

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292040

研究課題名(和文) 異常アミノ酸形成酵素の構造解析、機能改変、ペプチド工学への応用

研究課題名(英文) Structural analysis and functional modification of unusual amino acid-forming enzyme, and the application to peptide engineering

研究代表者

園元 謙二 (SONOMOTO, Kenji)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：10154717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：NMRによる解析から、Nukacin ISK-1の溶液構造は二状態が化学交換しており、その交換速度 k_{ex} はおよそ 1.5 s^{-1} であった。存在比が高い状態が細胞壁ペプチドグリカン前駆体lipid IIに対して高い親和性を持っていた。そして、nukacin ISK-1のRing C領域にある疎水性アミノ酸側鎖がlipid II脂肪鎖領域との結合に、Ring A近傍領域がlipid IIのリン酸基との結合に関与することが示唆された。異常アミノ酸形成酵素NukMはnukacin ISK-1の前駆体ペプチドのリーダーペプチドを付与することによって、他のペプチドも基質として認識した。

研究成果の概要(英文)：The structure of nukacin ISK-1 was found to have two states chemically exchanged by solution NMR. The exchange rate k_{ex} was about 1.5 s^{-1} . The high abundance ratio had high affinity to the cell wall peptidoglycan precursor lipid II. The NMR-based model of nukacine ISK-1 in a complex with lipid II indicated that the hydrophobic amino acid side chain in the Ring C region of nukacin ISK-1 participates in binding to the lipid II fat chain region, and the region near Ring A participates in binding with the phosphate group of lipid II. By attaching the leader peptide of the precursor peptide of nukacin ISK-1, the unusual amino acid-forming enzyme NukM also recognized other peptides as a substrate.

研究分野：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 翻訳後修飾 標的分子 細胞壁前駆体lipid II
核磁気共鳴(NMR)解析 X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

ランチピ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。ランチピ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**。

我々は微生物のランチピ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「**ランチピオティック工学**」(図1)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**強化型ランチピオティック**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1 ランチピオティック工学の全体像

2. 研究の目的

本研究は、応用微生物学の領域に構造生物学的情報を取り入れ、微生物酵素の改変と高度利用を目指す学際領域研究である。具体的には、研究代表者がこれまで長年にわたって抗菌作用や生合成機構の研究を行ってきた、*Staphylococcus warneri* が生産するランチピオティック nukacin ISK-1 (27 アミノ酸、異常アミノ酸であるランチオニン環が3つ存在する (Rings A, B, C) 前駆体ペプチド NukA に異常アミノ酸を導入・分泌されたもの)(図2)を取り上げた。先行研究 (*J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 3687, 2012)により、nukacin ISK-1 の Ring A は真正細菌の外膜上にある細胞壁ペプチドグリカン前駆体 lipid II を標的分子として強く結合し抗菌作用を示すことが明らかになっている。そこで、まず nukacin ISK-1 の溶液構造や、nukacin ISK-1 と lipid II との相互作用領域を明らかにすることを試みた。

次に、異常アミノ酸形成酵素 NukM の機能改変や結晶構造の解析を試みた。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。NukM の機能を拡張し、その構造を明らかにするこ

とで、新たなペプチドデザイン法「**ランチピオティック工学**」の開発・展開を図り、国内外に強烈なインパクトを生むことを目的とした。

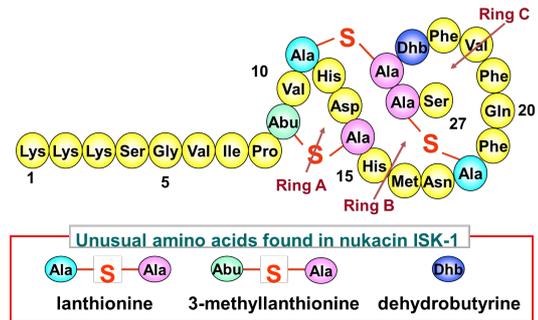


図2 Nukacin ISK-1 の構造と異常アミノ酸

3. 研究の方法

(1) Nukacin ISK-1 の溶液構造の解析

S. warneri を培養した TSBYE 培地地上澄から nukacin ISK-1 を精製した。溶液構造決定には終濃度 1.1 mM の nukacin ISK-1 を用いた。

(2) Nukacin ISK-1 と lipid II との相互作用領域の解析

lipid II と相互作用する nukacin ISK-1 の各アミノ酸残基を簡便に決定するために、*Bacillus subtilis* の2成分制御システム、LiaRS (Lipid II cycle interfering antibiotic response regulator and sensor) レポーターアッセイを検討した。LiaRS は lipid II と特異的に作用する抗生物質の簡便な検索システムである。nukacin ISK-1 の一アミノ酸変異体は、これまで構築した *Lactococcus lactis* における異種発現系を用いた nukacin ISK-1 変異体ライブラリー (*Mol. Microbiol.*, **72**, 1438, 2009) を使用してそれぞれ精製した。

