総 説

見逃されていたイソプレノイド
生合成経路：非メバロン酸経路
とその特異的阻害剤

葛山 智久・瀬戸 治男

東京大学分子細胞生物学研究所

(〒113-0032 東京都文京区弥生 1-1-1)

Overlooked Nonmevalonate Pathway for Isopentenyl
Diphosphate Biosynthesis and Specific Inhibitors

Tomohisa KUZUYAMA and Haruo SETO

Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo

(1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032)

Abstract : Several eubacteria including *Escherichia coli* utilize a mevalonate-independent pathway (nonmevalonate pathway) for the biosynthesis of isopentenyl diphosphate. In the nonmevalonate pathway, 2-C-methyl-D-erythritol or its 4-phosphate, possibly formed from 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) via intramolecular rearrangement followed by reduction, is a biosynthetic precursors of isopentenyl diphosphate. To clone the gene(s) responsible for the synthesis of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP), *E. coli* mutants with obligatory requirement for 2-C-methylerythritol for growth and survival were prepared. DNA fragments complementing the defect in synthesizing MEP of these mutants contained the *yaeM* gene located at 4.2 min on the chromosomal map of *E. coli*. The gene product showed significant homology to hypothetical proteins with unknown functions in many eubacteria. The *yaeM* gene product overexpressed in *E. coli* was found to catalyze the formation of MEP from DXP in the presence of NADPH. The *yaeM* gene is thus clearly shown to encode a novel enzyme, DXP reductoisomerase, which synthesizes MEP from DXP in a single step by intramolecular rearrangement and reduction. Fosmidomycin was noted to be a specific inhibitor of DXP reductoisomerase.

Key words : Isoprenoid, nonmevalonate pathway, 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, fosmidomycin

1 はじめに

テルペン化合物は、炭素5個からなるイソペンテニル 2 リン酸 (IPP) が複数個縮合することにより生成される化合物である。IPP の縮合、及びそれに続く環化パターンは多様であり、現在までに報告されているテルペン化合物は 22,000 以上にも及んでいる¹⁾。これらは生体の構成成分として、あるいは生理活性物質などとして多様な役割を担っており、また近年では、プレニル化は

RAS タンパクなどのタンパク質の活性発現に必須であることも判明している。

IPP は、acetyl CoA (アセチル CoA) から 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA, 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA), mevalonate (メバロン酸) を經由するメバロン酸経路 (Fig. 1, A 経路) で生合成される。このメバロン酸経路、及びメバロン酸経路からホルモン等のステロイドへ至る生合成経路は、マウスや酵母などの真核生物を用いた精力的な研究により確立された。さらにこれらの経路の生合成酵素や遺伝子が単離され、生体内における様々な調節機構までもが解明され

た²⁾。そしてメバロン酸経路は、微生物から高等動物、植物に至るまでの全ての生物に普遍的な唯一の IPP 合成経路として認知されるに至ったのである。しかしながら近年、高等植物の葉緑体、緑藻、多くの真正細菌において、メバロン酸経路とは全く異なる新規経路、非メバロン酸経路 (Fig. 1, B 経路) の存在が示され^{3)~5)}、注目されている。しかしながら、非メバロン酸経路に関する研究は始まったばかりであり、大部分が未解明のままである。本総説では、最近明らかにされつつある非メバロン酸経路に関する研究について紹介する。

2 非メバロン酸経路の第1段階

非メバロン酸経路の第1段階は glyceraldehyde 3-phosphate (グリセルアルデヒド 3 リン酸) と pyruvate (ピルビン酸) の縮合による 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP, 1-デオキシ-D-キシルロース 5-リン酸) の生成である (Fig. 1, B 経路)。この反応を触媒する酵素 DXP synthase をコードする遺伝子は、2つのグループによって独立に *Escherichia coli*^{6,7)} からクローニングされた。これらのグループの研究者らは、グリセルアルデヒド 3 リン酸とピルビン酸の縮合反応が、トランスケトララーゼ (EC 2.2.1.1) による反応と似ていることを利用し、まず最初に *E. coli* ゲノムの全塩基配列⁸⁾ (1997年に全塩基配列が解明されているが3割強の配列がまだ機能未知である)の中から、トランスケトララーゼのアミノ酸配列と相同性を示し、かつ機能不明の遺伝子を検索した。その結果、*E. coli* ゲノムの9.5分 (*E. coli* の環状ゲノムの複製起点を0分として全塩基配列を100分まで等分し遺伝子の位置を分で表す)に位置する機能未知の遺伝子 *HI 1439* を、DXP synthase 遺伝子の候補としてクローニングした^{6,7)}。次に、この遺伝子を大量に発

