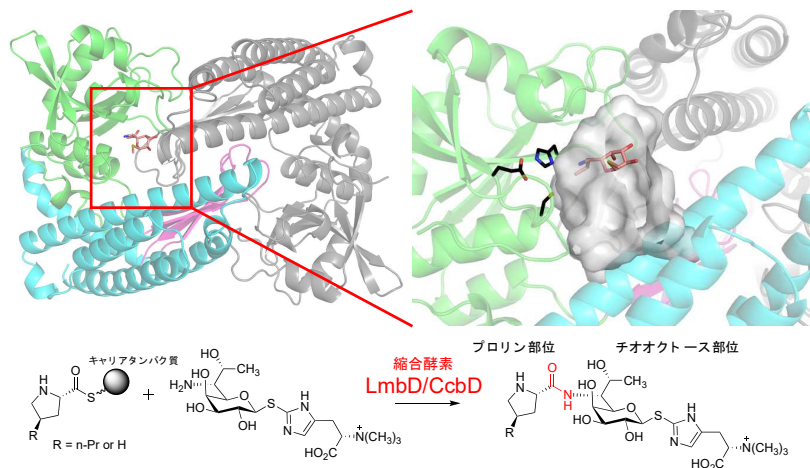


抗生物質の生物活性に重要な分子骨格を構築する 新奇縮合酵素の構造機能を解明

発表のポイント

- ◆強力な活性を示すリンコサミド抗生物質の骨格形成に関わる新奇酵素の構造機能の解明と、一連の非天然型新規化合物の創出に成功しました。
- ◆酵素の立体構造と機能を精査することにより、本酵素群が触媒するユニークな化学反応のメカニズムを解明しました。
- ◆今後、酵素の機能を改変して有用物質生産へ応用することで、新たな創薬シード化合物の創出など、薬科学の発展への貢献が期待されます。



リンコサミド抗生物質の生合成において新奇縮合酵素が触媒する反応と酵素立体構造

発表概要

東京大学大学院薬学系研究科の阿部 郁朗 教授と森 貴裕 准教授、チェコ科学アカデミー微生物研究所のジリ ヤナタ教授らによる研究グループは、抗生物質（注1）として利用されているリンコサミド化合物群の生合成において、生物活性の発現に必須なアミド結合（注2）の形成を触媒（注3）する新奇縮合酵素 CcbD について、酵素反応の立体構造基盤を解明しました。酵素の X 線結晶構造解析（注4）から本酵素群が、これまでに例のない、新規な全体構造を有していることを明らかとし、さらに、本来の基質の類縁体を用いた酵素の機能解析や、立体構造をもとにした部位特異的変異導入（注5）により、本酵素は過去に解析されているアミド結合形成酵素とは異なる新たな反応機構でアミド結合の形成を触媒することを解明しました。

自然界には依然として多くの反応機構がわかっていない未開拓な生合成酵素が眠っています。その触媒原理を解明し、さらに酵素の機能を改変して有用物質生産へ応用することで、新たな創薬シード化合物の創出など、薬科学の発展への貢献が期待されます。

本研究成果は、2023年6月12日（月）（現地時間）公開の Nature Catalysis 誌にオンライン掲載されました。

発表内容

放線菌から単離されるリンコマイシン A に代表されるリンコサミド抗生物質は、原核生物(注 6) のリボソーム 50S サブユニット(注 7) へ結合することで生物活性を示し、抗菌薬として臨床利用もされている天然由来の化合物です。リンコマイシン A やその類縁化合物の化学構造は、硫黄原子を糖の構造内に含む、特徴的なチオオクトース部位とアルキル化されたプロリン部位から構成されます(図 1)。過去の構造活性相関研究(注 8) から、このプロリン部位とチオオクトース部位の縮合によるアミド結合の形成が抗菌活性の発現に必須であることが判明していました。また、リンコマイシン A やその類縁体セレスチセチンの生合成において、このプロリン部位とチオオクトース部位の縮合は、新奇縮合酵素 LmbD/CcbD によって触媒されることが知られています。本酵素群は、キャリアタンパク質(注 9) に結合したアルキルプロリンとチオオクトースを縮合し、アミド結合の形成を触媒することでリンコサミド類の基本骨格を構築するこれまでに例のないユニークな酵素です。

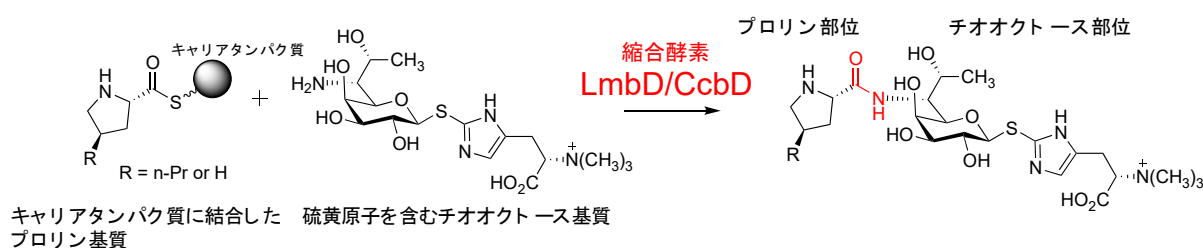


図 1: リンコサミド抗生物質の生合成において新奇縮合酵素が触媒する反応

赤色の部分構造がアミド結合です。リンコマイシン A の生合成においては LmbD が、セレスチセチンの生合成においては CcbD が用いられます。本研究においては、CcbD を用いて研究を行なっています。