詳細な相互作用解析には、¹³C/¹⁵N 標識 nukacin ISK-1 と試験管内での酵素反応により生合成した lipid II を用いた。nukacin ISK-1 の安定同位体標識には CHL 培地 (クロレ工業社) を用いた。218 μM の ¹³C/¹⁵N 標識 nukacin ISK-1 に対して重水素化した界面活性剤 *n*-octyl-β-D-glucoside (BOG) ミセル、lipid II の滴定を段階的に行い各残基における化学シフト変化を観測した。NMR スペクトルの測定には AVANCE600 (BRUKER 社) を用いた。

(3) NukM の機能改変解析

これまでの成果として、N 末端に NukA のリーダペプチド (LP) を付与した変異体 LP-NukM は、LP を削った 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。そこで、His-LP-NukM を大腸菌で発現させ精製した。また、NukA とは全く構造の異なる抗真菌活性ペプチド、プロタミンを基質として LP-NukM による修飾活性を評価した。*In vivo* 反応物の質量変化を LC-MS によ

り解析し、脱水・環化の評価を行った。

(4) NukM の X 線結晶構造解析

結晶構造解析には高濃度かつ高純度の精製 NukM が必要である。大腸菌用にコドン最適化した *nukM* 発現プラスミドを構築し、大腸菌 BL21(DE3) を宿主として大量発現を行った。回収した菌体は、ソニケーションにより破碎し、超遠心で不溶性画分を除いた。その後、Ni-アフィニティークロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーを用いて NukM の精製を行った。収量が 1 L 当たり 2.58 mg の NukM を精製でき、コドン最適化前に比べて 5 倍以上収量が上がった。また、いくつかの NukM 変異体についても結晶化を検討した。

4. 研究成果

(1) Nukacin ISK-1 の溶液構造の解析

Nukacin ISK-1 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルは K2~S27(A 状態)と K2'~S27'(B 状態)に帰属される二組のクロスピークからなっていた(図 3)。 ^1H - ^1H EXSY を測定したところ、この二状態は化学交換しており、その交換速度 k_{ex} はおよそ 1.5 s^{-1} であった。クロスピーク強度から 2 つの状態の存在比を推定したところ、A 状態 : B 状態 = 4 : 1 であった。NOESY スペクトル解析から B 状態の収束構造を得ることができた。

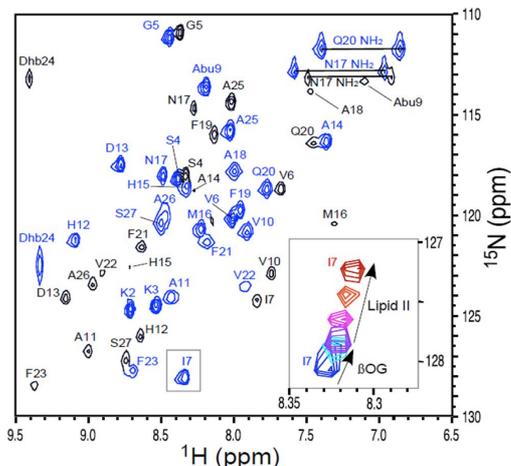


図 3 Nukacin ISK-1 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル A 状態 (青色) と B 状態 (黒色)

挿入図は、Ile7 の βOG 、lipid II の段階的滴定に伴う化学シフト変化を示す。

(2) Nukacin ISK-1 と lipid II との相互作用領域の解析

まず、nukacin ISK-1 の Ring A 領域のアミノ酸変異体を精製して用いた結果、Ring A が lipid II との特異的な相互作用に参与していることを再確認した。さらに、nukacin ISK-1 の他の領域の変異体について検討したところ、N 末端の線状領域中の Lys1、Lys2、Lys3 および Gly5、Ring B と Ring C も lipid II との相互

