



微生物に見出されたメナキノン新規生合成経路

はじめに

メナキノン（ビタミンK，以後MKと略す）は，人間にとっては血液凝固に必須なビタミンであり，また微生物では電子伝達系成分として生育に必要である¹⁻³⁾．大腸菌や枯草菌では，MKの生合成は，コリスミ酸からスクシニル安息香酸（OSB）を経る経路が既に明らかにされている（図1参照）^{2,3)}．しかし筆者は，以下に述べる経緯から，グラム陽性細菌の放線菌では既知の経路とは異なる経路で生合成される可能性を見出した．筆者は長らく放線菌が生産するイソプレノイド化合物の生合成研究を行ってきたが，約5年前に放線菌 *Streptomyces argenteolus* A-2株が生産するテトラテルペノイドであるKS-505aの生合成遺伝子の取得を試みた^{4,5)}．KS-505aの芳香環（図2中，太線で記した）は，OSBに由来することが，東京大学（現，東京農業大学）の瀬戸らのトレーサー実験により明らかにされていること⁶⁾，また，放線菌では生理活性物質生合成遺伝子群は染色体上でクラスターを成していることから，最初にOSBの生合成遺伝子を取得し，次いで周辺領域を解析することにより，KS-505aの全生合成遺伝子を取得する戦略を立てた．上述したように，OSBは既知のMK生合成経路の中間体であること，また放線菌はMKを生合成し，そのプレニル側鎖が分類の指標にも用いられている事実から，ゲノム解析が終了していた2株の放線菌，*S. coelicolor*⁷⁾と*S. avermitilis*⁸⁾からOSBの生合成に関与するMenF，MenD，MenC遺伝子を探索した．しかし，不思議なことに，ナフトキノン骨格にプレニル側鎖を付けるMenAオルソログと最終生合成ステップでメチル基を導入するMenEオルソログは存在するが，MenFからMenBに至る五つの酵素遺伝子のオルソログを全く見出せなかつ

た．さらに，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*属細菌などの微生物でも，MKを生合成するにもかかわらず，Men遺伝子のオルソログが全く存在しなかった^{9,10)}．これらの事実から，一部の微生物ではMKは全く新規な経路により生合成されると考えられたため，その全容解明を試みた結果，概略を明らかにすることができたので^{11,12)}，ここに紹介したい．

1. トレーサー実験による新規経路が存在することの確認¹¹⁾

上述した微生物ではMKの新規生合成経路が作動しているか確認するため，放線菌*S. coelicolor*を用いたトレーサー実験を行った．*S. coelicolor*の培養液に[U-¹³C₆]グルコースを添加し，生育した菌体からMKを抽出・精製した後，¹³C-NMR解析を行った．既知経路では図1に太線で示したように，エリスロース4-リン酸由来の炭素がA環のC4a，C5，C6，C7位に取り込まれるのに対し，*S. coelicolor*から抽出したMKでは，A環はおそらく既知経路同様にエリスロース4-リン酸に由来すると考えられたが，既知経路とは異なりC8a，C4a，C5，C6へと取り込まれた．また，ホスホエノールピルビン酸がC7とC8へ取り込まれた．

B環に関しては，[1,2-¹³C₂]酢酸は全く取り込まれなかったが，C1とC2，C3とC4は，グルコースのC5とC6が開裂することなく取り込まれることが分かった．

2. 新規経路に関与する遺伝子群の同定¹²⁾

トレーサー実験により，少なくとも放線菌*S. coelicolor*ではMKの新規生合成経路が作動していることが確認できたので，新規経路に関与する遺伝子・酵素群の同定を試みた．最初に*S. coelicolor*をニトロソグアニジン（NTG）で変異処理しMK要求株を取得することを試みた．しかし，MKは*S. coelicolor*の生育に必須であることから変異株選択培地にMKを添加する必要がある．*S. coelicolor*はナフトキノン骨格に炭素数40のプレニル側鎖が付いたMK8を生合成するが，MK8は市販されていないことから菌体からの抽出を試みた．しかし収量はきわめて低く，変異処理によるMK要求株のスクリーニングは断念した（下述するように，後に市販されている炭素数20のMK4が代替可能であると判明したが，当時は調べる手法が無かったため断念した）．

