

補酵素 NAD を基質とする天然医薬品 活性化化合物の生合成機構の解明



淡川孝義 Takayoshi AWAKAWA 東京大学大学院薬学系研究科准教授,
理化学研究所環境資源科学研究センター
チームリーダー

1 はじめに

β -Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) は生体内での酸化反応の補酵素として広く用いられている。それ以外に、寿命延長に関わる sirtuin や、ゲノム修復に関わる poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) など、重要な生理作用に関わるタンパク質の基質として受け入れられ、多様な生理学的機能を担う。¹⁾ 近年、筆者らの研究において、微生物由来天然物アルテミシジン、SB-203207、SB-203208 (図1) の生合成経路において、NAD が骨格形成反応の基質となることを明らかにし、その新たな役割を示すことに成功した。^{2,3)}

本稿では、その生合成酵素の探索、機能解明に関する研究について解説し、本研究成果の生合成研究としての意義、生物活性、生理活性化化合物合成への応用の可能性など、今後の展望について記述する。アルテミシジン (図1) は抗腫瘍性を、SB-203207、SB-203208 (図1) は抗微生物活性を示し、それぞれ医薬品リードとしても有望な化合物であり、^{4,5)} その構造多様化、構造機能相関には医学薬学の見地から興味を持たれる。

2 抗生物質の自己耐性機構を指標とした生合成遺伝子の探索

通常、微生物ゲノムからの生合成酵素遺伝子の探索は、既知酵素の配列をクエリーとした相同性検索によって行われる。しかし、アルテミシジン、SB-203207、SB-203208 は骨格新規性が高く、酵素の相同性をもとに探索する手法は困難であった。そこで、SB-203207 が他の微生物の isoleucyl-tRNA synthetase の阻害活性を示す一方で、生産者の放線菌 *Streptomyces* sp. NCIMB40513 株の酵素に対しては阻害活性を示さないという報告⁵⁾ に注目し、その自己耐性タンパク質をコードする遺伝子を指標に探索する手法によって、生合成遺伝子を探索した。抗生物質の自己耐性タンパク質はトランスポーターや修飾酵素などいくつかの種類が存在するが、抗生物質のターゲットとなるタンパク質がゲノム中で重複し、変異をすることで、抗生物質に作用されず、耐性を示すものも数多く存在する。これらが生合成遺伝子とクラスターを組んでいる領域に注目すると、抗生物質の生合成酵素とそのターゲットに関する情報を一挙に取得することが可能となる。^{6,7)} これは、微生物の生合成などの関連遺伝子がゲノム中

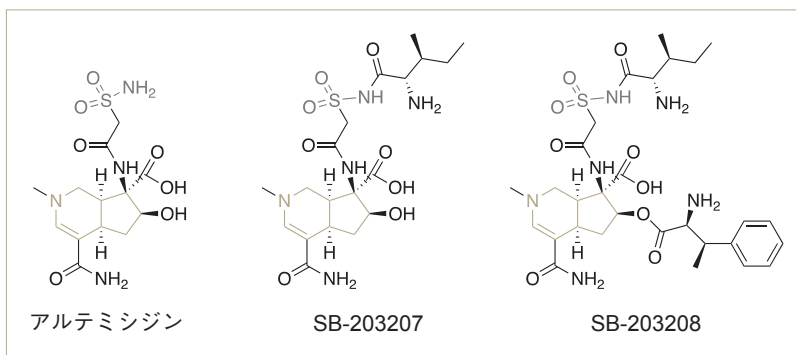


図1 アルテミシジン、SB-203207、SB-203208 の化学構造

1 か所に集まって、クラスターをなすことを利用した探索手法である。本研究では、生育に必須なハウスキーピング遺伝子以外に1コピーゲノム中に存在する isoleucyl-tRNA synthetase 遺伝子に注目し、その周辺約 20 kb の二次代謝遺伝子領域 *sbz* クラスターを発見した。これを、異種発現ホストの放線菌 *Streptomyces lividans* にて強制発現することで、アルテミシジン、SB-203207、SB-203208 と新規類縁化合物の取得に成功した(図1)。²⁾

