

令和元年6月25日現在

機関番号：23401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19243

研究課題名(和文) 二次代謝ペプチド化合物の新規創製を志向した放線菌のtRNAエンジニアリング

研究課題名(英文) tRNA engineering for new peptide natural products in Streptomyces

研究代表者

濱野 吉十 (HAMANO, Yoshimitsu)

福井県立大学・生物資源学部・教授

研究者番号：50372834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：最近我々は、生命活動に必須な基幹代謝であるタンパク質翻訳システムから aa-tRNAaa をハイジャックし、tRNA 依存的にアミド結合形成を触媒する Orf11 を見出した。本酵素は、Gly-tRNA を基質として利用し、抗生物質 glycyllthricin (GT) における Gly 側鎖のアミド合成を触媒するが、そのホモログ酵素である Sba18 は、Gly-tRNA^{Gly} の他に Ala-tRNA、Ser-tRNA も基質認識し、新規 ST 類縁化合物を生成することを見出した。そこで本研究では Sba18 の基質認識機構を詳細に解析し、新たに 14 種類の新規類縁化合物の創成に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗がん剤、抗生物質、抗ウイルス剤など現代に無くてはならない医薬品については、より多くの新薬開発が世界的に求められている。その新たな戦略として、様々な理由から未利用のままである天然由来生理活性物質について、生合成研究から見出した生合成酵素を活用し、化学構造の多様性を創出することが可能になれば、新たな医薬品リード化合物の創製につながると考えられる。抗生物質 streptothricin (ST) も未利用資源の一つであり、我々が見出した新規アミド合成酵素の活用は、ST の臨床利用への可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Transfer RNA (tRNA)-dependent amide bond forming enzymes are reported to be involved in the biosynthesis of peptide natural products from Streptomyces by hijacking aminoacyl-tRNAs from protein biosynthesis. Recently, we also identified two tRNA-dependent enzymes, Orf11 and Sba18, which are involved in the biosynthesis of glycyllthricin; they catalyze a condensation reaction between the biosynthetic intermediates, Gly-tRNA and aminosugar, via amide bond. Although Orf11 can accept only the Gly-tRNA as a substrate for the amide bond formation, Sba18 shows a promiscuous substrate specificity against aminoacyl-tRNAs, producing not only glycyllthricin but also two novel glycyllthricin-related compounds. Therefore, a better understanding of the substrate specificity of Sba18 would generate novel unnatural natural compounds by chemoenzymatic synthesis. Indeed, the unique substrate specificity of Sba18 gave us 14 new compounds related to glycyllthricin.

研究分野：応用微生物学

キーワード：tRNA ペプチド合成酵素

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

トランスファーRNA (tRNA) は、リボソームで行われるタンパク質翻訳システムにおいて、メッセンジャーRNA 上のコドンを読み取り、対応するアミノ酸を運ぶ一次代謝の重要な生体分子である。対応するアミノ酸と結合している tRNA は、アミノアシル-tRNA^{aa} (aa-tRNA^{aa}) と呼ばれる。近年、報告例は少ないが、一部の微生物が生命活動に必須な基幹代謝であるタンパク質翻訳システムから aa-tRNA^{aa} をハイジャックし、抗生物質などの二次代謝産物を生合成することが認められた。最近我々も *Streptomyces* 放線菌が tRNA 依存的なペプチド合成酵素 (Orf11) により抗生物質を生合成していることを見出している (*Appl. Environ. Microbiol.*, 82, 3640-3648, 2016)。本酵素 Orf11 は、Gly-tRNA^{Gly} を基質として利用し、抗生物質 glycyllthricin における Gly 側鎖のペプチド合成を触媒することを明らかにした (図 1)。タンパク質翻訳システムにおいては、Gly-tRNA^{Gly} を含め 20 種の aa-tRNA^{aa} が存在する。Orf11 ホモログ酵素の中に Gly 以外の aa-tRNA^{aa} を基質として認識する同様の酵素が存在すれば、『tRNA 依存型アミド合成酵素における tRNA 基質認識機構の解明』のみならず、『応用利用による新規アミノ酸側鎖を有する化合物の創製』が可能である。