そこで次にバイオインフォマティクスによる候補遺伝子

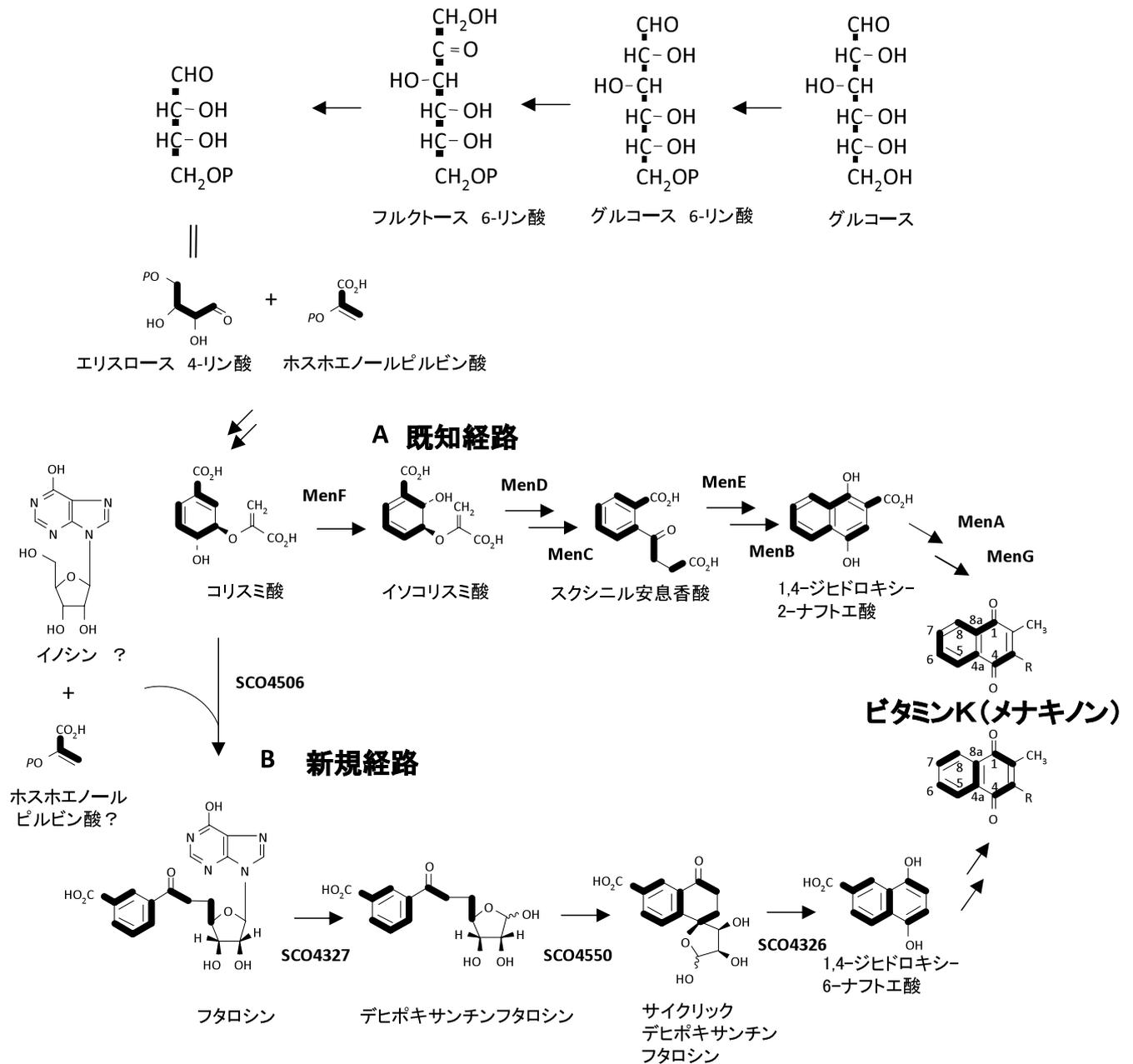


図1 メナキノンの既知(A), 新規(B)生合成経路

の絞り込みを試みた。ゲノム解析が終了している微生物のうち、既知MK生合成経路を持つ大腸菌、枯草菌、結核菌、*Corynebacterium* 属細菌が共通に持っているオルソログを総当たりBLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 解析により探索した。他方、新規経路を有すると考えられる *Helicobacter* 属、*Campylobacter* 属、*Thermus* 属、*Streptomyces* 属放線菌が共通に持つオルソログも同様に探索し

た。次いで後者に特異的に存在する遺伝子を選抜し、その中からABCトランスポーターや転写因子を除くことにより、最終的に *S. coelicolor* の *SCO 4506*, *SCO 4326*, *SCO 4327*, *SCO 4550* を新規経路に関与する候補遺伝子として選抜した。