もともと、生産菌として報告されていた *Streptomyces* sp. NCIMB40513 を様々な条件で培養したが、この菌でのアルテミシジン等の生産は検出できなかった。そのため本研究では、酵素の設計図である遺伝子の発現によって、失われた抗生物質生産を回復する、生合成的手法を用いた天然物生産の有用性を示す例となった。また、遺伝子破壊と *in vitro* 反応により、アシル tRNA よりイソロイシル基をスルホンアミド基へ転移する酵素 SbzA、システインから2段階の酸化を経て、スルホンアミドの S-N 結合形成までを導く新規な金属依存性酸化酵素 SbzM を含む、特異なアミノ酸生合成とその転移反応を触媒する酵素群の機能解析に成功した。²⁾ その一方で、アルテミシジンのアザインダン骨格の生合成機構は未知のままであった。

3 NAD 由来天然物生合成機構の解明

一次代謝産物を基質として受け入れ、二次代謝産物を合成する酵素は、二次代謝の多様性を産み出す鍵酵素である。そこで、一次代謝産物の前駆体を受け入れ、コアとなる骨格の生合成を担う酵素を同定するため、機能未知の7つの *sbz* クラスター遺伝子をそれぞれ異種発現し、蓄積する反応生成物の検出を試みた。すると、他の遺伝子発現では中間体の蓄積は検出されなかった一方で、pyridoxal 5'-phosphate(PLP) 依存性酵素 SbzP を発現した場合にのみ、アザインダン化合物 X が蓄積することが明らかとなった(図2)。X の骨格は β -nicotinamide mononucleotide (NMN) と類似しており、NMN と同様に、求電子的な性質を持つニコチンアミド4位の炭素が求核攻撃を受けて、C-C 結

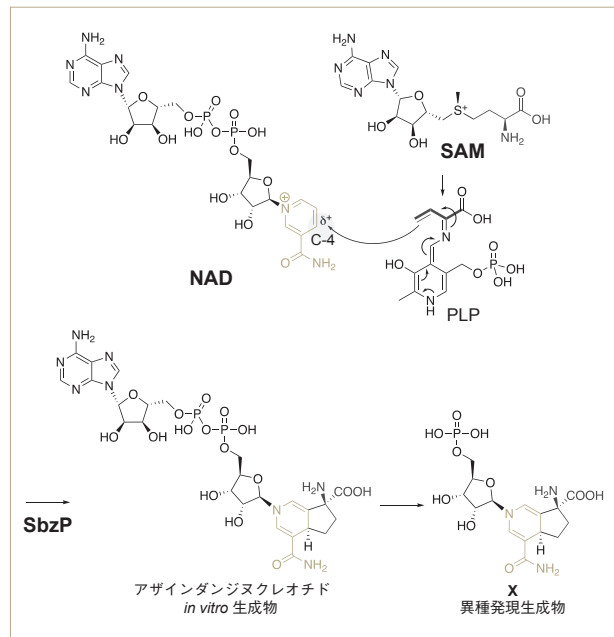


図2 SbzPの触媒するNAD, SAM間の縮合反応

合を形成する生合成経路を予想した。そこで、SbzP 組換え酵素を精製し、NMN と共通骨格を持つ NAD, NAD phosphate(NADP) と、 γ -脱離可能な8種のアミノ酸基質と *in vitro* でそれぞれ反応してスクリーニングすることで、その反応基質の同定を試みた。その結果、NAD, S-adenosylmethionine (SAM) を基質とした場合にのみ、新規骨格であるアザインダンジヌクレオチドが生成することが判明した(図2)。³⁾ 本生合成経路は、NAD を基質として天然物の骨格が合成される初めての例であり、生合成分野だけでなく、生化学、酵素学分野に大きなインパクトを与えた。SbzP 生成物は、これまでのどの二次代謝産物の分類にも属さない新規な骨格を有しており、新たな天然物群の発見となった。

