科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号: 32607 研究種目:基盤研究(C) 研究期間:2011~2013 課題番号:23510282

研究課題名(和文)投げ縄構造を有する抗結核ペプチド、ラリアチンの改変と化合物ライブラリーへの応用

研究課題名(英文)Structure-activity relationship of lariatin

研究代表者

猪腰 淳嗣(Inokoshi, Junji)

北里大学・薬学部・准教授

研究者番号:30151640

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文): ラリアチンA とBは放線菌 Rhodococcus jostii K01-B0171 株が生産する抗Mycobacterium活性を示すペプチド化合物で、ユニークな投げ縄構造を有している我々はこれまでに、ラリアチン生合成遺伝子をクローニングした。今回、ラリアチンのアミノ酸変異体の生産システムを確立し、ラリアチン生産能と構造活性相関を検討した。その結果、環状部分のG1, R7, E8と尾部のW9, V10, G11がラリアチン生産に重要であること、6番目および9番目の芳香族アミノ酸と7番目と17番目の塩基性アミノ酸と10V, 14Nはラリアチンの抗菌活性に重要であることが示唆された

研究成果の概要(英文): Lariatins A and B discovered as an anti-mycobacterial peptides are ribosomally syn thesized by Gram positive Rhodococcus jostii. The compounds are unique cyclic peptides, the rigid lasso st ructure. Production of lariatins in R. jostii is dependent upon a five-gene cluster, larA to larE. We esta blished a simple system of amino acid substitutions of lariatin by R. jostii delta larA, Using this system, mutational scanning of lariatin was carried out. The results showed that three aa residues (G1, R7 and E 8) in the circle and three aa residues (W9, V10 and G11) in the threaded segment of the tail are important for lariatin production, and that two aa residues (Y6 and R7) in the circle and four aa residues (7R7, V10, N14 and K17) in the threaded segment of the tail are important for anti-mycobacterial activity. Propept in biosynthesis gene cluster was identified on the genome of Microbispora rosae. The gene cluster containing the genes corresponding to lar A, B, C and D, but not lar E.

研究分野: 複合新領域

科研費の分科・細目: 生物分子化学・ケミカルバイオロジー

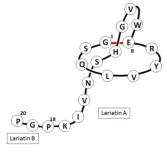
キーワード: 抗結核活性 構造活性相関

1.研究開始当初の背景

優れた化学療法薬が実用化されたことによ り多くの感染症が治癒可能な疾患となった。 しかし、結核は単一の感染症としてはいまな お世界最大の伝染病である。さらに、結核の 薬物療法で重要な薬剤の位置にあるイソニ アジドとリファンピシンに耐性化した多剤 耐性結核菌が出現し、再発患者の治癒を困難 なものとしている。このような結核治療の現 状に対して本申請で研究対象としたラリア チンは、我々が独自に構築した抗結核菌活性 物質の探索の過程で発見した新しい化合物 である。ラリアチンは土壌由来の微生物 Rhodococcus jostii K01-B0171 が生産するペ プチド系の抗生物質で、結核菌を含む抗酸菌 に対して選択的な抗菌活性を示す。ラリアチ ン A と B はアミノ酸数 18 および 20 からな り、どちらも N 末端のグリシンのアミノ基と N末から8番目のグルタミン酸の カルボニ ル基がアミド結合で環状構造をとり、その中 を 9 番目以降の直鎖ペプチドが貫通した"投 げ縄構造(losso structure)"であることが明 らかにされている。(J. Am. Chem. Soc. 128: 7486-7491 (2006)) ラリアチンは黄色ブドウ 球菌や肺炎球菌などのグラム陽性菌や大腸 菌や緑膿菌などのグラム陰性菌、カンジダや アスペルギルスなどの真菌に対してはまっ たく抗菌活性を示さず、結核菌を含むミコバ クテリウム属の細菌にのみ抗菌活性を示す ことから結核菌固有の分子あるいは代謝経 路に作用するものと予想された。