現させ、得られたタンパクを2つの基質 (グリセルアルデヒド 3 リン酸とピルビン酸) とインキュベートしたところ、予想通り DXP が生成した。この結果から、*HI 1439* 遺伝子が *E. coli* の DXP synthase をコードしていることが判明した^{6,7)}。この酵素はチアミン 2 リン酸と Mg^{2+} を要求することも明らかにされている。また、DXP synthase ホモログは、ゲノムの全塩基配列が判明しているその他の生物 (<http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdb.html> に情報がある)、*Haemophilus influenzae*, *Synechocystis* sp. (PCC 6803), *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae* にも存在していた^{6,7)}。つまり、これらの生物は、非メバロン酸経路を持っていることが明らかになったのである。非メバロン酸経路の生物における分布については後述べる。

3 非メバロン酸経路の第二段階

次に、DXP synthase によって生成した DXP は、ピナコール型の分子内転位により 2-C-methylerythrose 4-phosphate (2-C-メチルエリスロース 4-リン酸) に変換され、さらに 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP, 2-C-メチル-D-エリスリトール 4-リン酸) に還元されると考えられていた (Fig. 1)⁹⁾。つまり、分子内転位反応と還元反応が別々の酵素によって触媒されると予想されていた。しかしながら、これらの反応の実体は全く不明であり、触媒する酵素や遺伝子は明らかにされていない。唯一、MEP の遊離アルコール体である 2-C-methylerythritol (ME, 2-C-メチルエリスリトール) が *E. coli* に取り込まれ、IPP に変換されることが証明されていた (Fig. 1)⁹⁾。そこで我々は、DXP 以降の反応を明らかにすることを試みた。

Fig. 1 The Mevalonate and Nonmevalonate Pathways for IPP Biosynthesis.

反応機構解明のためには、その反応を触媒する酵素を取得することが重要である。そこで我々は、以下に述べる3つの方法を当初考えた。方法1: DXP から MEP に至る反応と似ている既知の反応を検索し、その反応を触媒する酵素に関する情報を用いて、目的の遺伝子を *E. coli* ゲノムから取得する。その後、この遺伝子を発現させることにより得られる酵素と DXP を反応させ、反応生成物の構造を決定する。この方法は、上述した DXP synthase を取得した方法と同じである。方法2: *E. coli* から調製した菌体内粗抽出液を DXP と反応させ、反応生成物の構造を決定する。その後、この反応を触媒する酵素を精製する。方法3: MEP 要求変異株を単離し、MEP 要求性を示さなくなることを指標に、その変異を相補する遺伝子を取得する。さらに、この遺伝子を発現させて酵素を精製し、DXP と反応させ反応生成物の構造を決定する。

次に、これらの3つの方法に従って得た結果について順に述べる。

3.1 方法1

DXP から MEP に至る反応と似ている既知の反応を触媒する酵素として、バリンの生合成経路上のケトール酸レダクトイソメラーゼ (EC 1.1.1.86) が候補に挙げられた。この反応では、2-acetolactate (2-アセト乳酸) が、NADPH の存在下ピナコール型の転位反応と還元を受けて一段階で 2,3-dihydroxyisovalerate (2,3-ジヒドロキシイソ吉草酸) に変換される (Fig. 2)。DXP も、2-アセト乳酸と同じように、ケトール酸レダクトイソメラーゼと似た反応を触媒する酵素によって、転位反応と還元を受けて一段階で MEP に変換される可能性を考えた。そこで、*E. coli* のケトール酸レダクトイソメラーゼのアミノ酸配列を入手し、*E. coli* ゲノムの全配列から相同性を示す配列を検索した。しかしながら、ケトール酸レダクトイソメラーゼそのものの以外に相同性を示す配列は得られなかった。この結果は、DXP から MEP に至る反応では、ケトール酸レダクトイソメラーゼが触媒する反応とは異なり、転位反応と還元反応が別々の酵素によって触媒される可能性を示唆していた。または、2つの反応の反応機構は似ているが、それらの反応を触媒する2つの酵素のアミノ酸配列の間には相同性は無いが、非常に低いことが考えられた。

3.2 方法2

我々は放射ラベルした ^{14}C -DXP を酵素的に合成し、

E. coli から調製した菌体内粗抽出液と反応させたが、期待したような新しい化合物の生成は検出できなかった。この結果は、DXP を変換する酵素は非常に微量であるため、その酵素活性の検出は困難であることを示していた。従って、本方法を用いて DXP を変換する酵素を精製することは困難であると考えられた。実際、DXP を変換する酵素の実体が判明してから再度測定し直したが、*E. coli* の菌体内粗抽出液には、目的の酵素は極微量しか存在しておらず酵素活性の検出は不可能であった。

