

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05848

研究課題名(和文) バクテリアのゲノム情報に基づくラッソペプチドの異宿主生産

研究課題名(英文) Heterologous production of Lasso peptides based on bacterial genomic information

研究代表者

小谷 真也 (Kodani, Shinya)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：20510621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：中分子ペプチドは抗体と低分子の特徴を併せ持つ特性が注目され、医薬への応用が期待される。ラッソペプチドは環状ペプチドであり、プロテアーゼ耐性および生理活性を有することで創薬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、複数のペプチドの異宿主生産に成功した。スフィンゴモナスを宿主とする異宿主生産システムを確立した。さらにそのシステムを用いて新規ペプチドkoreansinの異宿主生産に成功した。NMRおよびMSスペクトルを用いて化学構造を明らかにして、NOE実験を行い、三次元立体構造を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中分子ペプチドは抗体と低分子の特徴を併せ持つ特性が注目され、医薬への応用が期待されている。特に発酵生産でこの中分子ペプチドを生産することはこれまで難しかった。本研究において、代謝されにくい環状ペプチドの発酵生産法が確立できた。さらに遺伝子組み換えで、配列の異なるペプチドを生合成することも明らかとなった。NMRを用いた化学分析の結果、得られたペプチドは構造的にも非常に安定な三次元構造を有していることを確認することが出来た。今後、本研究で得られた成果は、ペプチド医薬の創出研究に汎用的に用いることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Middle-molecular-weight peptides are attracting attention for their properties that combine the characteristics of antibodies and low-molecular-weight peptides, and are expected to be applied to medicine. Lasso peptides are cyclic peptides that are attracting attention as targets for drug discovery due to the protease resistance and bioactivity. In this research project, we succeeded in producing several peptides by heterologous production. We established a heterologous production system using *Sphingomonas* as a host. Furthermore, we have successfully produced a novel peptide koreansin in a different host using the system. The chemical structure was elucidated using NMR and MS spectra, and NOE experiments were performed to clarify the three-dimensional structure.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ペプチド 異宿主生産 NMR

1. 研究開始当初の背景

細菌由来ラッソペプチドは、環状中分子(アミノ酸残基 20 程度)で、代謝されにくい性質(プロテアーゼ耐性)を有し、創薬の標的として研究が行われている。しかし、その生産機構について、まだ多くが未解明であり、実際の応用への展開に関しても検討することが多い。ラッソペプチドが、プロテアーゼ耐性を与えるループ構造を含むコンパクトな三次元立体構造を有しているこれらの成果を基盤に、ラッソペプチドの新たな異宿主生産システムを開発した。本研究はこのシステムを利用し、新しい環状ペプチドを生み出そうとするものである。

2. 研究の目的

中分子ペプチドは抗体と低分子の特徴を併せ持つ特性が注目され、医薬への応用が期待される。“ラッソペプチド”とは細菌の生産するある種の中分子ペプチドの総称である。ラッソペプチドはループ構造を有し、プロテアーゼ耐性および生理活性を有することで創薬のターゲットとして注目されている。バクテリアゲノムにラッソペプチド生合成遺伝子は分布しているが、二次代謝産物であり通常の培養で生産されることは稀である。本研究は、ゲノム情報に保存されているラッソペプチドの遺伝子クラスターを用いて、新規ラッソペプチドの生産を行い、その生理活性を明らかにすることを目的とし、本研究によって新たな医薬のシーズとなる新規環状ペプチドを創出する。

3. 研究の方法

微生物 (*Sphingomonas subterrenea* NBRC16086^T および *Sphingomonas koreensis* NBRC16723^T を含む細菌株) は、NBRC カルチャー コレクション (NITE Biological Resource Center) から入手した。PCR 増幅の鋳型として、*S. koreensis* の細胞からゲノム DNA を抽出した。テンプレートゲノム DNA と 16723L-F および 16723L-R のプライマーペア、EmeraldAmp PCR マスター ミックスを使用してサーマルサイクラーにより、遺伝子断片の増幅を行った。Koreensin 生合成遺伝子クラスターを含むインサート DNA 断片とシャトルベクター-pHSG396Sp を、制限酵素 XbaI および KpnI で消化後、T4 DNA ligation mix を使用して DNA 産物を連結し、シャトルベクター-pHSG396Sp-16723L を得た。シャトルベクター-pHSG396Sp-16723L をエレクトロポレーションによって *S. subterrenea* に形質転換した。発現シャトルベクターを有する *S. subterrenea* を培養し、菌体を得た。菌体をメタノールにより抽出を行い、HPLC の分離により新規ラッソペプチド koreensin を得た。得られた koreensin は溶媒として重 DMSO を用い、各種二次元 NMR 測定により化学構造を決定した。ESI-MS を用いて精密質量の測定を行った。