最近、我々はラリアチンの生合成遺伝子群のクローニングに成功した。得られた生合成遺伝子を解析した結果、ラリアチン生合成遺伝子は5つのたんぱく質が一本のmRNAにコードされているという特徴が明らかにされた。すなわち、ラリアチンは生産菌の染色体DNAのlarAに前駆体ペプチドとしてコードされており、larB, C, D 産物により修飾された後、larE 産物により培養液中へ分泌される

とさうブラコ伝をにまさに知、アド(改よざこ見我チするAのに々ンるAのよざまなよる、アははなる、アははなる、アは基はを遺)事さミ



ノ酸を置換、欠失、または伸長したラリアチン誘導体を簡便に作成する方法を確立した。

2. 研究の目的

本研究では ラリアチン変異体の生産システムを用いてラリアチンを構成するアミノ酸の変異体を作成し、ラリアチンのアミノ酸配列と抗結核活性の相関に関する知見を蓄積し、優れた抗結核活性を有する誘導体の創製の基盤を構築する。また、微生物ゲノムに

潜在している投げ縄ペプチドの遺伝子を 我々のシステムで発現させ、新しいタイプの 化合物ライブラリーの構築の基盤を確立す ることを目的とした。

3.研究の方法

<u>ラリアチン アミノ酸変異体の生産と抗結</u> 核活性の評価

これまでの研究で作成された R. jostii larA 欠損株 を宿主とし、pNit-QT2LarA 発現プラスミドにコードされたラリアチン 変異体前駆ペプチド LarA'を発現させ ラリアチン 変異体を得た。ラリアチン のアミノ酸変異 体前 駆 ペプチド 発 現 プラスミドpNit-QT2-larA'は pNit-QT2-larA を鋳型に、primeSTAR mutagenesis で作成した。変異体の生産は LC/UV 及び LC/MS で確認 した。 抗 結 核 活性 は TC 耐性 M. smegmatis mc^2 155 及び M.smegmatis 341 を検定菌とし、ペーパーディスク法で評価した。

<u>ラリアチン生産菌の無細胞抽出液を用い</u> たラリアチンの合成

ラリアチンは、前駆体ポリペプチドとして翻 訳された後、ラリアチン生合成遺伝子クラス ターにコードされているペプチダーゼ反応、 環化反応、および細胞外分泌酵素によって成 熟化する。このような一連の酵素群は互いに 連続した反応として機能していることから、 複合体またはそれに類似した構造を形成し ているものと推定される。このような仮説を 背景として、ラリアチン前駆体遺伝子を欠損 させた変異株の無細胞抽出液を用いて試験 管内ラリアチン生合成システムの構築を試 みた。基質となるラリアチン前駆体は C 末端 側にヒスチジンタグを付加した融合タンパ ク質として大腸菌で発現させ、Ni アフィニテ ィカラムを用いて精製した。ラリアチン生産 菌の無細胞抽出液は、R. jostii larA 欠損株を 超音波破砕して調製した。His タグ付きラリ アチン前駆体と R. jostii larA 欠損株の抽出 液を得られたとインキュベートしたのちそ の反応液を LC-MS で分析した。

グラム陽性菌の投げ縄構造ペプチド生合 成遺伝子のクローニングと発現

Streptomyces avermitilis 由来投げ縄ペプチド生合成遺伝子クラスタは、すでに公開されているゲノム情報を用いてクローニングした。プロペプチン生合成遺伝子クラスターは、本研究で取得したプロペプチン生産菌Microbispora rosea NRBC14044のドラフトゲノム配列をプロペプチンのアミノ酸配列で検索し、同定した。投げ縄ペプチド生合成遺伝子クラスターはロドコッカス-大腸菌シャトルベクターでクローン化し、R. jostiilarA 欠損株を宿主として発現を検討した。