SbzP は NAD と SAM の間に2回の C-C 結合を形成するが、その反応機構は、① SAM-PLP 複合体からの γ -脱離による β , γ -unsaturated quinonoid の形成、② NAD C4 位と quinonoid 中間体 γ 位間の1回目の C-C 結合形成、③活性中心 Lys334 の攻撃によるイミン/エナミン異性化反応、④ C5 位から α 炭素への攻撃による2回目の C-C 結合形成、⑤脱プロトンによる1,4-ジヒドロピリジン形成、⑥生成物の PLP からの放出、の多段階反応を経て最終生成物が生成すると考えられ、酵素化学としても

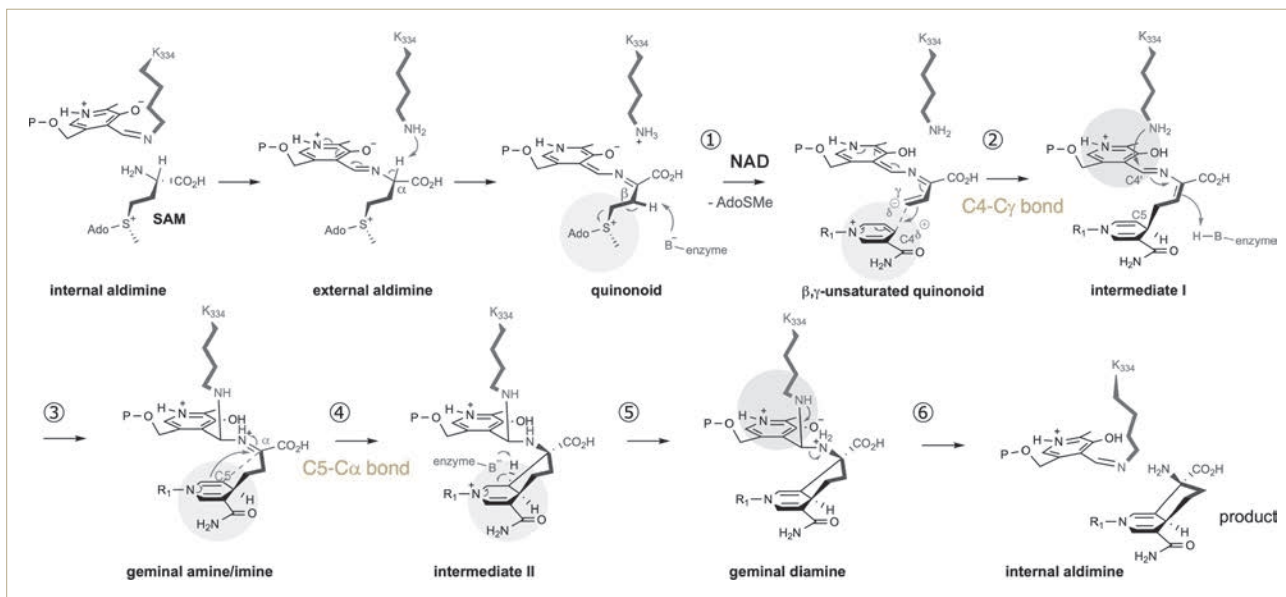


図3 SbzPの触媒するNAD, SAMの縮合反応の推定反応機構

SbzPは興味深い触媒機構を持つことが推察される(図3)。これまでに、 β , γ -unsaturated quinonoidの存在をストップフロー解析により示したが、更なる反応機構に関する情報を取得するために、酵素の構造解析、中間体の計算化学解析に取り組んでいる。