次にこれら遺伝子が実際に新規経路に関与することを実証するため、個々の候補遺伝子の破壊実験を試みた。候補



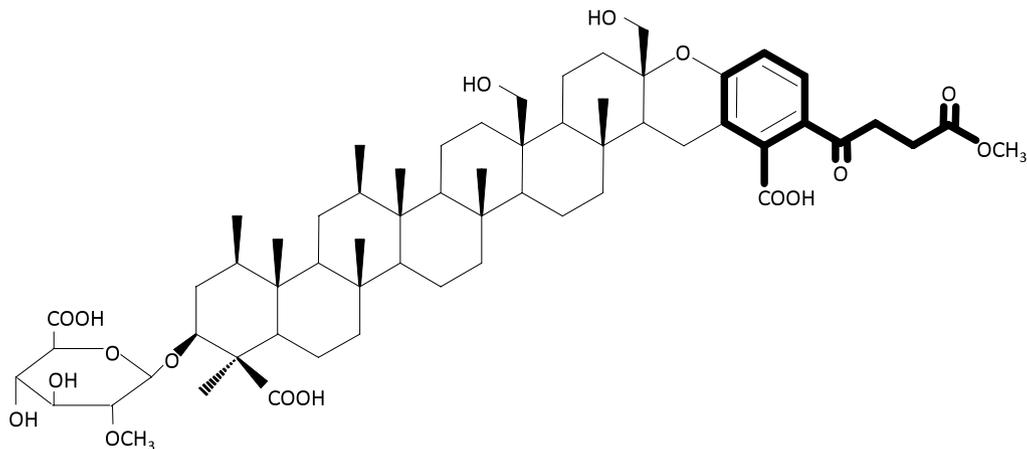


図2 KS-505aの構造
太線がスクシニル安息香酸を表す。

遺伝子を抗生物質耐性遺伝子に置換したプラスミドを構築し、2点交差の相同組換えにより破壊を試みた。前述したように、破壊株の選択のためにはMK8あるいはその代替物を選択培地に添加する必要があるため、市販されている種々のMK8関連化合物を培地に添加し破壊株が取得できるか検討した結果、MK4を添加した時、何れの候補遺伝子の破壊株も取得することができた。これらが目的とする破壊株であることは、破壊株のゲノムDNAを鋳型に用いたPCRにより確認した。さらに、破壊株からMK画分を抽出しHPLC解析を行った結果、通常 *S. coelicolor* が持つMK8は検出されず、培地に添加したMK4のみ検出できたことから、バイオインフォマティクスにより絞り込んだ四つの遺伝子が実際に新規経路に関与することを証明できた。