4. 研究成果

(1) koreensin の異宿主生産

ゲノムマイニングの過程で、スフィンゴモナス科に属する細菌のゲノムデータから、ラッソペプチド前駆体ペプチドコード遺伝子 (benA1) のアミノ酸配列を用いた BLASTP 検索により、ラッソペプチド前駆体コード遺伝子が発見された。アラインメントにより、リーダー ペプチド配列のコンセンサス モチーフ Leu-Ile/Val-Asp-Leu-Gly が明らかになった (図 1)。しかしながら、コアペプチドのコアペプチドアミノ酸配列は、1 番目の Gly および 8 番目の Asp/Glu を除いて保存されたモチーフを有していなかった。前駆体をコードする遺伝子は、共通のモチーフ、リーダー ペプチドの最後の 2 つのアミノ酸として -Thr-X- を持っていた。コア配列は

Gly で始まり、コアペプチドの 1 番目の Gly から数えて 8 番目に Asp/Glu があつた (図 1)。通常、Lasso ペプチドは、1 番目の Gly と 7 ~ 9 番目の Asp または Glu の間でマクロラクタムを形成する。したがって、マクロラクタムは、ペプチドの 1 番目の Gly と 8 番目の Asp/Glu の間に形成されると予想された (図 2)。前駆体の中で、前駆体ペプチド (korA、コーディング遺伝子アクセッション番号: WP_107525062.1) は、リングおよびテール配列に天然の細胞接着モチーフ KGD および DGR を持っていた (図 1 の灰色の背景の文字)。korA のアミノ酸配列には 2 つのモチーフ (KGD と DGR) が含まれているため、*S. koreensis* の成熟型ラッソペプチドには細胞接着阻害活性があると考えられた。したがって、korA を含む遺伝子クラスターを使用して異種生産を行った。

<i>benA1</i> [<i>Asticcacaulis benevestitus</i>]	MEK--IETHED LIDLGAASSETKGVGFGRPDSILTQEQAKPMLDRD
WP_107525062.1 [<i>Sphingomonas koreensis</i>]	MERN-HETPSD LIDLGAASVETKGFKGDFFDVGDRILAGLTDE
WP_116091775.1 [<i>Sphingomonas crusticola</i>]	MER----INEE LIDLGAASVETKGFPGGKPGDVQLGRFELGLVED
WP_150127136.1 [<i>Sphingomonas panacis</i>]	MQRNDRLEGGD LIDLGDARVETKGNDDGNDIDMAHQRLQGGLSDD
WP_144033815.1 [<i>Sphingomonas laterariae</i>]	MER--IHEHDE LIDLGTASVETRGFPWGPRFDPGAGEVLIPIGISDD
WP_128830833.1 [<i>Sphingobium barthaii</i>]	MQRE-METESD LIDLGPVTVETKGIAGLSRDQDQSPKGGAGILDD
WP_153002958.1 [<i>Sphingomonas sanguinis</i>]	MERNNDKVP-T LVDLGEARSLTQGFAGTPIDEVQGFLLAAGLSDD
KEQ53303.1 [<i>Sphingobium chlorophenicum</i>]	MERNDRHD-D LIDLGAASSETKGRPGLQLEFGVIAQPIGIEAE