作用に参与していた。同時に、これら nukacin ISK-1 変異体の抗菌活性と lipid II との相互作用に相関があることも確認された。

βOG の滴定、続く lipid II の滴定において、A 状態は比較的大きな化学シフト変化を示したが、B 状態は顕著な化学シフト変化を示さなかった。このことから A 状態の方がリガンドに対して高い親和性を持つことが明らかになった。また、nukacin ISK-1 の Ring C の globular 領域にある疎水アミノ酸 (Phe19~Dhb24) の化学シフトは、 βOG 、lipid II の滴定に伴い変化した。一方、Ring A 近傍領域 (Ile7~Val10) の化学シフトは lipid II の滴定のみで大きく変化した(図 3 の挿入図は Ile7 の化学シフト変化を示す)。よって、我々は Ring C の globular 領域にある疎水性アミノ酸側鎖が lipid II 脂肪鎖領域との結合に、Ring A 近傍領域が lipid II のリン酸基との結合に参与しているという相互作用モデルを提唱した(図 4)。さらに、これらの相互作用情報は、前述した LiaRS レポーターアッセイの結果によっても支持された。

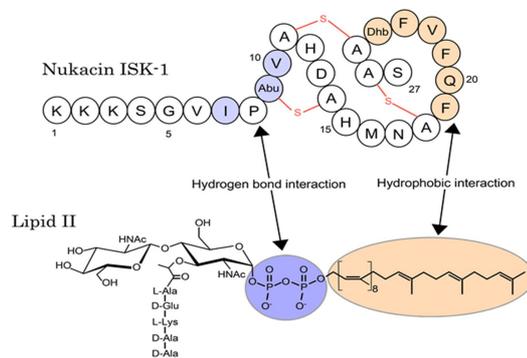


図 4 Nukacin ISK-1 と lipid II との相互作用モデル

(3) NukM の機能改変解析

プロタミンや N 末端に LP を付与したプロタミンの修飾は確認されなかった。そこで、さらに NukA のプロペプチドの 1 から 10 残基目までを付加したもの (LP-NukA₁₋₁₀-プロタミンおよび NukA₁₋₁₀-プロタミン) を基質としたところ、1 脱水 1 環化が確認され、NukA_L-NukA₁₋₁₀-プロタミンの反応効率は NukA₁₋₁₀-プロタミンと比べて良好であった。

(4) NukM の X 線結晶構造解析

まず、精製 NukM と NukA を *in vitro* において反応させ、LC-MS で反応物を解析したところ、4 脱水 3 酸化の完全修飾が導入された NukA が確認できた。この結果から、結晶化に用いる精製 NukM はその活性を保持していることが明らかとなった。

様々な条件での NukM の結晶化を試みた。His-NukM については、高い塩濃度のバッファーあるいはグリセロールと DTT を含むバッファーで精製したもの、イオン交換クロマ

トグラフィーで精製したもの、そして ATP アナログ、LP や His-NukA と混合して共結晶を試みたものをそれぞれスクリーニングに供したが、結晶は確認されなかった。また、LP-NukM については、グリセロールと DTT を含んだバッファで精製したもの、精製後、リジンメチル化処理を行ったものをそれぞれスクリーニングに供したが、結晶は確認されなかった。しかし、これらサンプルは一定温度でのインキュベーションを続けることによって結晶を形成する可能性もある。これまで NukM の全体構造の結晶化を試みてきたが、構造が不安定性などの原因から難しいのかもしれない。そこで、酵素活性を持つ NukM の N 末端 (1~577 残基) の結晶化を試みたが、成功しなかった。C 末端 (578~987 残基) について検討を行う必要がある。また、NukM の構造中には多くのループ領域が存在し水素結合を介した二次構造をとっておらず、構造に揺らぎを与え不安定なものにしている可能性がある。そこで、ループ領域を除いた NukM 変異体の構築も必要と思われる。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 5 件)

Sen Zheng and Kenji Sonomoto, Diversified transporters and pathways for bacteriocin secretion in gram-positive bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **102**, 4243-4253 (2018) 査読有、DOI: 10.1007/s00253-018-8917-5

Sen Zheng, Jun-ichi Nagao, Mami Nishie, Takeshi Zendo and Kenji Sonomoto, ATPase activity regulation by leader peptide processing of ABC transporter maturation and secretion protein, NukT, for lantibiotic nukacin ISK-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **102**, 763-772 (2018) 査読有、DOI: 10.1007/s00253-017-8645-2