そこで、一見最も遠回りと考えられる方法3を用いて MEP の生成機構を解明することを試みた。

3.3 方法3

この方法では、MEP が *E. coli* 内に取り込まれることが前提であるが、一般にリン酸エステルは細胞膜を通してにくいとされており、MEP も *E. coli* に取り込まれないと考えた。一方、前述したように、MEP の遊離アルコール体である ME は *E. coli* に取り込まれて利用されることが報告されていた (Fig. 1)⁹⁾。従って、MEP の代わりに ME を使用すれば、目的の ME 変異株が取得できると考えた。ME 要求変異株が単離できれば、ME 要求性を示さなくなることを指標に、その変異を相補する遺伝子、すなわち MEP 合成に関与する遺伝子を取得することが可能である。そこでまず、MEP 合成欠損変異株をスクリーニングするために必要な ME を化学合成した。

次に、変異の導入には紫外線照射よりも効率が良いとされている *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG, *N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン) を用いた。2 mg/ml の NTG を含む 50 mM トリスマレイン酸 (pH 7) 緩衝液中で *E. coli* の菌体を 37 度、40 分処理し、ゲノム上にランダムに変異を導入した。この変異処理を施した *E. coli* を ME を添加した最少培地に塗布し、37 度で 2 日間培養し、出現してきたコロニーを爪楊枝で釣り上げて、最少培地と、0.025% の ME を添加した最少培地との両培地に植菌した。さらに 2 日間 37 度で培養し、ME を添加した最少培地でのみ生育できるコロニーを目的の変異株として選択した。この方法で約 2 万コロニーをスクリーニングした結果、10 個の ME 要求株が得られた^{10), 11)}。

次いで、平均約 2 kb 長の *E. coli* の DNA 断片を含むゲノムライブラリーを作製し、これらの変異株に導入し

Fig. 2 Ketol Acid Reductoisomerase Reaction.

て、今度はMEを含まない最少培地に塗布した。本来はMEを含まない最少培地では生育することのできないME要求変異株が、DNA断片を導入された結果MEを要求しなくなれば、その導入されたDNA断片にはME要求株の変異を相補することのできる遺伝子が含まれていることになる。この方法により得られたDNA断片の塩基配列を決定したところ、4種類の長さのDNA断片 (Fig. 3のpMEW 41, pMEW 112, pMEW 106, pMEW 73) が得られていることが判明したが、いずれのDNA断片も *E. coli* ゲノムの4.2分に位置する *yaeM* 遺伝子を共通して含んでいた。

この遺伝子は、*E. coli* 以外にも *B. subtilis*, *M. tuberculosis*, *H. pylori*, *H. influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* にも存在していたが、いずれも機能未知の遺伝子として報告されていた。これらの *yaeM* 遺伝子ホモログは、互いに38%程度の相同性を示した (Fig. 4)。また、N末端部分の配列にNAD(P)H結合モチーフが確認されたことから (Fig. 4の十)、この遺伝子産物は、NADHまたはNADPHを補酵素として利用する還元酵素であることが示唆された。

次に、この遺伝子産物の機能を明らかにするため、遺伝子の大量発現を行った。*yaeM* 遺伝子を *E. coli* 用の発現ベクターであるpQE 30のT5プロモーターの下流に連結し、isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド) によって *yaeM* 遺伝子の発現を誘導したところ、菌体内可溶タンパクの約70%が *yaeM* 遺伝子産物として得られた。このタンパ

クをNi-nitrilotriacetic acid agarose樹脂を用いて精製したところ、SDS-PAGEで約42 kDa, native PAGEで165 kDaの分子量を示したことから、このタンパクは4量体となっていることが判明した。次に、この精製タンパクをMn²⁺とNADPHの存在下、DXPと反応させたところ、NADPHの消費が観察され反応の進行が確認された。そこで、反応生成物を、Dowex-1 (Cl⁻型)とSephadex G-10を用いて精製し、NMRとMSスペクトルを解析したところ、反応生成物はMEPであることが判明した^{10),11)}。この結果から、この *yaeM* 遺伝子産物は、DXPの骨格の分子内転位と同時に還元反応をも触媒し、一段階でDXPからMEPを合成するDXP reductoisomerase (DXPレダクトイソメラーゼ) であることが明らかとなった (Fig. 5)。すなわち、DXPからMEPが合成される過程において、当初予想されていた2-C-メチルエリスロース 4-リン酸は、遊離の化合物としては全く検出されなかった。おそらく、2-C-メチルエリスロース 4-リン酸は、DXPレダクトイソメラーゼの触媒する反応の過程で、この酵素の活性部位と結合していると考えられる。