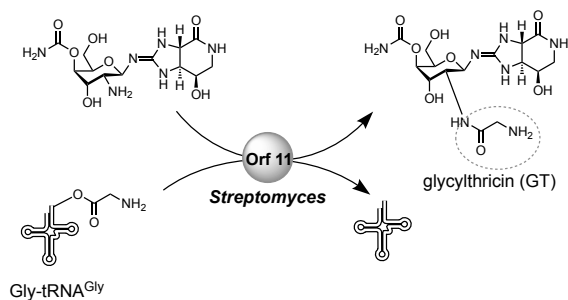


図 1 tRNA 依存性アミド合成酵素 Orf11

2. 研究の目的

streptothricin (ST) およびその類縁化合物 glycyllthricin (GT) (図 2) は、放線菌によって生産される抗生物質である。これら化合物は、原核生物に対して強力な抗菌活性を有する反面、ヒトなどの真核生物への毒性が強く医薬品として利用されていない。ST 類縁化合物の化学構造は共通して streptothrisamine 骨格 (図 2) を有し、アミノ酸側鎖として β -lysine (β -Lys) または β -Lys oligopeptide [oligo(β -Lys)]、あるいは Gly または Gly 誘導体が結合することで数多くの類縁化合物が存在する。streptothrisamine 骨格は、全く抗菌活性を示さないのに対し、ST 類縁化合物はアミノ酸側鎖構造を有することによって強力な抗菌活性を示すことを明らかにしている。したがって、ST 類縁化合物の生理活性には、アミノ酸側鎖構造が重要な役割を担っていると言える。また興味深いことに、これまでに天然より単離された ST 類縁化合物の側鎖構造は、 β -Lys 型または Gly 型の 2 種類しか見つかっておらず、これら以外のアミノ酸を側鎖に持つ化合物は見つかっていない。従って、側鎖構造の生合成メカニズムの解明は、その応用利用による新規 ST 類縁化合物の創製を可能にすると考えた。そこで本研究では特に、Gly 側鎖のアミド形成反応を触媒する Orf11 に着目し、そのホモログ酵素遺伝子の探索および機能解析、さらにホモログ酵素を応用利用した新規 GT 類縁化合物の創製を目的とした。

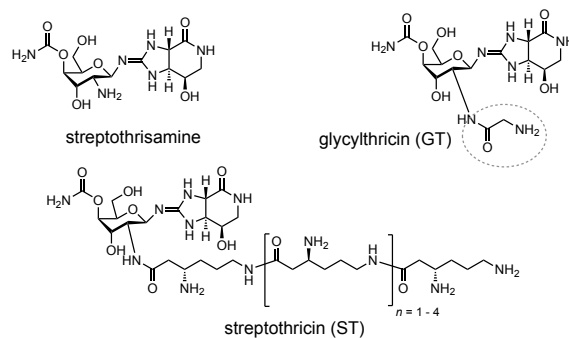


図 2 ST および ST 類縁化合物の化学構造

3. 研究の方法

(1) Orf11 ホモログ酵素遺伝子の探索

Orf11 と同様に、aa-tRNA^{aa} 依存的にアミド結合形成を触媒するホモログ酵素を探索するために、Orf11 遺伝子および streptothrisamine 生合成遺伝子群との相同性を指標に、放線菌ドラフトゲノムデータベースより探索した。

(2) Orf11 ホモログ酵素の基質特異性解析

放線菌ドラフトデータベースより、Orf11 に高い相同性を示す 4 つのホモログ酵素遺伝子を新たに見出した。そこでこれらの組換え酵素を用いた *in vitro* 反応を行い、基質特異性を調べた。基質となる aa-tRNA^{aa} の供給には、大腸菌由来の *in vitro* タンパク質合成システムを利用し、ST 類縁化合物の共通の生合成中間体 streptothrisamine と、20 種類のタンパク質性アミノ酸混合液を加えて反応を行った。