また、MK4がMK8の代替物として利用できることが分かったので、上述した *S. coelicolor* を用いたNTGによるMK生合成欠損株の誘導と相補遺伝子の取得も行い、新規経路遺伝子の網羅的取得も試みた。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四つの遺伝子で相補されたが、これらで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コリスミ酸シンターゼ (SCO1496)、シキミ酸キナーゼI (SCO1495)、3-デヒドロキナ酸シンターゼ (SCO1494) を含むプラスミドで相補された。そこで、この変異株をシキミ酸またはコリスミ酸を含む培地に添加し、生育が回復するか検討した結果、コリスミ酸を添加した時のみ生育が回復した。コリスミ酸シンターゼが触媒する反応 15-O-(1-カルボキシビニ

ル)-3-ホスホシキミ酸} → コリスミ酸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と考えられた。

3. 生合成中間体の同定¹²⁾

新規経路の破壊株の取得に成功したので、これら破壊株が蓄積すると期待される生合成中間体の同定を試みた。上述したようにSCO4506, SCO4326, SCO4327, SCO4550の破壊株はMK4を添加しないと生育できない。しかし、四つの破壊株のうち、二つをMK4非存在下で混合培養した結果、何れの組み合わせでも生育が認められた。この事実は、①四つの遺伝子産物は、生合成上異なるステップに関与すること、②生合成上、下流に関与する遺伝子の破壊株(中間体分泌株)が中間体を蓄積し、生合成上、上流に関与する遺伝子の破壊株(中間体変換株)が中間体をMKへと変換し生育可能になったと推定された。そこで、四つの変異株をMK4存在下で培養した後、添加したMK4を有機溶媒で除去し、残った水溶性画分を凍結乾燥後、培地に添加し、他の三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)、残りの三つの破壊株から調製した抽出物を加えた際、少なくとも他の一つの破壊株の生育が認められたことから、これら破壊株培養液中に生合成中間体が蓄積していることが分かった。本方法を用いて、最終的に四つの遺伝子産物が関与する生合成上の相対位置をSCO

4506→SCO4327→SCO4550→SCO4326 と決定することができた (図1).

次に本手法を用い合成中間体の同定, 精製, 構造決定を行った. 最初に SCO4327 破壊株を中間体分泌株に, SCO4506 破壊株を中間体変換株に用い, SCO4327 破壊株が蓄積する中間体の単離を試みた. SCO4327 破壊株の MK4 存在下での大量培養, 添加 MK4 の除去, 各種クロマトグラフィーによる分画, SCO4506 破壊株を用いたバイオアッセイに至る一連の作業に多大な労力を要したが最終的に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フタロシン (futalosine) であることが分かった (図1).

SCO4327 破壊株がフタロシンを蓄積したことから, SCO4327 産物はフタロシン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 株のタンパク質を用いてアッセイを試みた. SCO4327 のオルソログと考えられる TTHA0556 の His-tag 組換えタンパク質をフタロシンと反応させた結果, 二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, これらの酵素はフタロシンの塩基部分であるヒポキサンチンの脱離反応を触媒すると考えられた. 実際, 反応産物の一つはヒポキサンチンであることを 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, デヒポキサンチンフタロシン {dehypoxanthine (dehypoxanthinyl) futalosine (DHFL)} であることを確認した (図1). なお本酵素にはつい最近 EC 番号 (EC. 3. 2. 2. 26) が付与された.