4 ニコチンアミド修飾NAD, NMN化合物の生理機能

NADは、sirtuinやPARPなどのADP-ribosyltransferaseの基質として用いられる。Sirtuinは、NADを基質としてヒストンのリジン残基に結合したアセチル基と反応し、脱アセチル化を行う。ヒトにはSIRT1~7と称される7つのsirtuinサブタイプが存在し、遺伝子転写、アポトーシスの制御を行うことで、老化などの重要な生物学的な現象に関わる。それぞれ異なるサブタイプのsirtuinに作用することで、がん、糖尿病の治療や、老化現象の制御につなげることができる。¹⁾

2011年にPesnotらは、アデニンC-8位を修飾したNADアナログを合成することで、SIRT1を特異的に阻害するNADアナログの合成に成功した(図4)。⁸⁾ NMRによる合成アナログの解析によると、NAD中AMPリボースH-2'位の化学シフトが大きく変化しており、リボース部のコンフォメーション

変化がSIRT1の活性を特異的に阻害することを可能にしたと考えられている。2012年に、SzczepankiewiczらはNMNリボース部の構造が変化した4'-carba NADを合成し(図4)、これらがSIRT3、5タンパク質内部で、基質より安定に存在するため、その複合体のX線結晶構造解析に成功した。⁹⁾ 2018年にDaiらは4'-S-NADの合成に成功し、これを用いて、NADのN-glycosyl結合を分解するCD38を阻害することに成功している。¹⁰⁾ この種のアナログは、ほかにもPARP1など、様々な

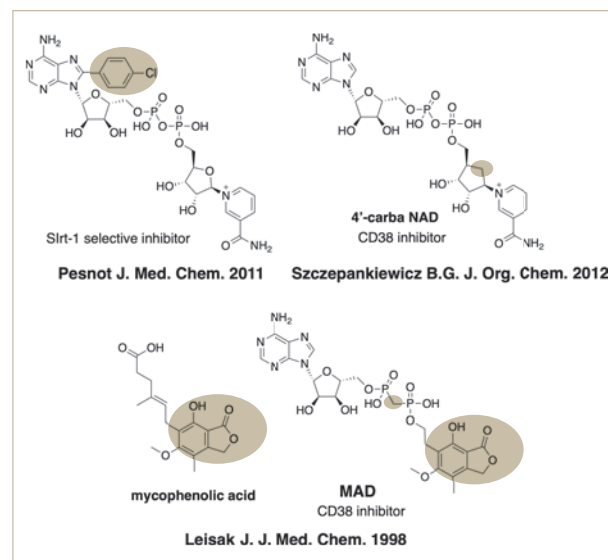


図4 医薬品活性を持つNADアナログ

NAD 利用酵素の阻害に用いることができる。SbzP の反応においても同様のアデニン修飾 NAD 基質を用いることで、sirtuin や PARP1 の特異的な阻害剤を酵素合成することが可能となる。必要に応じて、酵素の立体構造を基盤とした基質特異性の改変を行い、合成可能な分子の選択肢を増やすことが、狙った分子を酵素合成するための鍵となる。

また、inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) は、グアノシンの *de novo* 生産に関わる細胞増殖に重要な酵素であり、ヒトの IMPDH サブタイプである hIMPDH1 は血管新生などにに関わり、hIMPDH2 はがん細胞で発現量が上昇することが知られている。¹¹⁾ 細菌の IMPDH は生育に必須であるため、抗生物質のターゲットとなる。NAD アナログは IMPDH の阻害剤となり、IMPDH のニコチンアミド結合部(N-site)、アデノシン結合部(A-site)、リン酸結合部(P-site)のいずれかと結合する。天然物 mycophenolic acid は *in vivo* で N-site に結合することで、がん特異的な血管新生を阻害し、結果として免疫抑制剤として働く。¹¹⁾ これをモデルとして、N-site をターゲットとした NAD アナログ mycophenolic adenine dinucleotide (MAD) が合成されている(図 4)。¹²⁾ MAD は細胞膜透過性を高めるために、リン酸結合中の酸素原子がメチレンに置き換えられている。また、ニコチンアミド部が pyridone 骨格に置き換わった NAD アナログも合成されており、これらは、IMPDH 阻害活性は持たないものの、ヒトの抗がんターゲット、抗菌物質のターゲットとなる NAD kinase の阻害剤としての活性を持つことが示されている。¹³⁾ SbzP 生成物は、ニコチンアミドが前例のない修飾を受けているため、IMPDH の N-site への作用を通して、特異な活性を示すことが期待できる。また、酸素原子がメチレンに置き換わった P-C-P 結合を持つ NAD アナログを基質として使用し、細胞膜透過性を高めた生成物を調製するなど、医薬品により適した構造へと変換するための工夫も必要となるだろう。