(3) streptothrisamine 生合成遺伝子群および *sba18* 遺伝子の共発現株の構築

Sba18 が有する幅広い基質認識機構を利用した物質生産系の確立を試みた。ST およびその類縁化合物を生産しない放線菌である *Streptomyces lividans* を宿主として用いて、streptothrisamine 生合成遺伝子群と *sba18* 遺伝子の共発現株を構築し、新規 ST 類縁化合物の *in vivo* 生合成を試みた。得られた共発現株を ST 生産培地にて培養し、その培養上清を LCMS にて分析した。

(4) aa-tRNA^{aa} 人工合成基質を用いた tRNA^{aa} 分子に対する Sba18 の基質認識機構の解析

Sba18 が触媒するアミド合成反応において、ドナー基質として、大腸菌由来では Gly-tRNA^{Gly}、Ala-tRNA^{Ala}、Ser-tRNA^{Ser} を、さらに放線菌由来では Gly-tRNA^{Gly} を基質認識することが判明した。そこで、Sba18 によって基質認識される aa-tRNA^{aa} の共通点を探索するために、Sba18 の基質となった全ての tRNA^{aa} の塩基配列に着目した。まず、大腸菌ゲノムには、tRNA^{Gly} 遺伝子が 3 種類、tRNA^{Ala} 遺伝子が 2 種類、tRNA^{Ser} 遺伝子が 4 種類存在し、また放線菌には tRNA^{Gly} 遺伝子が 4 種類存在する。したがって、Sba18 の基質候補として、13 種類の tRNA^{aa} 配列が考えられた。そこで、これら 13 種類すべての tRNA^{aa} 分子が Sba18 の基質となるのか、あるいはある共通構造を有する tRNA^{aa} 分子のみが基質となるのかを検証した。その方法として、13 種類の tRNA^{aa} 分子をすべて *in vitro* 転写反応により人工合成し、それぞれのアミノ酸に対応する aminoacyl-tRNA 合成酵素 (aa-RS)、または、人工 RNA 触媒 flexizyme を用いてアミノアシル化後、個々に Sba18 組換え酵素による *in vitro* 反応を行った。

(5) aa-tRNA^{aa} 人工合成基質を用いたアシル基に対する Sba18 の基質認識機構の解析

aa-tRNA^{aa} 分子のアミノアシル基に対する Sba18 の基質特異性を調べるために、flexizyme を用いて、tRNA^{aa} 分子を様々な化合物でアシル化し、Sba18 の基質として酵素反応を行なった。

4. 研究成果

(1) Orf11 ホモログ酵素遺伝子の探索

Orf11 のアミノ酸配列を基に、放線菌データベースから高い相同性を示す酵素遺伝子を検索し、さらにその周辺領域に、streptothrisamine 生合成遺伝子群を有するものを探索した。その結果、Orf11 に高い相同性を示す 4 つのホモログ酵素遺伝子を見出した。またこれらの酵素遺伝子の近傍には、streptothrisamine 生合成遺伝子群とよく似た遺伝子群を有しており、これら 4 つの遺伝子群は、GT に類似する化合物を生産することが予想された。すなわち、これら 4 つのホモログ酵素遺伝子産物は、いずれも、Orf11 と同様のアミド合成活性を有することが期待された。

(2) Orf11 ホモログ酵素遺伝子 Sba18 の基質特異性解析

結果(1)に示した 4 つのホモログ酵素遺伝子について、これらの組換え酵素を用いた *in vitro* 反応を行った。その結果、4 つのホモログ酵素遺伝子はいずれも、Orf11 と同様に、Gly-tRNA^{Gly} を基質として、GT を生成した。しかし興味深いことに、その 1 つである Sba18 は、Gly-tRNA^{Gly} だけでなく Ala-tRNA^{Ala} および Ser-tRNA^{Ser} を基質として新規化合物を生産した (未発表データ) (図 3)。したがって、Sba18 は、Orf11 と高い相同性 (75%) を示しながら、その基質特性は大きく異なり、Sba18 は aa-tRNA^{aa} における tRNA^{aa} 構造、アミノアシル基構造の両者に対して、広い基質特異性を有するアミド合成酵素であることが判明した。

