

# 合成生物学によるメチル化酵素阻害剤多様化法の開発

東京大学大学院薬学系研究科

牛丸 理一郎

## 背景・目的

メチル基転移酵素は補酵素 *S*-アデノシル-L-メチオニン (SAM) を用いて、DNA、タンパク質、低分子などの様々な生体分子をメチル化する酵素群である。メチル化反応は、胚の発生、エピジェネティック制御による遺伝子発現、細胞内シグナル伝達、代謝など、多くの生命現象に関わるため、メチル基転移酵素は幅広い疾患に関連する標的として以前から注目されている。

放線菌由来ヌクレオシド天然物シネフンギンは SAM と類似性の高い化学構造を有しているため、複数の SAM 依存性メチル基転移酵素の競合阻害剤として作用し、抗腫瘍活性、抗ウイルス活性、抗寄生虫活性などを示す (図 1)。特に最近では SARS-CoV-2 の増幅に関わる RNA メチル基転移酵素 nsp16 や腫瘍抑制タンパク質メチル基転移酵素 SETD2 に対しても阻害活性を示すことが明らかとなり、抗ウイルス薬や抗がん剤開発への応用が期待されている。一方で、天然由来資源であるシネフンギンを創薬分野へ応用するにあたり、特定のメチル基転移酵素に対する選択性が低く、多くの望まないオフターゲットに作用してしまうこと、また化学合成による安定・大量供給が困難なことが問題となる。そこで本研究ではシネフンギンの生合成機構を明らかにし、異種生産技術を駆使することで安定・大量供給を可能にし、さらに創薬展開を志向した合成生物学を用いた生合成経路の改変によりシネフンギンの化学構造多様化法を開発することを目的とした。

シネフンギンは約 50 年前に放線菌から単離構造決定されたものの、その生合成経路は今日まで未解明のままである。ROBERT-GERO らは同位体標識化合物を用いた実験によりシネフンギンの前駆体はアルギニンとアデノシンであることを明らかにしている (*J. Antibiot.* **1984**, 1204)。RNA ポリメラーゼ  $\beta$ -サブユニット遺伝子(rpoB)における変異が放線菌 *Streptomyces. incarnatus* NRRL8089 によるシネフンギンの生産が増大することが報告されているが、生合成に直接関わる遺伝子群の同定には至っていない (*Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2021**. 85, 1275)。

## 結果

### (1) 比較ゲノム解析によるシネフンギン生合成遺伝子クラスターの同定

まず初めにシネフンギン生合成遺伝子クラスターの同定を目的としゲノム解析を行った。公開されている *S. incarnatus* NRRL 8089 のゲノム情報からはシネフンギン合成遺伝子クラスターを予想することは困難であった。一方で、L-バリンと L-アラニンによってペプチド修飾されたシネフンギン誘導体であるシネフンギン

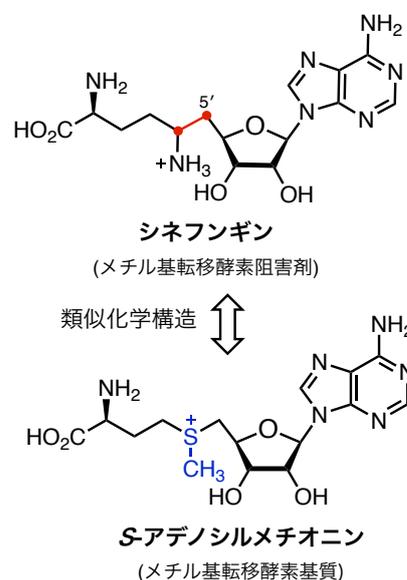


図 1. シネフンギンの構造と SAM との構造類似性



ドであるシネフンギン V やそれらの脱水素体(デヒドロシネフンギン VA、デヒドロシネフンギン V) が検出された。シネフンギン生合成遺伝子クラスターには鉄依存性酸化酵素をコードすると思われる遺伝子が含まれているため、この酵素が脱水素反応を触媒していると予想された。

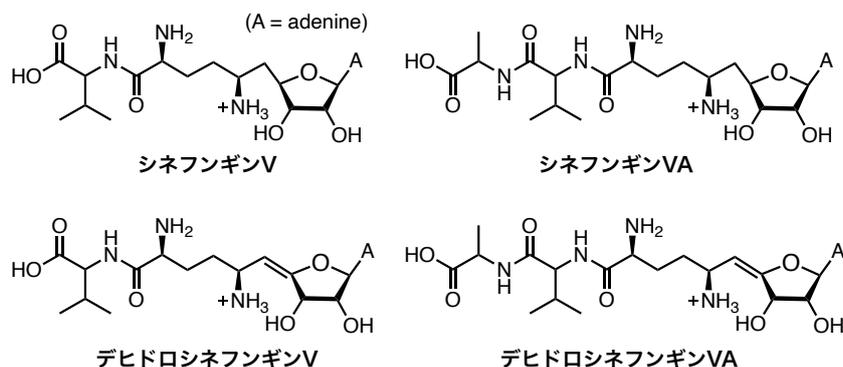


図4. 検出されたシネフンギン誘導体.

### (3) 生合成遺伝子クラスターの異種発現

同定した生合成遺伝子クラスターの機能を明らかにするため遺伝子の異種発現実験を行った。アルギニンとアデノシン誘導体との間のアミノ酸-ヌクレオシドカップリング反応を触媒すると予想された SfgX をコードする遺伝子をベクターpIB139へとクローニングし、異種放線菌宿主 *Streptomyces lividans* TK24に導入した。この形質転換体を培養し代謝物を解析したところアミノ酸とアデノシンの複合体（未発表のため詳細情報を省く）が得られた。このことから SfgX はシネフンギン生合成においてヌクレオシドの炭素鎖伸長反応を触媒する鍵酵素であることが明らかとなった。また、sfgX、sfgA、sfgB を含む 6 つの遺伝子を同時に発現したところシネフンギンの生産が確認された。この得られた遺伝子クラスターはシネフンギン生合成遺伝子クラスターであると結論づけた。

### 今後の展望

本研究ではアミノ酸とヌクレオシドを結合する新規酵素 SfgX やペプチドを伸長する新規酵素 SfgA、SfgB を見出した。今後はこれらの新規酵素の詳細な構造機能解析を行う。特に炭素-炭素結合形成酵素 SfgX を用いて天然の生合成基質とは異なる基質を縮合することができれば、コンビナトリアル化学によって多数の非天然型ヌクレオシド誘導体をわずか 1 工程で合成し、メチル基転移阻害剤の候補化合物を迅速に創出することが可能となる。特異な化学構造を持つシネフンギンの生合成経路の解明とその化学構造多様化法の確立を目指す本研究は、基礎科学分野のみならず医薬品業界にも大きく貢献するものと期待される。

### 謝辞

本研究の推進にあたり、公益財団法人アステラス病態代謝研究会にご支援を賜りましたことを深く感謝申し上げます。