

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380050

研究課題名(和文)ランチビオティック工学の展開：構造生物学的情報に基づく微生物酵素の改変

研究課題名(英文)Lantibiotic engineering: peptide engineering approach using the modification enzymes

研究代表者

園元 謙二 (Sonomoto, Kenji)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：10154717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：NukMはランチビオティック「ヌカシンISK-1」の前駆体ペプチドNukAの特定の部位のセリン、トレオニン残基を脱水・環化し、異常アミノ酸を導入する。NukMのN末端側のみを発現・精製しNukAと反応させたところ、NukM-N末領域が脱水を触媒していることを明らかとした。NukTはペプチダーゼドメインとATP結合ドメインを持つ。解析の結果、NukTの活性はATP依存的であることと、NukTの二つのドメインが協調的に作用してターゲット領域の切断と菌体外輸送を行うことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Nukacin ISK-1 is a lantibiotic produced by *Staphylococcus warneri* ISK-1. Ribosomally synthesized precursor peptide, NukA undergoes introduction of unusual amino acids by a single modification enzyme, NukM, and the leader sequence is removed and the mature peptide is secreted by ABC transporter NukT. NukM was divided into two domains, NukMN and NukMC, based on a prediction that each domain is responsible for dehydration (phosphorylation and further phosphate elimination) and cyclization, respectively. The *in vitro* reconstitution of NukM, NukMN, and NukMC revealed that NukM can fully modify NukA, and NukMN could partially phosphorylate and dehydrate it. A series of NukT mutants were constructed and their transport activity *in vivo* and peptidase activity *in vitro* were investigated. It was suggested that peptidase activity of NukT depends on ATP hydrolysis, and the N-terminal peptidase domain of NukT may cooperatively function with the C-terminal ATP-binding domain.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：ランチビオティック 異常アミノ酸 nukacin ISK-1 ペプチドデザイン 翻訳後修飾 脱水・環化 基質認識ドメイン リーダーペプチド

1. 研究開始当初の背景

「ランチビオティック」は微生物が生産するペプチド性の抗菌物質である。リボソーム上で前駆体ペプチドが合成されたのち、翻訳後修飾を経て異常アミノ酸が導入される(図1)。ランチビオティックの特徴は高い構造安定性、高い抗菌活性、耐性菌が出現しにくいことであり、これらはすべて**異常アミノ酸の存在に依存している**。

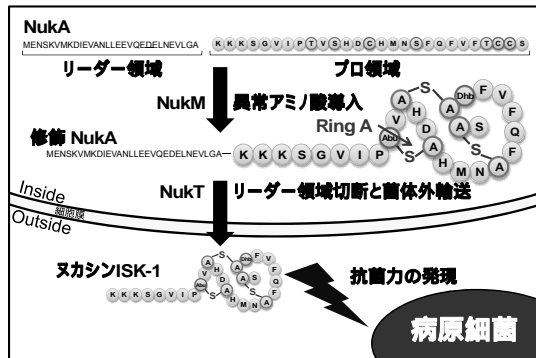


図1 ヌカシン ISK-1 の生産と抗菌作用

本研究では微生物のランチビオティック生産機構を利用して任意のペプチドに異常アミノ酸を導入し、安定性や新たな生理活性を付与する「ランチビオティック工学」(図2)を提唱している。この技術により**新規生理活性ペプチド**の創製や**ポスト抗生物質**となり得る**強化型ランチビオティック**創製、さらにはこれらの新規ペプチドの微生物による大量生産を目指している。



図2 ランチビオティック工学の全体像

2. 研究の目的

ランチビオティック「ヌカシン ISK-1」の生産はリボソーム上で前駆体 NukA が合成されることにより始まる。NukA は N 末端側のリーダー領域と C 末端側のプロ領域から構成される。NukM は NukA プロ領域中の Ser・Thr 残基をリン酸化、脱リン酸化反応を経た脱水反応、および分子内 Cys 残基との環化反応を触媒する。修飾後の NukA は NukT の働きによりリーダー領域が切断され、ヌカシン

ISK-1 として菌体外へ輸送されると推定されている(図1)。

本研究ではヌカシン ISK-1 をモデルとした「**ランチビオティック工学**」実現のための**基盤づくり**を目的とした。具体的には生合成酵素 NukM、NukT の機能解析と改変を目指した。