(3) streptothrisamine 生合成遺伝子群および sba18 遺伝子の共発現株の構築

これまでの Sba18 組換え酵素を用いた *in vitro* 反応の結果から、本共発現株は GT と 2 つの新規化合物を生産すると予想し、共発現株の培養上清を LCMS にて分析したところ、予想に反し、GT のみを生産することが判明した。この結果から、Sba18 は、放線菌由来の aa-tRNA^{aa} に対しては、Gly-tRNA^{Gly} のみを基質認識する可能性が示唆された。実際に、*S. lividans* から aa-tRNA^{aa} を単離精製し、Sba18 の反応に用いたところ、GT のみが生成され、Ala や Ser を側鎖に有する化合物の生成は検出されなかった。すなわち、Sba18 は、aa-tRNA^{aa} に寛容な基質認識機構を有するアミド合成酵素であるが、基質として受容される aa-tRNA^{aa} には、ある共通構造の存在が示唆された。

(4) aa-tRNA^{aa} 人工合成基質を用いた tRNA^{aa} 分子に対する Sba18 の基質認識機構の解析

13 種類の aa-tRNA^{aa} 人工合成基質うち、11 種類の aa-tRNA^{aa} 分子が基質となり、目的化合物を生産した。これら 11 種類の tRNA^{aa} 分子について塩基配列を比較したところ、これらすべての tRNA^{aa} 分子の 3'-突出末端の配列が CCA であることが判明した。すなわち Sba18 は、tRNA^{aa} 分子の 3'-突出末端の配列が CCA であれば、基質認識される可能性が示唆された。

