

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：23401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14724

研究課題名(和文) 抗生物質ストレプトスリシン類縁化合物の新規生合成酵素に関する研究

研究課題名(英文) Biosynthetic enzymes for streptothricin group antibiotic

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗生物質streptothricin(ST)の生合成において、アミノ糖と リジンのペプチド結合形成は、NRPSによって触媒される。本研究では、リジンの代わりにグリシン側鎖を有するST類縁化合物BD-12の生合成について検証し、アミノ糖とグリシン側鎖のペプチド結合がNRPSではなくFem様酵素Orf11によってtRNA依存的に形成されることを見出した。すなわち、Orf11はGly-tRNAを基質として利用する。さらに、Orf11のホモログ酵素Sba18を同定し基質特性を評価したところ、Gly-tRNAだけでなくAla-tRNAとSer-tRNAを基質として認識し、新規ST類縁化合物を生産した。

研究成果の概要(英文)： The antibiotic streptothricin (ST) possesses an amino sugar bound to an L-lysine (-Lys) residue via a peptide bond. The peptide-bond formation has been shown to be catalyzed by a nonribosomal peptide synthetase (NRPS) during ST biosynthesis. The focus of this study is the closely related ST analogue BD-12, which carries a glycine-derived side chain rather than a -Lys residue. In the biosynthetic studies of BD-12, we revealed that the peptide bond between the amino sugar and the glycine residue is catalyzed by a Fem-like enzyme (Orf 11) in a tRNA-dependent manner rather than by an NRPS; Orf 11 utilizes Gly-tRNA as a substrate. From a genome database, we further identified the enzyme (Sba18) homologous to Orf11 and investigated the substrate specificity. Interestingly, Sba18 was found to accept Ala-tRNA and Ser-tRNA as well as Gly-tRNA, producing new ST-related compounds which carry alanine and serine side chains.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ペプチド結合 tRNA

1. 研究開始当初の背景

抗生物質 streptothricin (ST) は、強力な抗菌活性を示すにも関わらず、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。さらに、1943年に放線菌の培養液から初めて単離されて以来、多くの研究者が有機合成化学的な修飾で真核生物への毒性緩和にチャレンジしてきた抗生物質としても知られている。STの特徴は、その化学構造に1残基のβリジンあるいは2~7残基のβリジンペプチドを有していることであり(図1)、また、このβリジンペプチド側鎖が長くなるほど生理活性が強いことを明らかにしている(*J. Biol. Chem.*, 281, 16842-16848, 2006)。申請者らは、STの抗生物質としての実用化を目指し、生合成工学的アプローチにてその毒性緩和への試みを展開してきた。さらに最近、STのβリジンペプチド側鎖が新規触媒機能を有する3つの非リボソームペプチド合成酵素(NRPS: Orf5, Orf18, Orf19)によって生合成されることを明らかにした(*Nature Chem. Biol.*, 8, 791-797, 2012)(図2A)。また、本研究で新たに得たβリジンペプチドのみの構造は、枯草菌選択的に抗菌活性を示したことから、ST類縁化合物としては、真核生物への毒性緩和を達成できた初めての成功例であり、生合成工学的アプローチの重要性を示したと言える。

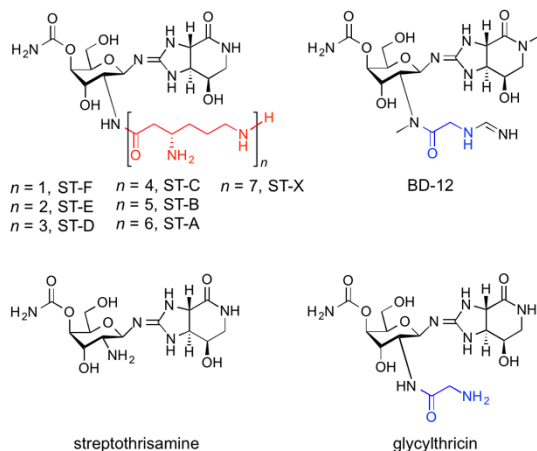


図1 streptothricinおよびその類縁化合物の化学構造式

2. 研究の目的

天然には、ST類縁抗生物質がいくつか知られており、BD-12(図1)はその1つである。その化学構造は、βリジンの代わりにグリシン類縁体(Nホルムイミドイルグリシン)を有し、さらに、2つのN-メチル基を有している。そこで、BD-12生産菌 *Streptomyces luteocolor* NBRC13826のドラフトゲノム解析からBD-12生合成遺伝子を同定したところ、極めて興味深いことに、ST生合成酵素におけるβリジンとアミノ糖の縮合反応(ペプチド合成反応)に必須なOrf5とOrf18のホモログ遺伝子がBD-12生合成遺伝子群に存在しないことを明らかにした。また、その他のNRPSや