次に上記と同様の手法で, SCO4326 破壊株を中間体分泌株に, SCO4506 破壊株を中間体変換株に用い, SCO4326 破壊株が蓄積する中間体の単離を試みた. 本中間体の蓄積量は極めて少なく, 大量精製と構造決定に1年以上費やしたが最終的に構造解析にこぎつけることができた. その結果, 本化合物は DHFL が環化した構造を持つサイクリックデヒポキサンチンフタロシン (cyclic DHFL) であることが分かった (図1). 上述した混合培養の結果から, SCO4550 が DHFL を cyclic DHFL へと変換すると考えられた. 実際, SCO4550 破壊株培養液中には微量の DHFL の蓄積が認められたことから, SCO4550 および *T.*

thermophilus HB8 株のオルソログである TTHA1092 の組換え酵素を調製し DHFL との反応を行った. SCO4550/TTHA1092 はラジカル SAM (*S*-アデノシルメチオニン) タンパク質と推定されていることから, 嫌気条件下で組換え酵素の精製と酵素反応を行ったが cyclic DHFL の生成は認められなかった. 更なる反応条件の最適化, 補酵素の要求性などの検討が必要と思われる.

SCO4326 破壊株が cyclic DHFL を蓄積したことから, SCO4326 産物は cyclic DHFL を次の中間体に変換すると考えられた. そこで SCO4326 産物を組換え酵素として発現・精製後, cyclic DHFL と反応させた結果, 特異的反應産物が検出できた. LC-MS による解析の結果, 本産物は 1,4-naphthoquinone-6-carboxylic acid (NQCA) であることが分かった (本化合物は共同研究者である東京農業大学の瀬戸治男教授が, トレーサー実験の結果から新規経路の中間体である可能性を推定し, 化学合成した標品を用いてバイオアッセイにより中間体であることを実証していた化合物である. 文献11参照).

おわりに

以上述べてきたように, トレーサー実験, バイオインフォマティクス, 変異株の分離と相補遺伝子の取得, 遺伝子破壊実験, 天然化合物の精製と構造決定, 組換え酵素を用いた *in vitro* 実験という, 新しい技術と既存の技術, 分野の異なる技術をうまく融合させ, 微生物に見出した MK の新規生合成経路の解明を試みた. その結果, 本経路にかかわる四つの遺伝子と四つの中間体を同定し, その概略を明らかにすることができた. 未だ SCO4506 が触媒すると考えられるコリスミ酸からフタロシンが生成する反応, SCO4550/TTHA1092 が触媒する DHFL を cyclic DHFL へと変換する反応に関しては未解明であるが, これらの反応については現在, Cornell 大学の Begley 教授との共同研究で詳細を解析しており, 近い将来全容が解明できると考えている. また, NQCA 以降の生合成経路については未解明であるが, 前述したナフトキノン骨格にプレニル側鎖を付ける MenA (SCO4491) とオペロンを成す SCO4490 と SCO4492 が, *S. coelicolor* がユビキノンを生合成しないにもかかわらずユビキノンの生合成に関与する脱炭酸酵素として推定されていることから, これらが NQCA の脱炭酸反応を行うのかもしれない. また, 最終生合成ステップでのメチル基の導入は, MenE (SCO4556) により触媒されると推定された.

本新規経路は上記病原菌に特異的な経路であり, 有用な

乳酸菌などの腸内細菌群は既知経路のみを有していることから、新規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、天然食中毒予防剤開発への展開が期待できる。

本研究は、東京農業大学 瀬戸治男先生（トレーサー実験）、東京大学 降旗一夫先生（中間体の構造決定）、国立感染症研究所 石川 淳先生（バイオインフォマティクス）との共同研究で得られた成果でありこの場を借りて深謝申し上げます。