今回得られた結果から、DXPレダクトイソメラーゼによる反応は、先述したケトール酸レダクトイソメラーゼによる反応 (Fig. 2) とよく似ていることが明らかになった。なお、この反応において2-C-メチルエリスロース 4-リン酸に相当する2-oxo-3-hydroxyisovalerate (2-オキソ-3-ヒドロキシイソ吉草酸) は、この反応を阻害することが報告されている¹²⁾ことを考慮すると、2-C-メチルエリスロース 4-リン酸が反応中間体として検出できなかったことは妥当であると考えられる。

4 非メバロン酸経路の阻害剤

DXPレダクトイソメラーゼは、上述したように真正細菌に広く分布している。一方、真核生物である酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のゲノム¹³⁾ (1998年に全塩基配列が解読された) には、DXPレダクトイソメラーゼは存在しないことが判明しており、人間を含めた哺乳類は非メバロン酸経路を利用していないと考えられる。従って、DXPレダクトイソメラーゼは、極めて選択性の高い抗菌剤を目指す新しい分子ターゲットとして理想的であると考えた。ただし、抗生物質の探索は製薬会社を中心にこれまで様々なアッセイ系で行われており、数多くの抗菌化合物が報告されている。DXPレダクトイソメラーゼの阻害剤は抗菌作用を示すことが予想され、過去にターゲット未知の抗菌化合物として報告されている可能性があった。そこで、DXPレダクトイソメラーゼ阻害剤の可能性のある抗菌化合物をデータベースから検索することを試みた。その際我々は、化合物の抗菌スペクトルに注目した。なぜならば、DXPレダクトイ

Fig. 3 A Restriction Map Around the *yaeM* Gene and DNA Fragments that Complemented IPP Biosynthesis Coding Region of the Isolated Mutants. The arrows indicate the extents and directions of the open reading frames found in the database of *E. coli* genome sequence. The *smb*, *frr*, and *cdsA* genes have previously been identified as MukB suppressor protein, ribosome recycling factor and phosphatidate cytidyltransferase, respectively. Both the *yaeM* and *yaeS* gene products have been reported as hypothetical proteins. pMEW 73 contains only the *yaeM* gene in its inserted DNA. The plasmid overcame requirement of ME for growth of all the mutants.