3. 研究の方法

(1)異常アミノ酸形成酵素 NukM

NukM の触媒および基質認識ドメインの探索のために、NukM_N と NukM_C の *in vitro* における活性試験を行った。具体的には、*in vitro* において His-NukA と His-NukM_N および His-NukM_C の反応を 2 時間行い、LC-MS により反応物の質量変化を解析し、脱水・環化の評価を行った。また、酵素である NukM、NukM_N および NukM_C と、基質である NukA とその類縁体(修飾 NukA、NukA のリーダーペプチド、nukacin ISK-1) の相互作用を、表面プラズモン共鳴を用いて測定した。表面プラズモン共鳴とは、光学現象を応用してタンパク質間やタンパク質と DNA 間などの生体分子間の相互作用をリアルタイムに測定する実験手法である。具体的には、基質をリガンドとしてセンサーチップ CM5 に固定化し、酵素をアナライトとして注入し、それぞれの分子間の相互作用を求めた。

NukM の N 末端がリーダーペプチド認識に関与すると考えられたため、この結果を基に NukM の基質特異性の改変を行った。具体的には、N 末端にリーダーペプチドを付与した変異体 LP-NukM を構築し、リーダーペプチドを持たない NukA のプロペプチド部分と反応させ、LP-NukM の修飾活性評価を行った。修飾活性の評価には、前述したように LC-MS を用いた。

(2) ABC トランスポーター NukT

NukT の保存領域に変異を導入し、各ドメインを失活させた NukT 変異体を構築した。輸送活性は nukacin ISK-1 異種発現系を用いて培養液上清と菌体内のペプチドを質量分析法で評価した。リーダー領域の切断活性は、NukT 発現株から調製した反転膜小胞を用い、前駆体と反応後、抗菌活性および質量分析法により評価した。

4. 研究成果

(1)異常アミノ酸形成酵素 NukM

NukM をランチビオティック工学に応用するためには、機能ドメインや基質特異性などを調べる必要があるが、これらのことは未だ明らかになっていない。そこで本研究では、NukM の触媒および基質認識ドメインの探索のために、NukM を 1 ~ 577 アミノ酸残基までの NukM を N 末端 (NukM_N) と 578 ~ 917 アミノ酸残基までの C 末端 (NukM_C) とに分けて活性試験を行い、その結果を元に NukM の基質特異性の改変を行った。

His-NukM_N との反応物から 2 脱水・1 リン

酸化・1環化を生じた His-NukA と 3脱水・1環化を生じた His-NukA に相当する 6 個のピークが確認できた。このことから NukM の N 末端は単独でも脱水、リン酸化、環化活性を持つことが確認できた。また、His-NukM_C との反応物からは何の修飾も生じていない His-NukA に相当する 6 個のピークが確認できた。さらに、His-NukM_N と His-NukM_C との反応物からは、His-NukM_N のみと反応させた時と同様の結果が得られた。このことから NukM の C 末端は単独でも NukM_N 存在下でも触媒反応を示さないことがわかった。しかしながら、NukM の N 末端だけでは全長の NukM のような完全修飾は行うことはできなかったため、完全修飾のためには C 末端の存在も不可欠であると推察された (図 3)。

LC-MSによる*in vitro*反応後のNukAの質量分析結果

<i>In vitro</i>	主な生成物	
	脱水	環化
NukA + NukM	4	3
NukA + NukM _N	3	1
	2	1
NukA + NukM _C	0	0

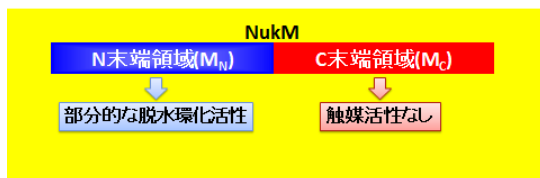


図 3 NukM の触媒ドメインの探索

表面プラズモン共鳴の実験結果からは、NukM、NukM_N どちらも NukA との親和性が最も高く、nukacin ISK-1 との親和性は極めて低いことが明らかとなった。また、NukM_C はすべてのペプチドに対して相互作用を示さなかった。リーダーペプチドを持たない nukacin ISK-1 の親和性が著しく低下したことから、NukM がリーダーペプチドを認識していることが示唆され、特に、NukM の N 末端が基質認識 (リーダー認識) に関与すると考えられた (図 4)。