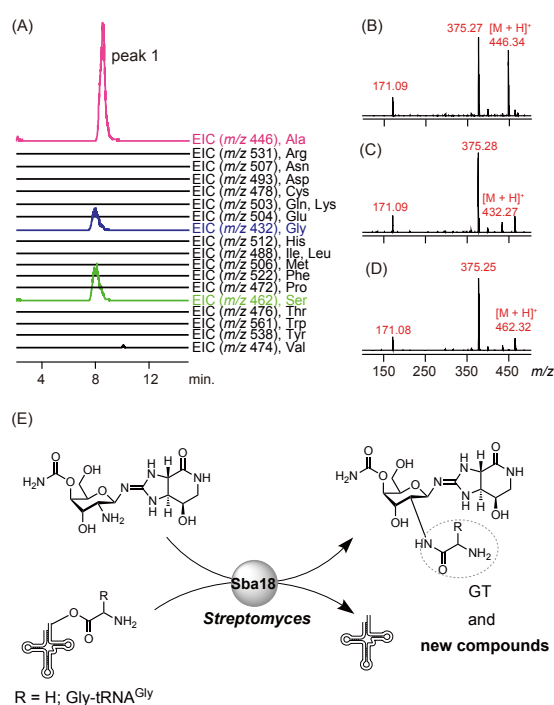


図 3 Sba18 の基質特異性解析

(A)タンパク性アミノ酸 20 種類を基質とした酵素反応液の LCMS 分析

(B, C, D)酵素反応生成物の MS スペクトル

(E)Sba18 による aa-tRNA^{aa} 依存性アミド合成反応

この可能性を証明するために、我々は、tRNA^{aa}分子の3'-突出末端の配列がCCAである大腸菌由来 tRNA^{Ala}分子、tRNA^{Ser}分子を Gly でアミノアシル化した非天然型 Gly-tRNA^{aa}分子、および天然型基質である Gly-tRNA^{Gly}分子を人工合成し、Sba18 の基質となるか検証することとした。まず、各 tRNA^{aa}分子を *in vitro* 転写反応にて合成した後 (図 4A)、人工 RNA 触媒である flexizyme を用いて Gly 化反応を行い、天然型および非天然型 Gly-tRNA^{aa}分子を調製した。これらを基質とした Sba18 の *in vitro* 反応を行った結果、いずれの基質を用いた場合でも、目的化合物である GT の生成を与えた (図 4B)。したがって、Sba18 の基質認識には、tRNA^{aa}分子構造のほとんどの部分は関与していないと考えられ、実際に、tRNA^{Gly}分子の acceptor stem 構造のみから構成される tRNA^{aa} mimic 基質、microhelix RNA を用いた場合においても、Sba18 の基質となったことから (図 4B)、Sba18 は、tRNA^{aa}分子の3'-突出末端構造、あるいは末端配列のみを認識していることが判明した。

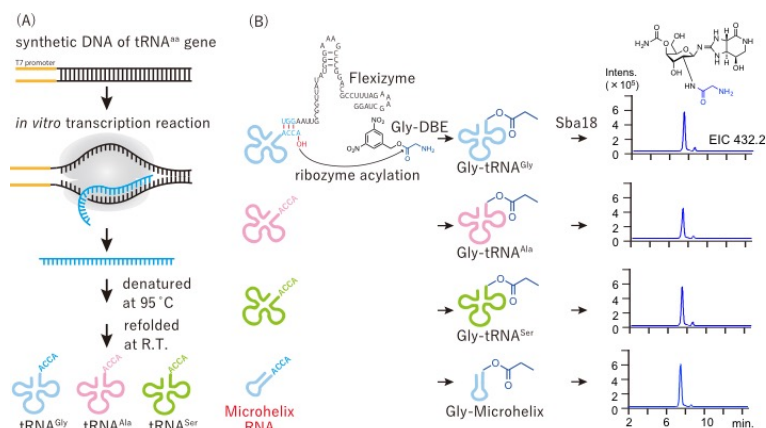


図 4 (A) *in vitro* 転写反応による tRNA^{aa} 人工合成法
(B) flexizyme による非天然型 Gly-tRNA^{aa} 人工合成、および Sba18 による *in vitro* 反応

(5) aa-tRNA^{aa}人工合成基質を用いたアシル基に対する Sba18 の基質認識機構の解析

次に、アミノアシル基に対する基質特異性を調べるために、上記の microhelix-RNA に flexizyme を用いて様々な化合物でアシル化し、Sba18 の基質を人工合成した。これまでに 24 種類の acyl-microhelixRNA を基質に酵素反応を行なった結果、14 種類が基質となり、新規類縁化合物の創成に成功した (図 5)。この結果から、Sba18 は、アシル基に対しても幅広く基質認識することが判明し、β-アミノ酸や側鎖構造の大きなアシル基は基質とならない傾向が観察された。したがって、Sba18 のアミド結合形成には、aa-tRNA^{aa}分子のアシル基構造が強く影響を与えることが明らかになった。