Ec	1:	M-----	1
Bs	1:	M-----	1
Hi	1:	M-----	1
Hp	1:	M-----	1
My	1:	MATGGRVVIRRRGDNEVVAHNDEVNTSDGRADG	34
Sy	1:	M-----	1
		*	
	+++++++		
Ec	2:--KQ-LTILGSTSGIGCSTLDVVRHNPEHFRVVALVAGKNVTRMVEQCLEFSRPAVMD	58	
Bs	2:--K-NICLLGATGSIGETLQDVLRAHQDQFQVLSMSFGRNIDKAVPMIEVFQPKFVSVGD	58	
Hi	2:--QKQNVILGSTSGIGKSTLSVIENNPQKYHAFALVGKKNVEAMFEQCICKRPHFAALDD	60	
Hp	2:-V-----VLGSTSGIGKNA--KIAKKFGIEIEALSCGKNIALINEQIQVFKP--KKVA	50	
My	35:--RLRVVVLGSTSGISGTQALQVIADNPDRFEVVGLAAGG--AHLDTLLRQ-RAQ-TGVTN	89	
Sy	2:-VK-RISILGSTSGISGTQTLDIVTHHPDAFQVVGLAAGNVALLAQQVAEFRPEIVAIRQ	59	
	** * * * *	*	
Ec	59:EASAKLL-KTMLQQQGSRTTEVLSGQQAACDMALEDVDQVMAAIVGAAGLLPTLAAIRAG	117	
Bs	59:LDTYHKLK-QMS-FS-FECQIGLGEGLIEAAVMEEVDIVVNALLGSVGLIPTLKAIEQK	115	
Hi	61:VNAAKIL-REKLI AHHPTEVLGARRAICELAAHPDADQIMASIVGAAGLLPTLSAVKAG	119	
Hp	51:ILDPSDLN-DLEPLGAIEVVGLEG--IDAMI-EECTSNLVLNAIVGVAGLKASFSLQRN	106	
My	90:IA-VAD-EHAAQRVGDI-P-Y-HGSDAATRLVEQTEADVNLALVGALGLRPTLAALKTG	144	
Sy	60:AEKLEDLKA AVELTDYQPMYVVGEEGVVEVARYGDAESVVTGIVGCAGLLPTMAAIAAG	119	
	*	* * *	
Ec	118:KTILLANKESLVTGRLFMDAVKQSKAQLLPVDSEHNAIFQSLPQPIQHNLYADLEQNG	177	
Bs	116:KTIALANKETLVTAGHIVKEHAKKYDVP LLPVDSEHSAIFQAL----Q---G---EQAKNI	166	
Hi	120:KRVLLANKESLVTGCGQLFIDAVKNGYKLLPVDSEHNAIFQSLPPEAQEKIFCPLSELG	179	
Hp	107:KKLALANKESLVSAG--HL-L-DI--SQITPIDSEHFGLWALL----QNKTL-----K	150	
My	145:ARLALANKESLVAGG--SLVLAARPGQIVPVDSEHSAQAQL----RGGTPD-----E	193	
Sy	120:KDIALANKETLIAGAPVVLPLVEKMGVKLLPADSEHSAIFQCL----Q---G---VPEGGL	170	
	**** *	* * * * *	
Ec	178:VVSILLTGSGGPFR-ETPLRDLATMTPDQACRHPNWSMGRKISVDSATMMNKGLEYIEAR	237	
Bs	167:ERLI-ITASGGGFR-DKTREELESVTVEDALKHPNWSMGAKITIDSATMMNKGLEVIEAH	225	
Hi	180:VSKII LTGSGGPFR-YTPLEQFTNITPEQAVAHNPWSMGKKISVDSATMMNKGLEYIEAR	239	
Hp	151:PKSLIISASGGAFRD-TPLEFIPIQNAQNALKHPNWSMGSKITIDSASMVNKLFEILETY	209	
My	194:VAKLVLTASGGAPFRGWSAADLEHVTPEQAGAHPTWSMGPMNTLNSASLVNKGLEVIETH	254	
Sy	171:RRII-LTASGGAFR-DLPVERLPFVTVDALKHPNWSMGKITIDSATMMNKGLEVIEAH	229	
	***	* * * * *	
Ec	238:WLFNASASQMEVLIHPQSVIHSVMVRYQDGSVLAQLGEPDMRTPIAHTMAWP-NR-VNSGV	296	
Bs	226:WLFIDIPYEQIDVVLHKESEIHSMEVFHDKSVIAQLGTPDMRVPIQYALTYP-DRLPLPDA	285	
Hi	240:WLFNASAEEMEVIHPQSVIHSVMVRYVDGSVITQMGNPDMRTPIAETMAYP-HR-TFAGV	298	
Hp	210:WLFASLKDIALIER-SSIVHALVEFEDNSIIAHLASADMQLPISYAIID-PKLASLSASI	268	
My	255:LLFGIPYDRIDVVPQSVIHSMTTFIDGSTIAQASPPDMKLPISLALGWPR--RVSGAA	313	
Sy	230:YLFGLDYDHIDIVHPQSVIHSLEIVQDTSVLAQLGWPDMRLPLLYALSWP-ERI-YTDW	288	
	** *	* * *	
Ec	297:KPLDFCKLSALTFAAPDYDRYPCLKLAMEAFEQQAATTALNAANEITVAFLAQQIRFT	356	
Bs	286:KPLELWEIGSLHFKEAFDRFRCQLQFAFESGKIGTMTPTVLNAANEVAVAAFLAGKIPFL	345	
Hi	299:EPDLFFKIKELTFIEPDRNRYPNLKLDAFAAGQYATTAMNAANEIAVQAFLDRQIGFM	358	
Hp	269:KPLDLYALSIAKFEPISMERITYLWCY-KDLLLENPKLGVVLNASNEVAMEKFLNKEIAFG	327	
My	314:AACDFHTASSWEFELDTDPVFAVELARQAGVAGGCMATAVYNAANEAAAAFLAGRI---	371	
Sy	289:EPDLVKGAGSLFREPDDHKYPCMQLAYGAGRAGGAMPVNLNAANEQAVALFLQEKISFL	348	
	*	* * * *	
Ec	357:DIAALNLSVLE-KMDMREPQCVDVLSVDANAREVARKEVMRLAS---	398	
Bs	346:AIEDCIEKA--LTRHQLLKKPSWRTFKKWKIPGDTSIQYSHKVCS-	388	
Hi	359:DIANKSKTIE-RISPTYIQNIDVLEIDAQAREIA-KTLRE-----	397	
Hp	328:GL--IQTISQALESYDKMPFKLSLEEVLELDKEVRERFRKNVAGV---	368	
My	371:-----		371
Sy	349:DIPRLIEKTCDLYVGQNTASPDLETILAADQWARRTVLENSACVATRP		394