アミド結合の形成反応は自然界において普遍的かつ極めて重要な反応であり、さまざまなアミド結合形成反応を触媒する酵素が知られています。その中でキャリアタンパク質に結合した基質を用いて反応を行う酵素は、非リボソーム型ペプチド合成酵素(注 10) の縮合ドメインやチオエステラーゼドメイン(注 11)、一部のアシル基転移酵素(注 12) でのみ見出されていました。しかし、LmbD/CcbD は、これらアミド結合形成を触媒する酵素とはアミノ酸配列相同性を全く示さないユニークな酵素で、その生化学的特性、立体構造、触媒反応機構の解明が待たれていました。

研究グループは、まず、酵素が認識する基質の選択性を明らかとするために、プロリンが結合したキャリアタンパク質や部分構造が共通しているプロリル-CoA を基質として用いた CcbD の酵素反応、異なる鎖長を持つ脂肪酸や、プロリン以外のアミノ酸が結合したキャリアタンパク質を基質として用いた酵素反応を行いました。その結果、本酵素はキャリアタンパク質を強く認識する一方で、キャリアタンパク質に結合した部分の構造に対しては寛容であることが判明しました。また、これらの酵素反応により得られた生成物は、天然にはない新しい構造を持つことも見出しました。

次に、CcbD の X 線結晶構造解析を行い、本酵素がこれまでに構造解析された酵素とは異なる新しい全体構造を有していることを発見しました(図 2)。さらに、酵素と基質の複合体構造を取得し、酵素反応中において化合物がどのような形で活性部位(注 13) に結合しているかを明らかとした上で、得られた複合体構造を基に活性部位のアミノ酸残基に対して変異を導入することで、各活性部位構成アミノ酸残基の役割とその重要性を確認しました。加えて、CcbD と

キャリアタンパク質の複合体構造を取得し、酵素がどのようにキャリアタンパク質を認識しているかも詳細に解明しました。これらの結果から、本酵素はこれまでに解析がなされているキャリアタンパク質を利用するアミド結合形成酵素とは異なり、全く新しい触媒残基（注14）と反応機構を用いてアミド結合形成反応を触媒することが明らかとなりました。

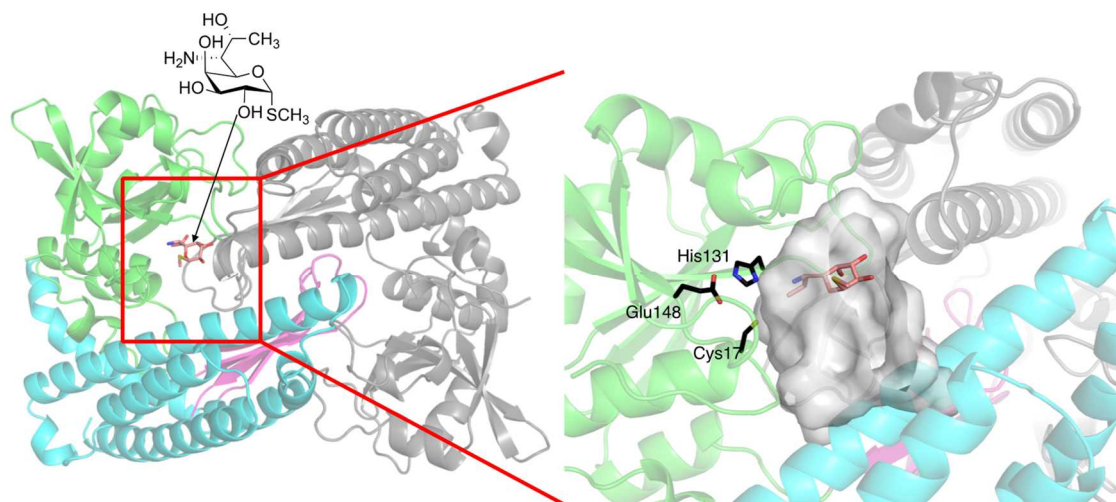


図2 : CcbD 酵素の全体構造と活性部位の構造

以上、本研究では、放線菌由来のリンコサミド抗生物質の活性発現に必要なアミド結合の形成機構を世界に先駆けて明らかにしました。さらに、基質類縁化合物を酵素に作用させることで、一連の非天然型新規化合物の創出にも成功しました。今後、さらに酵素の機能を改変して有用物質生産へ応用し、得られた新規化合物に対して生理活性評価を行なっていくことで医薬品シード化合物の発見など、生体触媒による創薬研究への応用も期待されます。