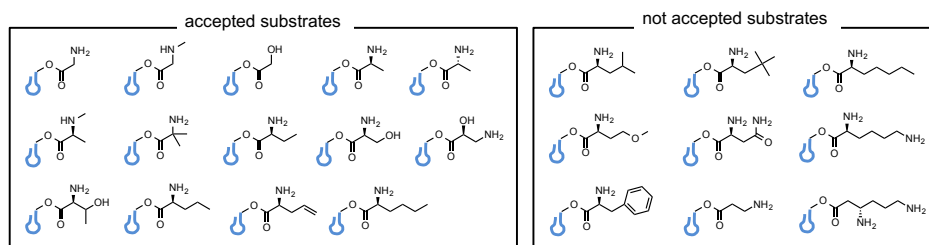


図 4 aa-tRNA^{aa}分子のアシル基構造に対する基質特異性

(6)総括

aa-tRNA^{aa}依存型アミド合成酵素である Sba18 は、由来する微生物種や tRNA^{aa}分子構造、アシル基のいずれに対しても幅広い基質特異性を有することが明らかになった。これまで、アミノ酸側鎖構造としてβ-Lys 型、Gly 型の 2 種類しか見つかっていない ST 類縁化合物群について、本研究で見出した Sba18 を利用して、β-Lys、Gly に次ぐ多種多様な新規類縁化合物を創成できた事実は、大きな研究成果であると言える。本研究によって新たに 14 種類の新規 ST 類縁化合物の創出に成功した。より多くの類縁化合物の酵素合成を可能にするためには、Sba18 の X 線結晶構造解析による基質結合部位の同定が必要不可欠であり、現在、Sba18 の結晶化を進めている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① H. Niikura, C. Maruyama, Y. Ogasawara, K. Shin-ya, T. Dairi, and Y. Hamano, Functional analysis of methyltransferases participating in streptothricin-related antibiotic biosynthesis, *J. Biosci. Bioeng.*, 125(2), 148-154 (2018)

[学会発表] (計 9 件)

- ① Substrate specificity of tRNA-dependent amide bond-forming enzyme: Yoshimitsu Hamano, 2nd China-Japan Joint Symposium on Natural Product Biosynthesis, Guangzhou (China), January 14 – 15,

2019.

- ② B-12 類縁化合物における *O*-acylpeptide 構造の生合成研究：永嶋世蓮, 新倉春香, 丸山千登勢, 橋本絢子, 新家一男, 濱野吉士, 第 11 回北陸合同バイオシンポジウム, 2018 年 10 月, 加賀市
- ③ Substrate specificity of tRNA-dependent amide bond-forming enzyme: Yoshimitsu Hamano, 1st Japan-German Symposium Biosynthesis and Function of Natural Products, Bonn (German), September 6 – 7, 2018.
- ④ Substrate specificity of tRNA-dependent amide bond-forming enzyme: Yoshimitsu Hamano, 9th International Congress on Biocatalysis, Hamburg (Germany), August 26 – 30, 2018.
- ⑤ 微生物から見出した tRNA 依存型ペプチド合成酵素：松田貫暉, 丸山千登勢, 後藤佑樹, 橋本絢子, 新家一男, 菅 裕明, 濱野吉士, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年 3 月, 名古屋市
- ⑥ 抗生物質 SF-2111B における *O*-acylpeptide 生合成遺伝子の機能解析：新倉春香, 丸山千登勢, 坂上莉奈, 橋本絢子, 新家一男, 濱野吉士, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年 3 月, 名古屋市
- ⑦ Amide-bond forming enzymes in the biosynthesis of streptothricin group antibiotics: Yoshimitsu Hamano, 1st Japan-China Seminar on the Biosynthesis of Natural Products, Shanghai (China), October 2 – 3, 2017.
- ⑧ Amide-bond forming enzymes in the biosynthesis of streptothricin group antibiotics: Yoshimitsu Hamano, Society of Industrial Microbiology and Biotechnology (SIMB) 2017 meeting, Denver (CO, USA), July 30 - August 3, 2017.
- ⑨ Functional analysis of an aminoacyl-tRNA-dependent peptide synthase involved in the biosynthesis of a streptothricin-related compound: Kanki Matsuda, Chitose Maruyama, Junko Hashimoto, Kazuo Shin-ya, Yoshimitsu Hamano, Society of Industrial Microbiology and Biotechnology (SIMB) 2017 meeting, Denver (CO, USA), July 30 - August 3, 2017.

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：丸山 千登勢

ローマ字氏名：MARUYAMA, Chitose

研究協力者氏名：新倉春香

ローマ字氏名：NIIKURA, Haruka

研究協力者氏名：松田貫暉

ローマ字氏名：MATSUDA, Kanki

※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。