Fig. 4 A Multiple Alignment of the Amino Acid Sequences of *E. coli yaeM* Gene and Other *yaeM* Gene Homologs. Identical amino acids among six proteins are marked by asterisks. The putative NADPH binding motif is marked by +. Dashes indicate gaps introduced for the optimization of the alignment. Ec, *E. coli* (accession number, AB 013300); Bs, *Bacillus subtilis* (accession no., B 69881); Hi, *Haemophilus influenzae* (accession no., P 44055); Hp, *Helicobacter pylori*, (accession no., P 56139); *Mycobacterium tuberculosis* (accession no., Q 10798), Sy, *Synechocystis* sp. (PCC 6803) (accession no., Q 55663).

Fig. 5 DXP Reductoisomerase Reaction and the Structure of Its Specific Inhibitor, Fosmidomycin.

ソメラーゼ阻害剤は、非メバロン酸経路を利用する *E. coli* と *B. subtilis* には抗菌活性を示すが、非メバロン酸経路を持たずメバロン酸経路を利用する *Staphylococcus* には抗菌活性を示さない、と考えられたからである。一般に、多くの抗菌化合物は、グラム陽性菌には効くがグラム陰性菌には効きにくいことが知られている。従って、グラム陽性菌の *B. subtilis* には抗菌活性を示し、*Staphylococcus* には示さず、グラム陰性菌の *E. coli* には抗菌活性を示すという抗菌スペクトルを持つ化合物の数は限られていると考えた。検索の結果、fosmidomycin (ホスミドマイシン, FMM, Fig. 5)¹⁴ が DXP レダクトイソメラーゼ阻害剤の候補として得られた。FMM の MIC は、*E. coli* に対して $6.25 \mu\text{g/ml}$, *B. subtilis* に対して $3.13 \mu\text{g/ml}$ であるのに対し、*Staphylococcus aureus* に対しては $400 \mu\text{g/ml}$ 以上と報告されていた¹⁵。また、FMM は、細菌の細胞壁合成を阻害し、かつ *Micrococcus luteus* のカロテノイド生合成も阻害すると報告されていた¹⁶が、その標的分子は明らかにされていなかった。FMM は、ホスホン酸基とホルミル基を持っており、この2つの官能基は5つの結合によって結ばれている。この構造は、DXP から MEP へ変換される過程の仮想中間体 2-C-メチルエリスロース 4-リン酸の構造と極めて似ており (Fig. 5)、この構造上の類似から、FMM が DXP レダクトイソメラーゼの阻害剤であることが予想された。そこで、*E. coli* で大量発現させた組換え体 DXP レダクトイソメラーゼに対する FMM の効果を検討したところ、予想通り、FMM は DXP レダクトイソメラーゼの酵素活性を強く阻害した ($\text{IC}_{50} = 24 \text{ nM}$)¹⁷。また、*E. coli* の DXP レダクトイソメラーゼ遺伝子破壊株¹⁸は、FMM に対して非感受性であり、ME 存在下で野生株同様に生育した。これらの結果から FMM は DXP レダクトイソメラーゼの特異的阻害剤であることが判明した¹⁷。

我々の FMM に関する発見が契機となって、FMM がマラリア原虫 *Plasmodium* に有効であると報告され

た¹⁹。マラリア患者は全世界で2億7千万人いると言われており、特にアフリカでは深刻な問題である。FMM の抗マラリア活性に関して、世界保健機構 (WHO) も高い関心を寄せており、今後益々、非メバロン酸経路の阻害剤の探索研究は重要なものになると思われる。

5 非メバロン酸経路の分布

FMM が DXP レダクトイソメラーゼの特異的な阻害剤であることが判明したことにより、従来煩雑な実験を必要としていた細菌類における非メバロン酸経路の分布の解析が容易に行えるようになった。これまで、非メバロン酸経路が作動しているか否かを検定するためには、その細菌を高価な ^{13}C -グルコースを添加して培養し (通常 100 ml 以上)、菌体成分であるユビキノンやメナキノンなどのイソプレノイドを単離して、NMR で ^{13}C の取り込みパターンを解析する必要があった。従って、多くの菌株について非メバロン酸経路の分布を調べることは困難であった。しかしながら、FMM に対する感受性を検討することによって、その細菌が非メバロン酸経路を有しているか否かを容易に明らかにすることが可能となった。FMM がその菌株に対して抗菌活性を示せば、非メバロン酸経路を利用していることは明白だからである。ただし、FMM の菌体内への取り込みの問題があり、FMM が抗菌作用を示さないからといって、非メバロン酸経路が作動していないとは結論できない。例えば、FMM は非メバロン酸経路のみを有する多くの放線菌に対して抗菌活性を示さない。これはおそらく、FMM の細胞内への透過性の問題が原因であると考えられる。