4. 研究成果

ラリアチン アミノ酸変異体の生産と抗結

核活性

ラリアチンはリボソームで生成されたポリペプチドを前駆体として生合成されることが明らかとなったため、ラリアチン 前駆体をコードする larA に変異を導入し、その変異を導入した遺伝子(larA')を ラリアチン生産菌の larA 欠損株を宿主とし発現させることで ラリアチン 変異体を取得する方針を立てた。

まず、ラリアチン生産菌である *R. jostii* K01-B0171 に larA の配列を含まないプラスミド pDELlarA を導入し、二回交叉相同組み換えで larA 欠損株を作成した。一度目の組み換えを起

こした株は KM 添加培地で選択し、さらに 二度目の組み換えを起こした株を KM 非添 加培地で選択した。得られた株は染色体抽出 を行い、遺伝子的に larA が欠損しているこ とを明らかにした。さらに、HPLC にて ラ リアチンの生産能が失われたことを確認し た。次に、得られた R. jostii larA 欠損株 に、 プラスミドにて LarA を発現させることに より ラリアチンの生産の回復を確認した。 構築したlarA 欠損株にlarA内の任意の塩基 を置換、付加、欠損させ、34種類のラリアチ ン変異体を作成した。G1A, G1C, E8D, R7A, 及び W9A は生産されなかった。V10A と G11A は天然型に比して生産量が 1/100 以 下に低下した。Ala 置換体が生産されなかっ た Arg7 と Trp9 に関して性質の似ている アミノ酸の置換体を作成したところ、R7K、 W9Y ともに生産がみられた。生産がみられ た Ala 置換体のうち V5A 以外は天然型に 比して生産量が低下した。K17R は天然型に 比して生産量が 1/10 以下になった。Y6A, G11A, 及び N14A は後述のように抗結核活 性が著しく低下したので、これらの類縁アミ ノ酸への置換体を作成したが、生産がみられ たのは Y6F と Y6W のみだった。アミノ酸 置換変異体の生産と抗菌活性について、環状 部分の G1, R7, E8 と尾部の W9, V10, G11 が ラリアチン生産に重要であること、6番目お よび 9 番目の芳香族アミノ酸と 7 番目と 17 番目の塩基性アミノ酸と 10V, 14N はラリア チンの抗菌活性に重要であることが示され た。環を拡大、または縮小化した変異体、C 末 端欠失体、付加体はいずれも目的の変異体は 得られなかった。しかし、C 末端欠失体(P、 KP、 IKP) に関しては、Gly1~Glu8 の環状ペプチドと思われる分子量が LC/MS で検出された。また C 末端にヒスチジンタ グを付加した変異体(lariatin A-6xHis、 lariatin B-6xHis)では LC/MS により ラリ アチン A が検出された。

<u>ラリアチン生産菌の無細胞抽出液を用い</u> <u>たラリアチンの合成</u>

前述の実験の結果から明らかとなった生産 されない、または生産量が低いアミノ酸置換 体を作成する方法を開発することを目的に、 試験管内でラリアチン前駆体からラリアチンを作成する方法の確立を試みた。モデル実験として野生型のラリアチン A を選び、大腸菌で発現させた his タグ付きラリアチンA 前駆体と R. jostii larA 欠損株の無細胞流を混合し、30 で反応させたのち、反応応を HPLC で分析した。新しいピークは観察されなかった。ラリアチンの翻訳後修飾だはArD がコードするシグナルペプチダーゼ活性によるシグナル領域の除去と LarB が連続して起こると推定される。そこで、LarB

および LarD を単独で、大腸菌および R. jostii で発現させ、この菌体より調製した無細胞抽出液を粗酵素として用いて、His タグ付きラリアチン前駆体と反応させたが、HPLC クロマトグラムに目的とするピークは検出されなかった。大腸菌が生産する投げ縄ペプチドであるミクロシン J25 では、in vitro 翻訳後修飾でミクロシン J25 も作成できることが報告されている。ラリアチンを in vitro で創製するためには、補酵素の検討などをおこなうことが必要である。