ペプチド合成酵素をコードする遺伝子も存在していなかったことから、BD-12の生合成酵素に新規ペプチド合成酵素が存在する可能性が強く示唆された。

そこで本研究では、BD-12の生合成メカニズムを解明するとともに、さらに、その他微生物ゲノムに存在するST類縁化合物の生合成遺伝子群を同定し、これらも利用したコンビナトリアル生合成で新規ST類縁化合物の創製を目指した。

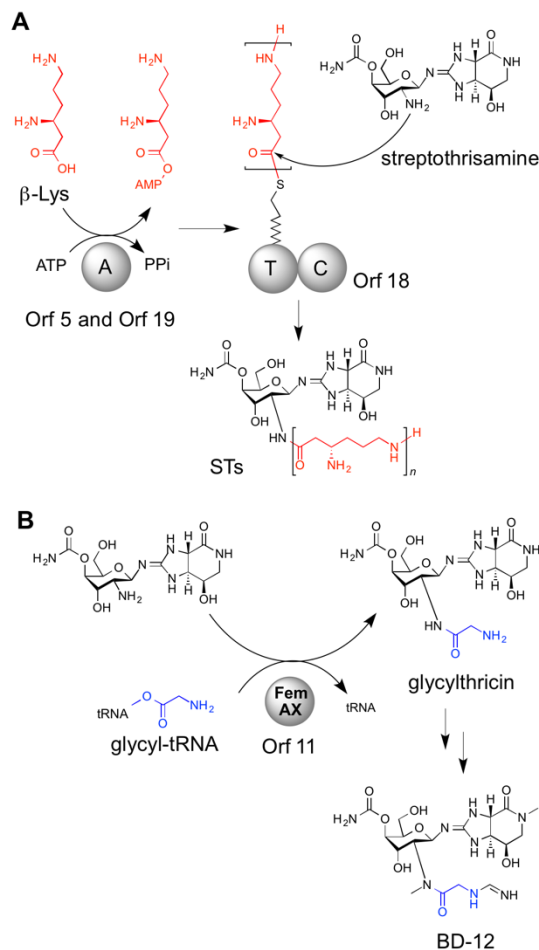


図2 ST (A) およびBD-12 (B) の生合成機構

3. 研究の方法

S. luteocolor NBRC13826のドラフトゲノム解析シーケンス

ドラフトゲノム解析は、MiSec desktop sequencer (イルミナ社)を用いて行った。500 bpのゲノムライブラリーを構築し、300 bpのペアエンド法にて約1900万リード(ゲノムサイズの約600倍)を解析した。塩基配列のアセンブルを行い、計9,298,666 bpからなる262のスカフォードを得た。BD-12生合成遺伝子クラスターを同定するために、MetaGeneAnnotatorを用い遺伝子予測を行った。

BD-12生合成遺伝子のクローニング

S. luteocolor NBRC13826のBACライブラリーを構築し、BD-12生合成遺伝子クラスター

(34 kbp) を含む BAC クローンを取得した。さらに、 $\lambda$ -RED 組換え酵素を用いた遺伝子置換法にて、BD-12 生合成遺伝子クラスター (34 kbp) を染色体組み込み型ベクターに連結した (pKU493A-BD12)。

#### BD-12 生合成遺伝子の異種発現による機能解析

pKU493A-BD12 を異種放線菌である *Streptomyces lividans* TK23 に導入し、その培養液を高分解能 ESI 質量分析 HPLC (HPLC-HR-ESI-MS) で分析した。

#### 組換え Orf11 の発現と精製

大腸菌用発現ベクター pQE30 を用い、定法にしたがって N 末ヒスタグ融合タンパク質として組換え Orf11 (rOrf11) を得た。

#### rOrf11 の酵素反応

rOrf11 の基質である aminoacyl-tRNA は、*E. coli* T7 S30 Extract System を用い調製した。50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM streptothrisamine (図 1)、1 mM グリシン (あるいは 0.5 mM タンパク性アミノ酸)、20  $\mu$ L S30 premix、15  $\mu$ L S30 extract、100  $\mu$ g/mL rOrf11 を含む酵素反応液 200  $\mu$ L を 37°C で 3 時間インキュベートした。また、RNase を加えて酵素反応も行った。反応液に等量のクロロホルムを加え、ボルテックスにて攪拌した。遠心操作にて水層画分を回収し、HPLC-HR-ESI-MS で分析した。