5 おわりに

本研究では、二次代謝の初発反応を触媒する鍵酵

素 SbzP を同定し、本酵素が通常補酵素として働く NAD と SAM を基質として受け入れる、特異な生合成反応を発見した。NAD を天然物生合成基質として受け入れ、生成物を与える反応は、これまでに前例がなく、NAD の新規機能を開拓したという点において、生合成だけでなく幅広い学術分野に大きなインパクトを与えた。NAD が基質となる特異なジヌクレオチド化合物の生理、生物活性は極めて興味深く、多様な構造を生合成的手法にて合成し、その機能を探索すべく、現在研究を進めているところである。また NAD を求電子剤として、SAM 由来構造と 2 回の C-C 結合形成反応を触媒する SbzP の反応機構は酵素化学としても興味深く、その構造機能解析、反応解析を進めている。SbzP ホモログは 100 種近くのグラム陽性、グラム陰性細菌ゲノムに広く分布することから、同様の補酵素由来天然物生合成経路が幅広い生物種に存在すると予想され、これらの開拓によって、新規創薬シード天然物の発掘が期待される。

また本研究では、SbzP の生合成下流の、 α -ケトグルタル酸依存性酸化酵素 SbzQ によるヒドロキシル化、アシル基転移酵素 SbzI によるスルホンアミド転移、異性化酵素群 SbzN、SbzO および SbzH による脱アデノシルリボース反応、F420 依存性還元酵素 SbzF による不飽和結合の還元、メチル化酵素 SbzE による N-メチル化反応が起き、その結果、アルテミシジンが生成する一連の反応を全て *in vitro* で再構成し、その生合成経路を完全に示すことに成功した(図 5)。³⁾ SbzO は、NAD 分解活性を持つ Toll/interleukin-1 受容体(TIR)ドメインタンパク質 BtpA¹⁴⁾ のホモログであり、二次代謝経路では初の同定例であった。その分布、構造機能にも興味を持たれる。

本研究成果は、生物普遍的に存在する重要な生体分子 NAD の新たな機能を示したことに加えて、生理活性分子モデルの新規骨格とその合成法の提供を通して、医学薬学分野に有用な知見を与えた。今後、本生合成系を基盤として、医薬品として実用可能な化合物を生み出すため、その生合成工学、ケミカルバイオロジー研究を進めていく。