FMM を利用して非メバロン酸経路の分布を調べたところ、*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *M. luteus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* などの代表的な病原菌が本経路を利用していることが判明した。さらに、DXP レダクトイソメラーゼの存在を調べることで、全塩基配列が解読された、*H. influenzae*, *H. pylori*, *M. tuberculosis*, *Vibrio cholerae* などにも非メバロン酸経路が存在していることが明らかとなった。一方、*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, 古細菌などはメバロン酸経路を利用している。また、放線菌の中には両経路を利用しているものも存在する。なお、現在までに判明している限りでは、両経路の分布と細菌の分類との間には相関関係は無いと考えられる。

一方、高等植物においては、葉緑体などの色素体内では非メバロン酸経路を、細胞質内ではメバロン酸経路を利用していることが判明している⁵が、その使い分けについては今後の研究課題である。

6 終わりに

現在、我々の最大の関心は当然、MEP以降IPPに至るまでの反応経路の解明である。MEPがIPPに変換されるためには、これら2つの化合物の構造から考えて、3個の水酸基の脱離とリン酸基の導入が必要であるが、予想される中間体の構造は数が限られており、その同定はそれほど困難であるとは思えない。しかしながら現在までに、MEP以降の非メバロン酸経路の中間体の報告はなく、酵素や遺伝子に関しても全く不明のままである。我々は、予想される中間体の遊離アルコール体の添加実験を試みたが、DXPレダクトイソメラーゼ破壊株はこれらの化合物を利用しなかった。このことは、MEP以降の中間体はリン酸化体であることを示唆していると考えている。一方、*E. coli*の粗抽出液中におけるMEPの変換活性は極めて弱く、関連酵素の精製は困難であると判断している。さらには、非メバロン酸経路の変異は致死であるため、MEP以降の変異株の取得は不可能である。これらの3点が、MEP以降の反応解明を極めて困難なものにしていると考えられる。

前述したように、非メバロン酸経路は、病原菌を含むほとんどの真正細菌や、高等植物の葉緑体が生体利用しているにも拘わらず、見逃されていた極めて重要な一次代謝経路である。その全容解明は、抗菌剤や除草剤の開発などの応用研究のみならず、基礎研究にも大きな影響を与えるであろう。

謝 辞

fosmidomycinをご提供いただきました藤沢薬品工業株式会社の奥原正國博士に感謝いたします。

(受付：1999年10月14日，受理：1999年10月18日)

文 献

- 1) J.C. Sacchettini, C.D. Poulter, *Science*, **277**, 1788 (1997).
- 2) J.L. Goldstein, M.S. Brown, *Nature*, **343**, 425 (1990).
- 3) M. Rohmer, M. Seemann, S. Horbach, S. Bringer-Meyer, H. Sahm, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 2564 (1996).
- 4) W. Eisenreich, M. Schwarz, A. Cartayrade, D. Arigoni, M.H. Zenk, A. Bacher, *Chem. & Biol.*, **5**, R221 (1998).
- 5) M. Rohmer, "Isoprenoids including carotenoids and steroids", *Comprehensive Natural Products Chemistry* Vol. 2, (1999) p. 45.
- 6) G.A. Sprenger, U. Schorken, T. Wiegert, S. Grolle, A.A. Graaf, S.V. Taylar, T.P. Begley, S. Bringer-Meyer, H. Sahm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12957 (1997).
- 7) L.M. Lois, N. Campo, S.R. Putra, K. Danielsen, M. Rohmer, A. Boronat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2105 (1998).
- 8) F.R. Blattner *et al.*, *Science*, **277**, 1453 (1997).
- 9) T. Duvold, P. Cali, J.M. Bravo, M. Rohmer, *Tetrahedron Lett.*, **38**, 6181 (1997).
- 10) T. Kuzuyama, S. Takahashi, H. Watanabe, H. Seto, *Tetrahedron Lett.*, **39**, 4509 (1998).
- 11) S. Takahashi, T. Kuzuyama, H. Watanabe, H. Seto, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 9879 (1998).
- 12) T. Satyanarayana, A. Radhakrishnan, *Biochim. Biophys. Acta.*, **110**, 380 (1965).
- 13) H.W. Mewes *et al.*, *Nature*, **387**, 7 (1997).
- 14) Y. Kuroda, M. Okuhara, T. Goto, M. Okamoto, H. Terano, M. Kohsaka, H. Aoki, H. Imanaka, *J. Antibiot.*, **33**, 29 (1980).
- 15) K. Hemmi, H. Takeno, M. Hashimoto, T. Kamiya, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 111 (1982).
- 16) Y. Shigi, *J. Antimicrob. Chemoth.*, **24**, 131 (1989).
- 17) T. Kuzuyama, T. Shimizu, S. Takahashi, H. Seto, *Tetrahedron Lett.*, **39**, 7913 (1998).
- 18) T. Kuzuyama, S. Takahashi, H. Seto, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 776 (1999).
- 19) H. Jomma, J. Wiesner, S. Sanderbrand, B. Altincicek, C. Weidemeyer, M. Hintz, I. Türbachova, M. Eberl, J. Zeidler, H.K. Lichtenthaler, D. Soldati, E. Beck, *Science*, **285**, 1573 (1999).