### 4. 研究成果

#### BD-12 生合成遺伝子クラスターの異種発現による機能解析

pKU493A-BD12 を異種放線菌である *S. lividans* TK23 に導入し、その培養液を HPLC-HR-ESI-MS で分析した。その結果、導入株において BD-12 の生産を観察したことから、クローニングした遺伝子クラスターは実際に BD12 生合成遺伝子クラスターであることを明らかにした (図 3)。

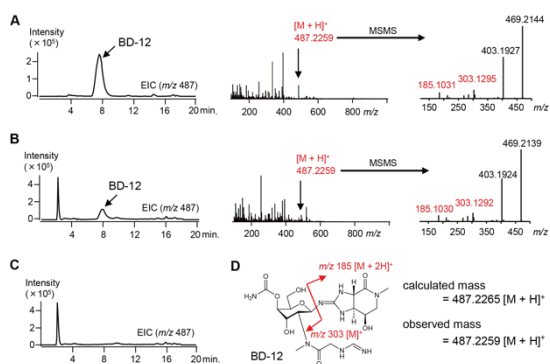


図 3 BD-12 生合成遺伝子クラスターの異種発現。(A) BD-12 標準化合物。(B) pKU493A-BD12/*S. lividans* TK23。(C) pKU493A (空ベクター) /*S. lividans* TK23。

#### rOrf11 の発現と精製

BD-12 生合成遺伝子クラスターに存在する *orf11* 遺伝子は、*femXAB* ファミリーの遺伝子に相同性を示した。*FemXAB* は、細菌のペプチドグリカン合成に関わる aminoacyl-tRNA 依存的なペプチド合成酵素として知られている。したがって、Orf11 が Gly-tRNA<sup>Gly</sup> 依存的に、生合成中間体である streptothrisamine と glycine 側鎖のペプチド結合形成を触媒すると予想した (図 2B)。そこで、Orf11 の触媒機能を明らかにするために、大腸菌で rOrf11 を調製した。可溶性画分に得られた rOrf11 は、SDS-PAGE 上で 33kDa を与え、ゲル濾過分析においては 67kDa を示したことから、本酵素はホモ二量体であることが判明した。

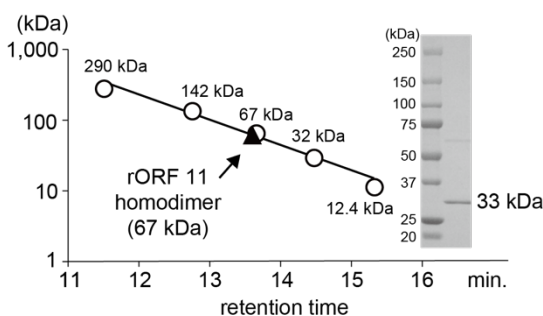


図 4 rOrf11 の酵素学的諸性質

#### rOrf11 の酵素反応

streptothrisamine、および、Gly-tRNA<sup>Gly</sup> を基質に、rOrf11 の酵素反応を行ったところ、予想通り、streptothrisamine と glycine がペプチド結合でつながった glycythricin (図 1) の生産を確認した (図 5A)。RNase を加えた酵素反応では glycythricin の生産が観察されなかったことから (図 5B)、本酵素の tRNA 依存的な反応を確認できた。

さらに、aminoacyl-tRNA に関する基質特異性を評価したところ、本酵素は、Gly-tRNA<sup>Gly</sup> に高い基質特性を示した。

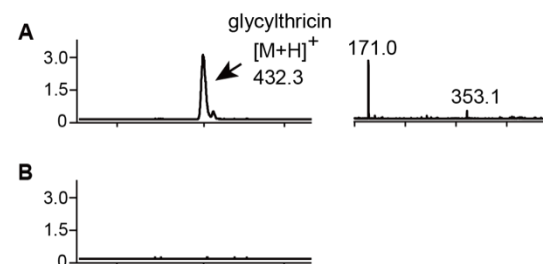


図 5 rOrf11 の酵素反応

#### