

令和元年6月13日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01913

研究課題名(和文) ゲノムマイニングに基づく新規ラッソペプチドの単離と構造決定

研究課題名(英文) Isolation and structure determination of new lasso peptides based on genome mining

研究代表者

小谷 真也 (Kodani, Shinya)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：20510621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ラッソペプチドとは環状ペプチドの一種であり、様々な薬理活性を示すものが知られている。本研究において、遺伝子情報を用いた新しいラッソペプチドの探索法(ゲノムマイニング)を行い、主に放線菌から、新しいラッソペプチドを、多数得ることに成功した。また、土壌細菌であるスフィンゴモナス細菌を宿主にした異宿主生産方法の開発にも取り組み、新規ラッソペプチドbrevunsinの生産にも成功した。得られたラッソペプチドに関してNMRおよびESI-MSを用いた構造決定を行い、NOE実験に基づいて三次元立体構造を決定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、分子量2000程度のペプチドは中分子として次世代医薬品のターゲットとして注目されている。本研究課題においては、バクテリアの生産する特殊な構造を有するラッソペプチドの生産および構造決定に成功した。また、その中で抗菌活性、抗HIV活性など有用な活性を有するものを複数発見することができた。また、スフィンゴモナス属細菌を宿主に用いた異宿主生産システムの開発にも成功しており、組み換えペプチドの生産にも期待が持てる。

研究成果の概要(英文)：The Lasso peptide is a kind of cyclic peptide, and it is known to exert various pharmacological activities. In this study, we screened for new lasso peptides using genetic information (genome mining) and succeeded in obtaining many new lasso peptides mainly from actinomycetes. We also worked on the development of a heterologous production method using a soil bacterium Sphingomonas as a host, and succeeded in producing the new lasso peptide named brevunsin. The obtained rasso peptide was subjected to structure determination using NMR and ESI-MS, and the three-dimensional three-dimensional structure was successfully determined based on the NOE experiments.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ペプチド 微生物生産 発酵

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ラッソペプチド(ラッソ=投げ輪)とは、その構造的特徴から命名された抗菌ペプチドのグループの名称である。現在までに数々のラッソペプチドがプロテオバクテリア、大腸菌および放線菌から単離・構造決定されている。構造の特徴は、20-30 残基のアミノ酸からなるペプチドにおいてN末端のアミノ基が、N末から9-10 残基目に存在するアスパラギン酸もしくはグルタミン酸の側鎖のカルボキシル基とペプチド結合を形成し、“輪”を形成する。さらにC末端の直鎖部分が輪の中を貫通するという特異な立体構造を有しており、その構造が“投げ輪”に似ているためラッソペプチドと呼ばれている。その生合成は非常にシンプルであり、大腸菌の代表的ラッソペプチド microcin J25 の場合、構造遺伝子 *mcjA*、修飾酵素 *mcjB* および *C*、トランスポーター *mcjD* とわずか4つの遺伝子で生産されることが明らかとなっており、ゲノム情報から生合成遺伝子の予測(ゲノムマイニング)が容易である。放線菌からは抗 HIV 活性を示すラッソペプチド siamycin (Tsunakawa *et al.* J. Antibiot. 1995) が研究用試薬として世界中で用いられており、放線菌由来のラッソペプチドは、医薬品のリードとして期待される。現時点で放線菌から得られたラッソペプチドは9例しか報告がないが、研究代表者はゲノムマイニングで50株の放線菌株に新規ラッソペプチド生合成遺伝子が存在することをすでに確認している。

## 2. 研究の目的

ラッソペプチドとは環状ペプチドの一種で、抗菌、抗ウイルス作用を示すなど多様な活性を有する医薬上重要な化合物群である。研究代表者のゲノムマイニングによる探索から、これまでゲノムが決定された970種以上の放線菌のうち、50株においてラッソペプチド生合成遺伝子の存在が見出された。このうち20株のラッソペプチド生産試験を行った結果、4株において新規ラッソペプチドの生産を見出した。本研究の目的は、予備実験で見出されたこれらの4株が生産する新しいラッソペプチドの立体化学も含めた構造決定である。さらにラッソペプチドの抗菌活性試験を行い、応用への可能性を評価する。また、残りの30株の生産試験も並行して行い、更なる新規ラッソペプチドの同定を行い、放線菌のラッソペプチドを網羅的に解析する。

## 3. 研究の方法

予備実験で比較的高いラッソペプチド生産量の見られた放線菌を用いて新規ラッソペプチドの構造決定を行う。第一に、NMR測定に必要な量を得るために、放線菌の大量培養を行う。予備試験ではISP2寒天培地で放線菌を生育したが、他の生産培地での生産性の比較を行い、ラッソペプチド生産量の最適化を行う。また、10L以上の培地を用いた大量培養後、固体培地をMeOHで抽出後、疎水性樹脂 CHP-20P を用いて溶媒分画を行う。ラッソペプチドの含有が見られた画分から最終的に、ODSカラムを用いたHPLC分取を行い、純粋なラッソペプチドを得る。計画通りに大量に分取が難しい場合は、C8やPFPなど他の保持体を有したHPLCカラム試し、最適な条件で分離を行い、NMR、ESI-MS分析に必要な量(10-20mg)を精製する。得られたラッソペプチドに関して、まず高分解能MSの測定を行い、分子式を決定する。同時にMALDI TOF-MS/MS測定によるペプチドのフラグメンテーション解析によってアミノ酸配列を決定する。さらに詳細な化学構造を決定するためラッソペプチドをDMSO-*d*<sub>6</sub>等の重溶媒に溶解し、<sup>1</sup>H、<sup>13</sup>C、HSQC、HMBC、NOESY、ROESY等のNMRスペクトルを測定し、化学構造を決定する。さらにラッソペプチドの加水分解物にマーフィー法を適用し、各構成アミノ酸の立体化学(LまたはD体であるか)を決定する。さらにNMR実験におけるNOE測定によるプロトン間距離情報、カップリングコンスタント等の情報を利用し、三次元構造の決定を行う。

## 4. 研究成果

### (1)放線菌由来ラッソペプチドの単離

希少放線菌である *Planomonospora sphaerica* が新規ラッソペプチドを生産することを見出した。ISP2 寒天培地を用いて菌の培養を行い、菌体を有機溶媒で抽出した。抽出物を各種クロマトグラフィーを用いて単離精製を行い、純粋な新規ラッソペプチド sphaericin を得た。さらに ESI-MS および NMR スペクトラムの測定を行い、構造を決定した。さらに、NMR 実験におけるカップリングコンスタントおよび NOESY の相関を基盤に三次元立体構造(図 1)を決定し、その構造が典型的なラッソ構造を取っていることを明らかにした (Kodani *et al.* *Eur J Org Chem*

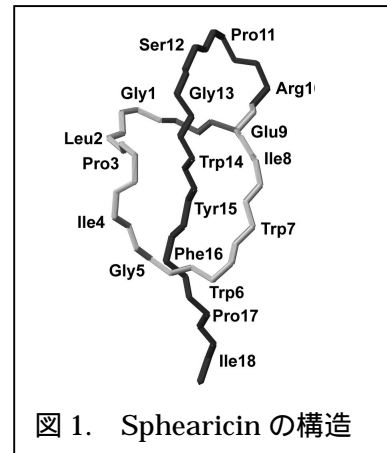


図 1. Sphaericin の構造

2017)。Sphaericin はグラム陽性細菌 *Micrococcus luteus* に対して抗菌活性を示した。さらに、ゲノムマイニングにおいて *Streptomyces specialis* のゲノム情報に既知ラッソペプチド siamycin に類似したラッソペプチドの生合成遺伝子クラスターを見出した。*Streptomyces specialis* JCM16611 株の分譲を受け、実際に培養を行ったところ、新規ラッソペプチド specialicin の単離に成功した。ESI-MS および NMR スペクトラムの測定を行い、構造を決定した。さらに、NMR 実験におけるカップリングコンスタントおよび NOESY の相関を基盤に三次元立体構造を決定した (Kaweewan, Kodani *et al.* *Bioorg Med Chem* 2019)。また、ラッソペプチド specialicin は抗 HIV 活性を示した。上記以外に、放線菌由来の 3 種類の新規ラッソペプチドの単離・構造決定に成功した (Sugai, Kodani *et al.* *Appl Biol Chem* 2017、Kaweewan, Kodani *et al.* *J Antibiot* 2017、Takasaka, Kodani *et al.* *Lett Appl Microbiol* 2017)。

## (2) 異発現生産によるラッソペプチドの生産

研究代表者はスフィンゴモナス属細菌 *Sphingomonas subterranea* が、新規ラッソペプチドを大量に生産することを見出した。そこで、菌の培養を行い、菌体を有機溶媒で抽出した。抽出物を各種クロマトグラフィーを用いて単離精製を行い、純粋な新規ラッソペプチド subterisin を得た。さらに ESI-MS および NMR スペクトラムの測定を行い、構造を決定した。さらに、NMR 実験におけるカップリングコンスタントおよび NOESY の相関を基盤に三次元立体構造を決定し、その構造が典型的なラッソ構造を取っていることを明らかにした (Kuroha, Kodani\* *et al.* *Tetrahedron Lett* 2017)。この発見を基盤にして、大腸菌-スフィンゴモナス属細菌間のシャトルベクターを構築し、新規ラッソペプチドの異宿主生産法を開発した (Kodani\* *et al.* *J Ind Microbiol Biotech* 2018)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 18 件)

1. H. Dohra, I. Kaweewan, B. E. Casareto, Y. Suzuki, S. Kodani\* (\*責任著者)  
Draft genome sequence of *Streptomyces spongiicola* strain 531S, an actinobacterium isolated from marine sediment  
*Microbiology Resource Announcements*, 8 (3), e01198-18, 2019, 査読有
2. I. Kaweewan, H. Komaki, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Hosaka, G. Isokawa, T. Oyoshi, S. Kodani\* (\*責任著者)  
Isolation and structure determination of a new cytotoxic peptide curacozole from *Streptomyces curacoi* based on genome-mining  
*Journal of Antibiotics*, 72 (1), 1-7, 2019, 査読有
3. 小谷真也  
ラッソペプチド: "投げ輪" 構造をもつペプチド抗生物質  
*バイオサイエンスとインダストリー (B & I)*, 76 (2), 130-131, 2018, 査読無

4. I. Kaweewan, H. Hemmi, H. Komaki, S. Harada, S. Kodani\* (\*責任著者)  
Isolation and structure determination of a new lasso peptide specialicin based on genome mining  
**Bioorganic Medicinal Chemistry**, 26 (23-24), 6050-6055, 2018, 査読有
5. S. Kodani\*, H. Hemmi, Y. Miyake, I. Kaweewan, H. Nakagawa (\*責任著者)  
Heterologous production of a new lasso peptide brevunsin in *Sphingomonas subterranea*  
**Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 45(11), 983-992, 2018, 査読有
6. S. Kodani\*, H. Komaki, H. Hemmi, Y. Miyake, I. Kaweewan, H. Dohra (\*責任著者)  
Streptoepetolin, a cyanopeptolin type peptide from *Streptomyces olivochromogenes*  
**ACS omega**, 3 (7), 8104-8110, 2018 査読有
7. I. Kaweewan, H. Komaki, H. Hemmi, S. Kodani\* (\*責任著者)  
Isolation and structure determination of a new thiopeptide globimycin from *Streptomyces globisporus* subspecies *globisporus* based on genome mining  
**Tetrahedron letters**, 59 (4), 409-414, 2018, 査読有
8. H. Dohra, Y. Miyake, S. Kodani\*  
Draft genome sequence of *Streptomyces olivochromogenes* NBRC 3561, bioactive peptide-producing actinobacterium  
**Genome Announcements**, 5, e01048-17, 2017 査読無
9. I. Kaweewan, H. Komaki, H. Hemmi, S. Kodani\* (\*責任著者)  
Isolation and structure determination of new antibacterial peptide curacomycin based on genome mining  
**Asian Journal of Organic Chemistry**, 6 (12), 1838-1844, 2017, 査読有
10. M. Kuroha, H. Hemmi, M. Ohnishi-Kameyama, S. Kodani\* (\*責任著者)  
Isolation and structure determination of new lasso peptide subterisin from *Sphingomonas subterranea*  
**Tetrahedron letters**, 58 (35), 3429-3432, 2017, 査読有
11. S. Sugai, M. Ohnishi-Kameyama, S. Kodani\* (\*責任著者)  
Isolation of new lasso peptide cattlecicin from *Streptomyces cattleya* based on genome mining  
**Applied Biological Chemistry**, 60 (2), 163-167, 2017, 査読有
12. T. Shiroyama, C. E. Beatriz, Y. Suzuki, S. Kodani\* (\*責任著者)  
Isolation of antagonistic bacteria associated with the stony coral *Montipora digitata* in Okinawa, Japan  
**Galaxea, Journal of Coral Reef Studies**, 19 (1), 7-13, 2017, 査読有
13. S. Kodani\*, Y. Inoue, M. Suzuki, H. Dohra, T. Suzuki, H. Hemmi, and M. Ohnishi-Kameyama (\*責任著者)  
Sphaericin, a new lasso peptide from a rare actinomycete *Planomonospora sphaerica*  
**European Journal of Organic Chemistry**, 2017 (8), 1177-1183, 2017, 査読有
14. N. Takasaka, I. Kaweewan, M. Ohnishi-Kameyama, S. Kodani\* (\*責任著者)  
Isolation of new lasso peptide actinokineosin from *Actinokineospora spheciospongiae*  
**Letters in Applied Microbiology**, 64 (2), 150-157, 2017, 査読有
15. I. Kaweewan, M. Ohnishi-Kameyama, S. Kodani\* (\*責任著者)  
Isolation of a new antibacterial peptide achromosin from *Streptomyces achromogenes* subsp. *achromogenes*  
**Journal of Antibiotics**, 70 (2), 208-211, 2017, 査読有
16. S. Sugai, H. Komaki, H. Hemmi, S. Kodani\* (\*責任著者)  
Isolation and structural determination of a new antibacterial compound demethyl-L-681,217 from *Streptomyces cattleya*  
**Journal of Antibiotics**, 69 (11), 839-842, 2016, 査読有
17. H. Dohra, T. Suzuki, Y. Inoue, S. Kodani\* (\*責任著者)  
Draft genome sequence of *Planomonospora sphaerica* JCM9374, an antibiotic-producing actinomycete.  
**Genome Announcements**, 4 (4), e00779-16, 2016, 査読無
18. S. Kodani\*, H. Komaki, S. Ishimura, H. Hemmi, M. Ohnishi-Kameyama (\*責任著者)  
Isolation and structure determination of a new lantibiotic cinnamycin B from