- 1) Cranenburg, E.C., Schurgers, L.J., & Vermeer, C. (2007) *Thromb. Haemost.*, 98, 120–125.
- 2) Bentley, R. & Maganathan, R. (1982) *Microbiol. Rev.*, 46, 241–280.
- 3) Meganathan, R. (2001) *Vitam. Horm.*, 61, 173–218.
- 4) Nakanishi, S., Osawa, K., Saito, Y., Kawamoto, I., Kuroda, K., & Kase, H. (1992) *J. Antibiot.*, 45, 341–347.
- 5) Hayashi, Y., Onaka, H., Itoh, N., Seto, H., & Dairi, T. (2007) *Biosci. Biotech. Biochem.*, 71, 3072–3081.
- 6) Seto, H., Watanabe, H., Orihara, N., & Furihata, K. (1996) 38th Symposium on the Chemistry of Natural Products, Abstract, pp. 19–24.
- 7) Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G. L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitz, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J., & Hopwood, D.A. (2002) *Nature*, 417, 141–147.
- 8) Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., & Hattori, M. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 98, 12215–12220.
- 9) Tomb, J.F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Klenk, H.P., Gill, S., Dougherty, B.A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E.F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H.G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzgerald, L.M., Lee, N., Adams, M.D., Hickey, E.K., Berg, D.E., Gocayne, J. D., Utterback, T.R., Peterson, J.D., Kelley, J. M., Cotton, M. D., Weidman, J.M., Fujii, C., Bowman, C., Watthey, L., Wallin, E., Hayes, W.S., Borodovsky, M., Karp, P.D., Smith, H.O., Fraser, C.M., & Venter, J.C. (1997) *Nature*, 388, 539–547.
- 10) Parkhill, J., Wren, B.W., Mungall, K., Ketley, J.M., Churcher, C., Basham, D., Chillingworth, T., Davies, R.M., Feltwell, T., Holtroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A.V., Moule, S., Pallen, M. J., Penn, C.W., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rutherford, K. M., van Vliet, A.H., Whitehead, S., & Barrell, B.G. (2000)

Nature, 403, 665–666.

- 11) Seto, H., Jinnai, Y., Hiratsuka, T., Fukawa, M., Furihata, K., Itoh, N., & Dairi, T. (2008) *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 5614–5615.
- 12) Hiratsuka, T., Furihata, K., Ishikawa, J., Yamashita, H., Ito, N., Seto, H., & Dairi, T. (2008) *Science*, 321, 1670–1673.

大利 徹

(富山県立大学工学部生物工学科)

An alternative menaquinone biosynthetic pathway operating in microorganisms
Tohru Dairi (Biotechnology Research Center, Toyama Prefectural University, 5180 Kurokawa, Imizu-city, Toyama 939-0398, Japan)

間葉系幹細胞の基礎と臨床応用

1. はじめに

幹細胞とは自己増殖能と多分化能を有する細胞で、胚性幹細胞 (ES 細胞) や山中らにより創製された人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) がよく知られている。しかし、我々の体内にも幹細胞は存在し、例えば造血幹細胞については基礎研究ならびに臨床応用も活発である。また、間葉系幹細胞とよばれる幹細胞も存在し、中胚葉由来の骨・軟骨へ分化する。この分化能を利用して、骨関節疾患の再生医療において臨床応用が開始されている。間葉系幹細胞は種々組織から得られるが、古くよりその存在が知られ¹⁾、現在臨床応用のための細胞ソースとして用いられている組織は骨髓である。骨髓に含まれる細胞は大きく二つに分かれ、血球系の細胞とそれを支持する間質細胞が存在する。本稿ではこの骨髓に含まれる間質細胞を培養し、繊維芽細胞様の形態をもってシャーレ上に付着増殖する細胞群を間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells: MSC) と呼ぶ²⁾。上述のように、MSC は骨や軟骨に分化することは知られていたが^{1,2)}、この数年外胚葉や内胚葉由来の組織細胞へも分化することが報告されている³⁻⁵⁾。また、MSC は血管内皮細胞へも分化するのみならず VEGF (血管内皮細胞成長因子: vascular endothelial growth factor) を多量に分泌する⁶⁻⁸⁾。これらの経緯をふまえて我々は骨・関節疾患のみならず心疾患患者に対しても患者自身の MSC を用いる再生医療を医療機関とともに開始している。患者自身の MSC を用い