図 1. ラッソペプチド前駆体ペプチドコード遺伝子のアミノ酸配列のアラインメント

また、図 2 に示すように、lasso ペプチド生成遺伝子クラスターは、GntR ファミリーの転写調節因子 (WP_066573229.1)、前駆体ペプチド (korA: WP_107525062.1)、修飾酵素 (korB: WP_157926355.1、korC: WP_066573225)、イソペプチダーゼ (WP_157926354.1)、TonB 依存性受容体 (WP_075152903.1)、FecR 様タンパク質 (WP_066573215.1)、および FecI 様タンパク質 (WP_082737884.1) をコードする 8 つの遺伝子で構成されていた。遺伝子クラスターの構成は、既知のラッソペプチド astexin の構成と同じであった。遺伝子 korB には、リーダーペプチドを切断できるペプチダーゼドメインが含まれており、korC は環状化酵素をコードしてイソペプチド結合を形成することが予想された。図 2 に示すように、新しいラッソペプチド korensin は、酵素 KorB および KorC による修飾により、前駆体 KorA から生成されると予想された。

予想されるペプチドの異種生産を実行するために、合成遺伝子 (korA、korB、および korC、図 2) の最小セットをクローニングした。発現用シャトルベクター-pHSG396Sp は、プロテオバクテリア *Sphingomonas subterranea* 用で形質転換できるよう以前に確立しており、それを本研究でも用いた。遺伝子 korA、korB、および korC を含む DNA フラグメントを PCR で増幅し、発現シャトルベクター-pHSG396Sp に組み込んで、pHSG396Sp-16723L を得た。プラスミドは大腸菌を用いてクローニングした、エレクトロポレーションによって宿主細菌株 *S. subterranea* に形質転換した。培養後、菌体の MeOH 抽出物を HPLC および ESI-MS で分析した。その結果、形質転換体は期待されたペプチドを産生することが示された。構造決定および生物学的試験に十分な量を得るために、形質転換体を 1 L の改変基本培地を使用して培養した。オープンカラムクロマトグラフィーの後、60% MeOH 画分を繰り返し HPLC 精製にかけ、1 L の培養液から 2.8 mg のペプチドを得た。

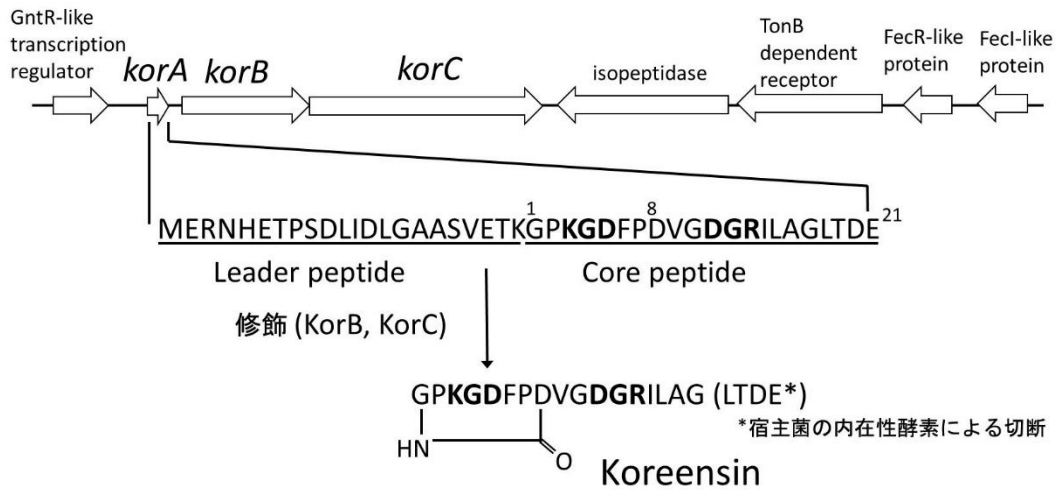


図 2 . Korensin の生合成経路

(2)korensin の構造決定

Korensin の分子式は精密質量分析によって $C_{73}H_{113}N_{21}O_{23}$ と決定した。平面化学構造を決定するために、 1H 、 ^{13}C 、DEPT135、DQF-COSY、TOCSY、NOESY、HMBC、および HSQC 実験を含む NMR 分光法を実行した。ペプチドの 17 アミノ酸すべては、2D NMR スペクトル データからのスピンスystem同定を使用して割り当てた。NOESY および HMBC データによって、3 つの線形ペプチド配列 (Gly1-Pro2-Lys3-Gly4、Asp5-Phe6-Pro7-Asp8-Val9-Gly10-Asp11-Gly12-Arg13-Ile14、および Leu15-Ala16-Gly17) が確立された (図 3)。Gly1 の N 末端は、Gly1 のアミドプロトンから Asp8 の α -カルボニル炭素への HMBC クロスピークと、Gly1 のアミドプロトンおよび Asp8 の β プロトン間の NOESY 相関に基づいて、Asp8 の側鎖に結合してイソペプチド結合を形成することが示された。以上により、全構成アミノ酸の帰属が達成された。興味深いことに、4 つのアミノ酸 (LTDE) を持つ C 末端ペプチドは、おそらく *S. subterranea* の内因性プロテアーゼによって、異種生産中に切断を受けたと考えられる (図 2)。

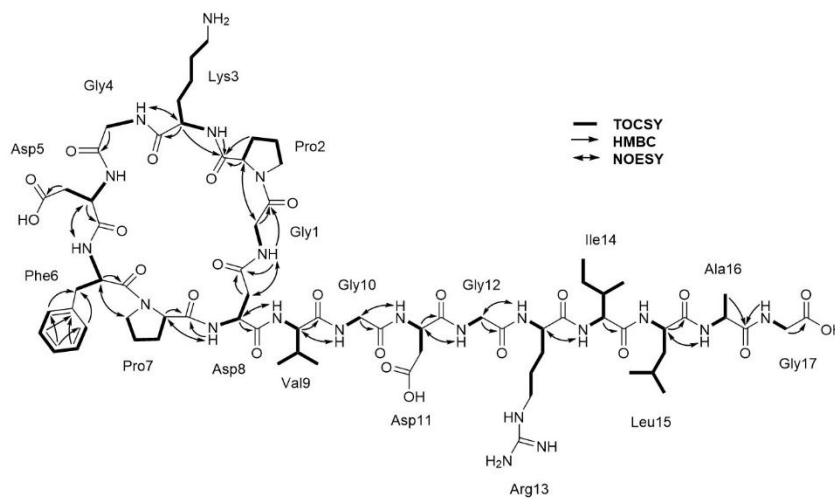


図 3 . Korensin の NMR 実験による構造決定

(3)koreensin の三次元立体構造の決定

Koreensin の構成アミノ酸の絶対立体化学は、マーフィー法によって分析された。すべての構成アミノ酸は、L 型であると決定された。NOE 相関と NMR 実験で得られた結合定数に基づいて、三次元立体構造の解析を行った。図 4 に示すように、三次元立体構造が得られた。Gly1 から Asp8 までのアミノ酸配列はマクロラクタムを形成した (図 4 の黄色)。Val9 から Asp11 までのアミノ酸がループ構造を形成し、Gly12 から Gly17 までの C 末端配列のアミノ酸がテールを形成した。三次元立体構造は、典型的な「なげなわ」構造であることが示された (原子座標データ:Protein Data Bank、PDB ID: 7BW5 登録済)。かさばるアミノ酸 Arg13 は、尾部がマクロラクタムから外れるのを防ぐ立体的なロックのようであった。細胞接着モチーフ KGD は外部に露出したマクロラクタムにあり、他の細胞接着モチーフ (DGR) はマクロラクタムの内部に位置していた。