日本油化学会誌本号掲載 論文要旨

[総説] 見逃されていたイソプレノイド生合成経路： 非メバロン酸経路とその特異的阻害剤

葛山 智久・瀬戸 治男

東京大学分子細胞生物学研究所 (〒113-0032 東京都文京区弥生1-1-1)

近年、高等植物の色素体、緑藻、多くの真正細菌において、メバロン酸経路とは全く異なる新規経路、非メバロン酸経路の存在が明らかにされたがその詳細は不明であった。我々は、非メバロン酸経路における 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) から 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate への反応を触媒する酵素 DXP reductoisomerase を大腸菌からクローニングすることに成功し詳細に解析した。また、fosmidomycin がこの酵素を特異的に阻害することも明らかにした。

(連絡者：葛山智久) Vol.49, No.2, 119 (2000)

[報文] 寄生性線虫類の両性イオン型糖脂質 (第I報)： ブタカイチュウ (*Ascaris suum*) の N- アセチルグルコサミン -6- ホスホコリン含有スフィンゴ糖脂質群の化学構造

栗本 綾子^{*1,*2}・川上 泰^{*3}・J.T. Dulaney^{*4}・三宅 淳史^{*1}・杉田 陸海^{*1}^{*1} 滋賀大学教育学部化学教室 (〒520-0862 滋賀県大津市平津2-5-1)^{*2} 大阪市立大学工学部生物応用化学教室 (〒558-8585 大阪市住吉区杉本3-3-13)^{*3} 麻布大学環境保健学部医動物学研究室 (〒229-8501 神奈川県相模原市淵野辺1-17-71)^{*4} テネシー大学医学部腎臓学教室 (951 Court Avenue 649D, Memphis, TN38163, USA)

寄生性線虫類、ブタカイチュウ (*Ascaris suum*) には、N- アセチルグルコサミン -6- ホスホコリンを含有する新しい両性イオン型糖脂質の一群が存在する。それらは、TLC 分析によって、糖、リンおよびコリン検出試薬のいずれにも陽性を示し、少なくとも7種類の成分から成る。これらの7種類のうち、TLC 上での移動度の大きい4種類 (PGL₁ ~ PGL₄) を単離、精製し、それらの化学構造を、PGL₁ : cholinephosphoryl → 6GlcNAc β 1-3Man β 1-4Glc β 1-Cer, PGL₂ : GalNAc β 1-4 (cholinephosphoryl → 6) GlcNAc β 1-3Man β 1-4Glc β 1-Cer, PGL₃ : Gal α 1-3GalNAc β 1-4 (cholinephosphoryl → 6) GlcNAc β 1-3Man β 1-4Glc β 1-Cer および PGL₄ : Gal β 1-3Gal α 1-3GalNAc β 1-4 (cholinephosphoryl → 6) GlcNAc β 1-3Man β 1-4Glc β 1-Cer と Gal β 1-6Gal α 1-3GalNAc β 1-4 (cholinephosphoryl → 6) GlcNAc β 1-3Man β 1-4Glc β 1-Cer の混合物、と決定した。化学構造の決定は、糖、脂肪酸、スフィンゴイド組成分析、フッ化水素酸分解、鉍酸分解、メチル化分析、酵素的加水分解、TLC- 免疫染色および MALDI-TOF MS (マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置) 分析によって行った。これらの両性イオン型糖脂質のセラミド組成は、脂肪酸が2- ヒドロキシ-C22 : 0 酸および2- ヒドロキシ-C24 : 0 酸を、スフィンゴイド塩基がイソ-C17- スフィンゴシンおよびイソ-C17- スフィンガニンを主成分としていた。

(連絡者：杉田陸海) Vol.49, No.2, 127 (2000)