表面プラズモン共鳴によるNukMとNukAによる相互作用解析

K_D : 解離定数 K_D が小さい⇒親和性が強い

Peptide	K_D (μM)	
	NukM	NukM _N
NukA	0.42±2.8	0.85±1.52
修飾NukA	1.72±0.04	1.14±0.04
Nukacin ISK-1	333±214	328±175

NukM_Cほどのペプチドに対しても相互作用を示さなかった。

NukMのN末端が基質認識(リーダー認識)に関与する。

図 4 NukM の基質認識ドメインの探索

N 末端にリーダーペプチドを付与した変異

体 LP-NukM は、リーダーペプチドを持たない NukA のプロペプチド部分に 4 脱水 2 環化を導入することができた。一方、NukM とプロペプチドの反応では、何の修飾も確認できなかったことから、NukM の N 末端にリーダーペプチドを付加することで、その基質特異性の拡張が出来ることが明らかとなった。

今後は、NukM の立体構造情報や遺伝子工学的手法を元に LP-NukM のさらなる改変を行い、様々なペプチドへ異常アミノ酸を導入する新規ペプチド工学、ランチビオティック工学へと展開する予定である。

(2) ABC トランスポーター NukT

NukT は ATP 依存型の膜輸送を行う ABC トランスポーターに分類される。また、NukT は N 末端側にはシステインプロテアーゼと相同性を示すペプチダーゼドメイン (PEP)、C 末端側には ATP 結合ドメイン (ABD) を有する ABC transporter Maturation and Secretion (AMS) 型タンパク質である。NukT の異種発現株より調製した反転膜小胞を用いた実験より、NukT は ATP 依存的にリーダー領域切断を触媒することが明らかとなった。さらに、PEP、ABD の部位特異的変異体を用い、これら二つのドメインの協調的作用が NukT 活性 (リーダー領域切断と菌体外輸送) に必須であることが示唆された (図 5)。

	<i>In vivo</i>			<i>In vitro</i>
	菌体外の nukacin	菌体外の前駆体	菌体内の前駆体	リーダー領域の切断
NukT欠損	-	-	+	-
NukT発現	+	-	-	+
PEP	Q6A	-	+	-
	C12A	-	+	-
	H90A	-	+	-
	N106D	+	-	+
ABD	K503R	-	+	-
	D615N	-	+	-
	H649R	-	+	-

+, detected; -, not detected

二つのドメインは協調的に作用している

図 5 NukT 変異体を用いた輸送活性とリーダー領域の切断の評価

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 10 件)

Ken-ichi Okuda, Takeshi Zendo, Shinya Sugimoto, Tadayuki Iwase, Akiko Tajima, Satomi Yamada, Kenji Sonomoto & Yoshimitsu Mizunoe, Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. Antimicrob. Agents Chemother., 57, 5572-5579 (2013) 査読有 DOI: 10.1128/AAC.00888-13

Miki Kawada-Matsuo, Yuichi Oogai, Takeshi Zendo, Jun-ichi Nagao, Yukie Shibata, Yoshihisa Yamashita, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Kenji Sonomoto & Hitoshi Komatsuzawa,

Involvement of the novel two-component NsrRS and LcrRS systems in distinct resistance pathways against nisin A and nukacin ISK-1 in *Streptococcus mutans*. Appl. Environ. Microbiol., **79**, 4751-4755 (2013) 査読有 DOI: 10.1128/AEM.00780-13

Miki Kawada-Matsuo, Yuuma Yoshida, Takeshi Zendo, Jun-ichi Nagao, Yuichi Oogai, Kenji Sonomoto, Yasunori Nakamura, Norifumi Nakamura & Hitoshi Komatsuzawa, Three distinct two-component systems are involved in resistance to the class I bacteriocins, Nukacin ISK-1 and nisin A, in *Staphylococcus aureus*. PLoS One, **8**(7), e69455 (2013) 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0069455

Mohammad Riazul Islam, Jun-ichi Nagao, Takeshi Zendo & Kenji Sonomoto, Antimicrobial mechanism of lantibiotics. Biochemical Society Transactions, **40**, 1528-1533 (2012) 査読有 DOI: 10.1042/BST20120190

Mami Nishie, Jun-ichi Nagao & Kenji Sonomoto, Antibacterial peptides "Bacteriocins": An overview of their diverse characteristics and applications. Biocontrol Science, **17**, 1-16 (2012) 査読有 DOI: 10.4265/bio.17.1