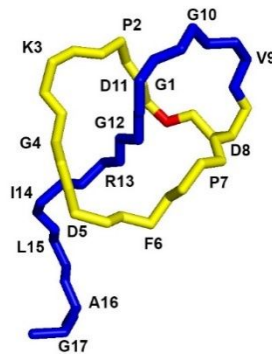


図 4 . Koreensin の三次元立体構造

(4)koreensin のバリエーションペプチドの生産及び細胞接着阻害活性試験

KGD 配列の代わりに RGD 配列を有するバリエーションペプチドを得るために、部位特異的突然変異導入実験をクリーンシン発現ベクターで行った。その結果、変異ベクター-pHSG396Sp-16723L-RGD を得た。Lys3 の代わりに Arg3 を有する koreensin バリエーション (koreensin-RGD) の単離を行った。Koreensin-RGD の構造は、ESI-MS および NMR によって決定された。Koreensin および koreensin-RGD が細胞接着に対する阻害活性を有するかどうかを調べるために、それぞれのペプチドの存在下でヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた細胞接着アッセイを実施した。それぞれのペプチドは KGD または RGD の細胞接着モチーフを持っていたため、この結果は予想外であった。Koreensin の 3D 構造をさらに調べると、Lys3 のアミノ残基と Asp11 のカルボキシル残基の間に塩橋が形成されている可能性が示された。Lys3 の側鎖のアミノ残基の窒素と Asp11 のカルボキシル残基の酸素との間の距離は、最低エネルギー構造で約 4.4 オングストロームと計算された。塩橋は通常 4 オングストローム以内であるため、これは塩橋としては少し長い。ペプチドは溶液中で構造的に柔軟である可能性があるため、塩橋形成の可能性を排除することはできない。一方、Arg13 のグアニジン基の窒素と Asp5 のカルボキシル残基の酸素との間の距離は 7 オングストローム以上と計算され、塩橋を形成するには遠すぎると思われる。Lys3 と Asp11 の間の塩橋の形成は、細胞接着阻害活性を示さなかった理由の 1 つとして考えられる。Koreensin-RGD の立体構造は得られなかったが、同様の立体構造を持っている可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Thetsana Chanaphat, Ijichi Shinta, Kaweewan Issara, Nakagawa Hiroyuki, Kodani Shinya	4. 巻 132
2. 論文標題 Heterologous expression of a cryptic gene cluster from a marine proteobacterium <i>Thalassomonas actiniarum</i> affords new lanthipeptides thalassomonasins A and B	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 3629 ~ 3639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jam.15491	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fuwa Hiroki, Hemmi Hikaru, Kaweewan Issara, Kozaki Ikko, Honda Hiroyuki, Kodani Shinya	4. 巻 74
2. 論文標題 Heterologous production of new lasso peptide koreensin based on genome mining	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 42 ~ 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-020-00363-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kodani Shinya, Unno Kohta	4. 巻 47
2. 論文標題 How to harness biosynthetic gene clusters of lasso peptides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 703 ~ 714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10295-020-02292-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Mana, Komaki Hisayuki, Kaweewan Issara, Dohra Hideo, Hemmi Hikaru, Nakagawa Hiroyuki, Yamamura Hideki, Hayakawa Masayuki, Kodani Shinya	4. 巻 105
2. 論文標題 Isolation and structure determination of new linear azole-containing peptides spongiicolazolicins A and B from Streptomyces sp. CWH03	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 93 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-020-11016-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Unno Kohta, Kaweewan Issara, Nakagawa Hiroyuki, Kodani Shinya	4. 巻 104
2. 論文標題 Heterologous expression of a cryptic gene cluster from <i>Grimontia marina</i> affords a novel tricyclic peptide grimoviridin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 5293 ~ 5302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-020-10605-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Unno Kohta, Nakagawa Hiroyuki, Kodani Shinya	4. 巻 85
2. 論文標題 Heterologous production of new protease inhibitory peptide marinostatin E	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 97 ~ 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbaa011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Shinya Kodani
2. 発表標題 Heterologous production of a novel bicyclic peptide prunipeptin using a cryptic biosynthetic gene cluster from <i>Streptomyces prunicolor</i>
3. 学会等名 Pacifichem2021 symposium (RiPP Natural Products: Biosynthesis, Function, and Engineering) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 海野航太、Issara Kaweewan、中川博之、小谷真也
2. 発表標題 新規三環性ペプチドgrimoviridinの異宿主生産
3. 学会等名 62回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒川 美彩、道羅 英夫、小谷 真也
2. 発表標題 放線菌Streptomyces sp. 519Sから得られたlanthidinクラスに属する新規ペプチドの単離と構造決定
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒川 紗緒里、小谷 真也
2. 発表標題 Bacillus amyloliquefaciensのランチペプチド生合成遺伝子の発現実験
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

静岡大学農学部応用微生物学（小谷）研究室ホームページ https://wvp.shizuoka.ac.jp/kodani/ 静岡大学小谷研究室ホームページ https://wvp.shizuoka.ac.jp/kodani/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中川 博之 (Nakagawa Hiroyuki) (30308192)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・高度分析研究センター・上級研究員 (82111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------