研究グループ

東京大学大学院薬学系研究科

阿部 郁朗（教授）

森 貴裕（准教授）

チェコ科学アカデミー 微生物研究所

ジリ ヤナタ（教授）

論文情報

- 〈雑誌〉 Nature Catalysis
 〈題名〉 Molecular basis for carrier protein-dependent amide bond formation in the biosynthesis of lincosamide antibiotics
 〈著者〉 Takahiro Mori*, Stanislav Kadlcik, Shuang Lyu, Zdenek Kamenik, Kosuke Sakurada, Aninda Mazumdar, Huibin Wang, Jiri Janata*, and Ikuro Abe* (* 共同責任著者)
 〈DOI〉 10.1038/s41929-023-00971-y
 〈URL〉 <https://www.nature.com/articles/s41929-023-00971-y>

研究助成

本研究は、科研費（JP18F18779、JP19K15703、JP20H00490、JP20KK0173、JP21K18246、JP23H00393、JP23H02641）、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム（BINDS：JP20am0101071）、AMED 創薬基盤推進研究事業 生物資源利活用研究分野（JP21ak0101164）国立研究開発法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO：JPNP20011）、科学技術振興機構（JST）さきがけ（JPMJPR20DA）の支援により実施されました。

用語解説

（注1）抗生物質

微生物や細胞に作用してその生育などを抑制、阻害する作用を持つ物質のことです。細菌感染症に効果があります。

（注2）アミド結合

カルボン酸とアミンが縮合することによって形成される炭素—窒素結合を指します。生体分子として代表的なタンパク質は、無数のアミノ酸がアミド結合（ペプチド結合）でつながって形成されています。

（注3）触媒

特定の化学反応の反応速度を速める物質で、自身は反応の前後で変化しないものをいいます。今回の場合は、酵素が触媒であり、行う反応を触媒反応と呼びます。

（注4）X線結晶構造解析

物質の3次元構造を知る手法の一つです。酵素タンパクなどを結晶化し、散乱されたX線を観測することで、物質の中の電子の分布を知ることができます。

（注5）部位特異的変異導入

酵素のアミノ酸配列の特異的な部位に変異を導入し、変異させたアミノ酸の役割を解析する手法です。

（注6）原核生物

単細胞で細胞内にDNAを包む細胞核を持たない生物の名称です。対をなす生物として細胞核を持つ真核生物がいます。

（注7）リボソーム 50S サブユニット

生体反応の中心因子であるタンパク質の多くは、他のタンパク質と複合体を形成し、マルチサブユニット複合体として存在します。タンパク質合成はリボソームという器官で行われ、細菌のリボソームは30Sと50Sという二つのサブユニットに分けられます。リンコマイシン系抗生物質はそれらのうち、特に50Sのサブユニットに作用して抗菌活性を示します。

（注 8）構造活性相関研究

化学物質の構造と生物活性との関係を明らかにする研究のことです。化学物質の構造をさまざまに変換して生物活性を評価することでどの部分が生物活性に重要かを調べます。これにより構造的に類似した化合物の薬効について予測することが可能となります。

（注 9）キャリアタンパク質

活性化されたアミノ酸やアシル化合物を、チオエステル結合を介して保持するタンパク質です。ペプチド化合物やポリケタイド化合物の生合成において、中間体を保持し、次の酵素へ受けわたす機能を持っています。

（注 10）非リボソーム型ペプチド合成酵素

リボソームを介さずに生合成されるペプチドの総称を非リボソーム型ペプチドといいます。これらのペプチド化合物を合成する酵素が、非リボソーム型ペプチド合成酵素です。ペプチドの材料となるアミノ酸を取り込む酵素ドメインやアミノ酸同士を縮合する酵素ドメイン等が多数連結した巨大なモジュール型合成酵素です。

（注 11）ドメイン

タンパク質の構造中で特定の機能を有する一部分のことです。縮合ドメインは非リボソーム型ペプチド合成酵素において、キャリアタンパク質上のアミノ酸を連結する反応を触媒します。チオエステラーゼドメインは伸長したペプチド化合物の酵素からの切り出しに関わります。

（注 12）アシル基転移酵素

アシル基を転移する触媒反応を有する酵素です。

（注 13）活性部位

酵素が反応を行う場のことです。通常、タンパク質のアミノ酸残基で構成され、この部分に基質が結合することで化学反応が触媒されます。

（注 14）触媒残基

酵素反応を行うのに重要な役割を担う活性部位のアミノ酸残基を触媒残基と言います。

問合せ先

〈研究に関する問合せ〉

東京大学大学院薬学系研究科

教授 阿部 郁朗（あべ いくろう）

Tel : 03-5841-4741 E-mail : abei@mol.f.u-tokyo.ac.jp

〈報道に関する問合せ〉

東京大学大学院薬学系研究科 庶務チーム

Tel : 03-5841-4702 E-mail : shomu@mol.f.u-tokyo.ac.jp