*Actinomadura atramentaria* based on genome mining

**Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 43 (8), 1159-65, 2016, 査読有  
〔学会発表〕(計 23 件)

1. 小谷真也, 不破啓貴, 逸見 光, 細胞接着活性配列を有するラッソペプチドの異宿主生産, 日本農芸化学会平成 31 年度大会 (2019 年 3 月)
2. 小谷真也, ゲノムマイニングを基盤としたバクテリアの生理活性ペプチドの生産 第 64 回日本放線菌学会学術講演会 (2019 年 3 月)
3. Shinya Kodani, Heterologous production of new lasso peptide using shuttle vector system, 4th International Conference on Circular Proteins and Peptides (2018 年 11 月)
4. Shinya Kodani, Lasso peptides: unique cyclic peptides biosynthesized by bacteria, 6th Biennial International Conference on New Developments in Drug Discovery from Natural Products and Traditional Medicines (DDNPTM-2018) (2018 年 11 月)
5. 鈴木麻那, 神田美波, 山村英樹, 早川正幸, 小谷真也, 海洋性放線菌 *Streptomyces spongicola* の生産するペプチドの化学分析, 2018 年度日本放線菌学会大会 (2018 年 9 月)
6. 西村のどか, Issara Kaweewan, 中川博之, 小谷真也, 放線菌 *Streptomyces lavenduligriseus* の新規ラッソペプチド lavenducin の単離, 2018 年度日本放線菌学会大会 (2018 年 9 月)
7. Issara Kaweewan, Hisayuki Komaki, Hikaru Hemmi, Shinya Kodani, Isolation and structure determination of new antibacterial peptide curacomycin based on genome mining, 2018 年度日本放線菌学会大会 (2018 年 9 月)
8. 不破啓貴, 小谷真也, 新規ラッソペプチド vesicusin A および B の異宿主生産, 第 70 回日本生物工学会大会 (2018 年 9 月)
9. 小谷真也, 小牧久幸, 逸見光, 三宅湧登, Issara Kaweewan, 道羅英夫, *Streptomyces olivochromogenes* から単離した cyanopeptolin タイプのペプチド streptopeptolin, 2018 年度日本放線菌学会大会 (2018 年 9 月)
10. Shinya Kodani, Hikaru Hemmi, Yuto Miyake, Issara Kaweewan, Hiroyuki Nakagawa, Heterologous production of a new lasso peptide brevunsin in *Sphingomonas subterranea* using shuttle vector system, 2018 annual meeting of Society for Industrial Microbiology and Biotechnology at Chicago (2018 年 8 月)
11. 小谷真也, バクテリア由来生理活性ペプチドの化学, 平成 30 年度静岡県バイオテクノロジー研究会特別講演会 (2018 年 6 月) 招待講演
12. 小谷真也, 細菌の生産するラッソペプチドに関する研究, BIO tech 2018 第 17 回 バイオ・ライフサイエンス研究展 (2018 年 6 月)
13. 小谷真也, 三宅 湧登, 中川 博之, 新規ラッソペプチド brevunsin の異宿主生産, 日本農芸化学会 2018 年度大会 (2018 年 3 月)
14. 森本 諒, 丸山 友子, 濱渦 亮子, 小谷真也, 保坂 毅, 放線菌の単コロニー化がその生育及び二次代謝に及ぼす影響の解析, 日本農芸化学会 2018 年度大会 (2018 年 3 月)
15. 田熊 桃子, 黒羽 真以, 小谷真也, coryneazolicin 生合成遺伝子クラスターの異宿主発現, 第 69 回日本生物工学会大会 (2017 年 9 月)
16. 三宅 湧登, 小谷真也, 大腸菌-*Sphingomonas* 属細菌の発現用シャトルベクターの構築, 第 69 回日本生物工学会大会 (2017 年 9 月)

17. 黒羽真衣,逸見光,亀山 眞由美,小谷真也, *Sphingomonas subterranea* からの新規ラッソペプチドの単離と構造決定, 第 69 回日本生物工学会大会 (2017 年 9 月)
18. 早瀬 真邑,田村 隆,逸見 光,小谷 真也, *Streptomyces incarnatus* の RpoB 遺伝子変異株の生産する二次代謝産物の化学分析, 2017 年度(第 32 回)日本放線菌学会 (2017 年 9 月)
19. Issara Kaweewan,Hisayuki Komaki,Hikaru Hemmi,Shinya Kodani, Isolation and structure determination of a new thiopeptide globimycin from *Streptomyces globisporus* based on genome mining, 2017 年度(第 32 回)日本放線菌学会 (2017 年 9 月)
20. 小谷 真也,井上雄斗,道羅英夫,鈴木智大,逸見光, 希少放線菌 *Planomonospora sphaerica* から単離した新規ラッソペプチド sphaericin の構造と生成, 第 31 回(2016 年度)日本放線菌学会大会 (2016 年 9 月)
21. 小谷 真也,黒羽真衣, 大腸菌を用いた *Corynebacterium urealyticum* の plantazolicin 類縁体生成遺伝子の異宿主発現, 第 31 回(2016 年度)日本放線菌学会大会 (2016 年 9 月)
22. 小谷 真也,菅井翔吾,逸見光,小牧久幸, *Streptomyces cattleya* からの新規抗菌物質 demethyl-L-681,217 の単離及び構造決定, 第 31 回(2016 年度)日本放線菌学会大会 (2016 年 9 月)
23. 小谷 真也,菅井翔吾,逸見光,小牧久幸, 新規抗菌物質 demethyl-L-681,217 の単離とその生成, 第 68 回日本生物工学会大会 (2016 年 9 月)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。