Khaled M. Elsayed, Mohammad R. Islam, Abdullah-Al-Mahin, Jun-ichi Nagao, Takeshi Zendo and Kenji Sonomoto, LiaRS reporter assay: A simple tool to identify lipid II binding moieties in lantibiotic nukacin ISK-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **123**, 398-401 (2017) 査読有、DOI: 10.1016/j.jbiosc.2016.10.002

Chinatsu Shimafuji, Megumi Noguchi, Mami Nishie, Jun-ichi Nagao, Kouki Shioya, Takeshi Zendo, Jiro Nakayama and Kenji Sonomoto, *In vitro* catalytic activity of N-terminal and C-terminal domains in NukM, the post-translational modification enzyme of nukacin ISK-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **120**, 624-629 (2015) 査読有、DOI: 10.1016/j.jbiosc.2015.03.020

Urmi Roy, Mohammad Riazul Islam, Jun-ichi Nagao, Hiroshi Iida, Abdullah-Al-Mahin, Mengqi Li, Takeshi Zendo, Jiro Nakayama and Kenji Sonomoto, Bacteriocidal activity of nukacin ISK-1: an alternative mode of action. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **78**, 1270-1273 (2014) 査読有、DOI: 10.1080/09168451.2014.918485

〔学会発表〕(計 12 件)

長田弥生、野口萌、永尾潤一、善藤威史、園元謙二、異常アミノ酸導入酵素 NukM を用いた新規ペプチドデザイン技術の構築、第 24 回日本生物工学会九州支部大会 (2017)

藤浪大輔、Abdullah Al Mahin, Khaled M Elsayed、永尾潤一、善藤威史、園元謙二、神田大輔、抗菌ペプチド nukacin ISK-1 の溶液構造決定、第 56 回 NMR 討論会 (2017)

Kenji Sonomoto, Sen Zheng, Jun-ichi Nagao, Mami Nishie, Takeshi Zendo, Interdomain cooperation of dual functional ABC transporter (ABC transporter maturation and secretion (AMS) protein) for lantibiotic production, The 19th Japanese-German Workshop on Enzyme Technology (2017)

Kenji Sonomoto, Interdomain cooperation of dual functional ABC transporter NukT for synthesis of lantibiotic, nukacin ISK-1, ANTIMIC2017 (2017)

松永愛美、鄭 森、高城博也、石橋直樹、永尾潤一、善藤威史、園元謙二、ランチビオティック nukacin ISK-1 の生合成に参与するトランスポーターの構造と機能解析、第 23 回日本生物工学会九州支部大会 (2016)

Kenji Sonomoto, Diversity and Application of Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, 5th Asian Federation of Societies for Lactic Acid Bacteria International Symposium (2016)

鄭 森、永尾潤一、西江麻美、善藤威史、園元謙二、Mutual regulation between two distant regions of a bifunctional ABC transporter for lantibiotic nukacin ISK-1 exportation, 第 67 回日本生物工学会大会 (2015)

Kenji Sonomoto, Novel bacteriocins from lactic acid bacteria: various structures and applications, 56th international symposium of the Korean Society of Life Science (2015)

Takeshi Zendo and Kenji Sonomoto, Bacteriocins from lactic acid bacteria: characterization and potential applications, The Food Microbiology Division Symposium of KoSFoST International symposium (2015)

Abdullah-Al-Mahin, Urmi Roy, Daisuke Fujinami, Mohammad Riazul Islam, Sabrina Momin, Jun-ichi Nagao, Hiroshi Iida, Takeshi Zendo, Jiro Nakayama, Daisuke Kohda and Kenji Sonomoto, Insights into the molecular mode of action of nukacin ISK-1, 第 66 回日本生物工学会大会 (2014)

Abdullah-Al-Mahin, Urmi Roy, Daisuke Fujinami, Mohammad Riazul Islam, Sabrina Momin, Jun-ichi Nagao, Hiroshi Iida, Takeshi Zendo, Jiro Nakayama, Daisuke Kohda and Kenji Sonomoto, Unraveling the blueprint of the molecular mode of action of nukacin ISK-1, a type-A(II) lantibiotic, 4th International Symposium on Antimicrobial Peptides (2014)

Kenji Sonomoto, Mami Nishie, Sen Zheng, Jun-ichi Nagao and Takeshi Zendo, Characterization of biosynthetic enzymes and antibacterial action of lantibiotic nukacin ISK-1, 4th International Symposium on Antimicrobial Peptides (2014)

〔その他〕

ホームページ等

九州大学大学院農学研究院生命機能科学部
門システム生物工学講座微生物工学分野

<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