilli, lack this novel pathway, it represents an attractive target for the development of chemotherapeutics.

References :

- [1] Seto, H. *et al.* : Studies on a New Biosynthetic Pathway for Menaquinone, *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 5614-5615 (2008)
- [2] Hiratsuka, T. *et al.* : An alternative menaquinone biosynthetic pathway operating in microorganisms, *Science*, 321, 1670-1673 (2008)