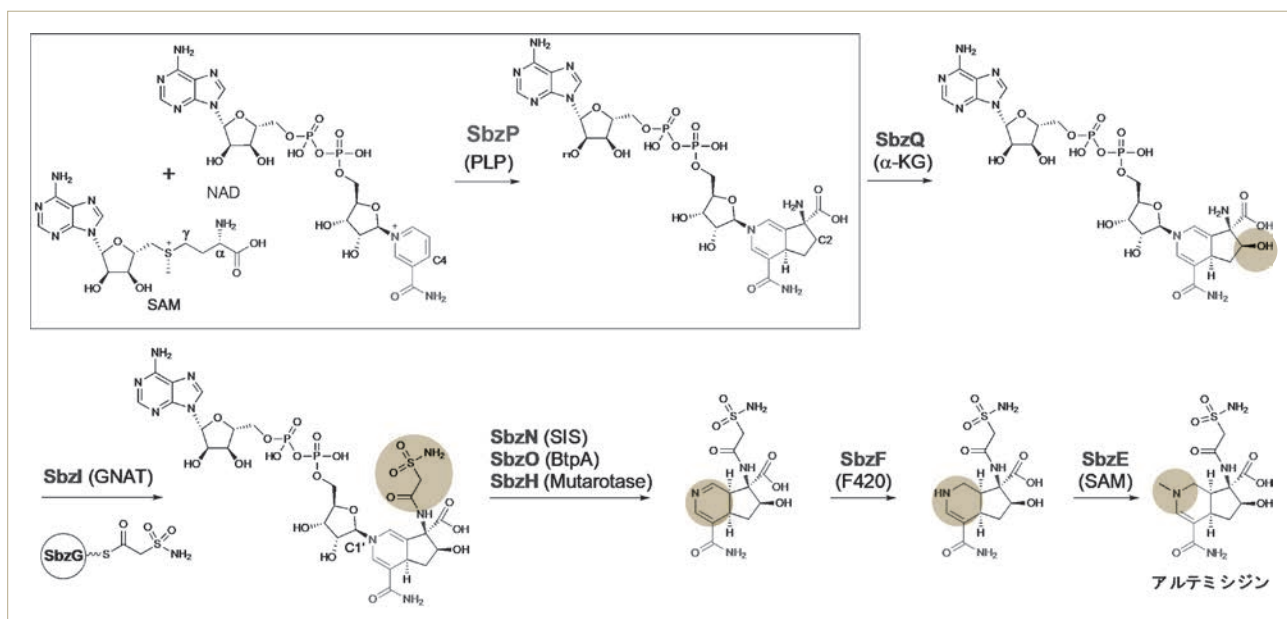


図5 アルテミシジン全合成経路の解明

PLP : PLP 依存性酵素, α -KG : α -ketoglutarate 依存性酸化酵素, GNAT : Gcn5-related *N*-acetyltransferase 型酵素, SIS : 糖異性化酵素, BtpA : BtpA ホモログ酵素.

参考文献

- 1) Depaix A. *et al.*, *Molecules*, 24, 4187–4220 (2019).
- 2) Hu Z. *et al.*, *Nat. Commun.*, 10, 184 (2019).
- 3) Barra L. *et al.*, *Nature*, 600, 754–758 (2021).
- 4) Takahashi A. *et al.*, *J. Antibiot.*, 42, 1556–1561 (1989).
- 5) Stefanska A. L. *et al.*, *J. Antibiot.*, 53, 357–363 (2000).
- 6) Tang X. *et al.*, *ACS Chem. Biol.*, 10, 2841–2849 (2015).
- 7) Yan Y. *et al.*, *Nat. Prod. Rep.*, 37, 879–892 (2020).
- 8) Pesnot T. *et al.*, *J. Med. Chem.*, 54, 3492–3499 (2011).
- 9) Szczepankiewicz B. G. *et al.*, *J. Org. Chem.*, 77, 7319–7329 (2012).
- 10) Dai Z. *et al.*, *Chem. Sci.*, 9, 8337–8342 (2018).
- 11) Felczak K. *et al.*, *Curr. Med. Chem.*, 18, 1891–1908 (2011).
- 12) Leisak J. *et al.*, *J. Med. Chem.*, 41, 618–622 (1998).
- 13) Felczak K. *et al.*, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 30, 512–523 (2011).
- 14) Coronas-Serna J. M. *et al.*, *PLoS Pathog.*, 16, e1007979 (2020).

キーワード

NAD, SAM, 天然物合成, 生理活性化合物

Copyright © 2022 The Pharmaceutical Society of Japan