Mohammad R. Islam, Mami Nishie, Jun-ichi Nagao, Takeshi Zendo, Sandro Keller, Jiro Nakayama, Daisuke Kohda, Hans-Georg Sahl & Kenji Sonomoto, Ring A of nukacin ISK-1: a lipid II-binding motif for type-A(II) lantibiotic. J. Amer. Chem. Soc., **134**, 3687-3690 (2012) 査読有 DOI: 10.1021/ja300007h

Tijo Varghese Puramattathu, Mohammad R. Islam, Mami Nishie, Sae Yanagihara, Jun-ichi Nagao, Ken-ichi Okuda, Takeshi Zendo, Jiro Nakayama & Kenji Sonomoto, Enhanced production of nukacin D13E in *Lactococcus lactis* NZ9000 by the additional expression of immunity genes. Applied Microbiology and Biotechnology, **93**, 671-678 (2012) 査読有 DOI: 10.1007/s00253-011-3563-1

Jun-ichi Nagao, Mami Nishie & Kenji Sonomoto, Methodologies and strategies for the bioengineering of lantibiotics. Current Pharmaceutical Biotechnology, **12**, 1221-1230 (2011) 査読有 DOI: 10.2174/138920111796117274

Ken-ichi Okuda & Kenji Sonomoto, Structural and functional diversity of lantibiotic immunity proteins. Current Pharmaceutical Biotechnology, **12**, 1231-1239 (2011) 査読有 DOI: 10.2174/138920111796117274

Mami Nishie, Makoto Sasaki, Jun-ichi Nagao, Takeshi Zendo, Jiro Nakayama & Kenji Sonomoto, Lantibiotic transporter requires cooperative functioning of the peptidase domain and the ATP binding domain. Journal of Biological Chemistry, **286**, 11163-11169 (2011) 査読有 DOI: 10.1074/jbc.M110.212704

〔学会発表〕(計7件)

鄭 森, 永尾潤一, 西江麻美, 善藤威史, 園元謙二, Mechanism of mutual regulation between peptidase and ATPase domains of a bifunctional ABC transporter for lantibiotic synthesis. 第65回日本生物工学会大会(2013), 2013年9月19日、広島国際会議場(広島市)

Kenji Sonomoto, Mode of action of type-A(II) lantibiotic: a lipid II-binding motif for nukacin ISK-1, How bugs kill bugs: progress and challenges in bacteriocin research (招待講演), 2012年7月17日、University of Nottingham (Nottingham, イギリス)

Kenji Sonomoto, Lantibiotic transporter NukT, ABC transporter maturation and secretion protein, 3rd International Symposium on Antimicrobial Peptides (招待講演), 2012年6月15日、Villeneuve d'Ascq (Lille, フランス共和国)

Mohammad Riazul Islam & Kenji Sonomoto, Ring A of nukacin ISK-1: a lipid II-binding motif for type-A(II) lantibiotic, 3rd International Symposium on Antimicrobial Peptides (招待講演), 2012年6月15日、Villeneuve d'Ascq (Lille, フランス共和国)

Kenji Sonomoto, Mami Nishie & Jun-ichi Nagao, Lantibiotic transporter, NukT, requires cooperative functioning of the peptidase domain and the ATP binding domain, ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases (招待講演), 2012年3月8日、国際会議場 (Innsbruck, オーストリア)

Kenji Sonomoto, The Young Scientist Seminar 2011 Bioresources: Their Potentials & Applications New Era of Lactic Acid Bacteria to Open the Future (招待講演), 2012年1月31日、国際会議場 (Bangkok, タイ)

Kenji Sonomoto, Mami Nishie, Mohammad R. Islam, Jun-ichi Nagao, Takeshi Zendo & Jiro Nakayama, New Insight of Lantibiotic Engineering: Characterization of the enzymes, design and mode of action of lantibiotics, and immunity proteins, Enzyme Engineering XXI 2011年9月18-22日、国際会議場 (Vail, コロラド, 米国)

〔図書〕(計1件)

Kenji Sonomoto & Atsushi Yokota (編著)、
Caister Academic Press, Lactic Acid Bacteria and
Bifidobacteria: Current Progress in Advanced
Research, 2011, 286 ページ、ISBN:
978-1-904455-82-0

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/microbt/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

園元 謙二 (SONOMOTO, Kenji)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：10154717

(2) 研究分担者

神田 大輔 (KOHDA, Daisuke)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：80186618