グラム陽性菌に潜在化する投げ縄構造ペ プチドの発現

シークエンシング技術の驚異的な進歩により、多くの微生物ゲノムが解析された。その結果、投げ縄ペプチドは多くのグラム陽性菌およびグラム陰性菌に潜在化していることが明らかとなった。グラム陰性菌のゲノムから発見された投げ縄ペプチド遺伝子は、大腸菌を宿主とした異種遺伝子発現され、主に物理化学的特徴が検討されている。一方、グラム陽性菌の投げ縄ペプチド遺伝子はこれまでのところ報告はない。我々は、ラリアチン生産菌を宿主として投げ縄ペプチドの異種発現について検討した。

プロペプチンは *M. rosae* NRBC14044 が生 産する プロリルエンドペプチダーゼ阻害剤 で、投げ縄ペプチド構造を有していると考え られている。しかし、その生合成遺伝子につ いては報告されていない。そこで、生産菌の ゲノム配列を次世代シークエンサーで読み、 得られたゲノム情報をプロペプチンのアミ ノ酸配列を用いてプロペプチン生合成遺伝 子を探索した。その結果、プロペプチンのア ミノ酸配列と一致する ORF を発見すること に成功した。ORFは38アミノ酸をコードし、 N末より 19 aa はシグナルペプチドと推定さ れた。プロペプチン前駆体遺伝子の下流には、 ラリアチン生合成遺伝子クラスターに含ま れる larB, larC および larD に相当する遺伝 子が、順方向にコードされていた (prpA, prpB, prpC, prpD)が、ABCトランスポー ターをコードする larE に相当する遺伝子は 見られなかった。

一方、S. avermitilis のゲノム上にコードされている投げ縄ペプチド遺伝子はラリアチ

ン生合成遺伝子クラスターに含まれる lar A ~ larE に対応する遺伝子、avlA, avlB, avlC, avlD, avlE が存在した。次に、Rhodococcus:E.coli シャトルベクターのプロモーター領域の下流に prpA~prpD,および avlA~avlEをそれぞれ連結し、得られたプラスミドを R.jotii larA 欠損株に導入してプロペプチンおよびエバミチリス由来投げ縄ペプチドの発現を試みた。形質転換体をフリアチン生産培地で培養し、培養液のエタノール抽出物を HPLC で分析したところ、avlA~avlEを導入した形質転換体で、元株では検出されない新しいピークが検出された。今後このピークが投げ縄ペプチドであるかどうか検討を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に は下線)

〔雑誌論文〕(計 1件)

(1) <u>Inokoshi J</u>, Matsuhama M, Miyake M, Ikeda H, Tomoda H. Molecular cloning of the gene cluster for lariatin biosynthesis of *Rhodococcus jostii* K01-B0171. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012 95:451-460 (2012) 杳読有

[学会発表](計 2件)

(1)

- J. Inokoshi, M. Miyake, Y. Shimizu, H. Tomoda Analysis of essential amino acids in lasso peptide lariatins for anti-mycobacterial activity by single amino acid substitution The 6th Korea-Japan Chemical Biology Symposium 2012年1月27日札幌
- (2) <u>猪腰淳嗣</u>, 供田 洋 抗結核活性を示す放 線菌由来投げ縄ペプチド・lariatin の生合成 機構の解析とアミノ酸置換変異体の構造活 性相関, 天然薬物の開発と応用シンポジウム 2012 年 11 月 01 日 大阪

[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: 出原年月日: 国内外の別:

○取得状況(計 0件)

名称: 発明者: 権利者: 種類: 種号: 取得年月日: 国内外の別:

〔その他〕 ホームページ等

- 6. 研究組織
- (1)研究代表者 猪腰 淳嗣 (INOKOSHI JUNJI)

北里大学・薬学部・准教授 研究者番号:30151640

- (2)研究分担者 なし
- (3)連携研究者 なし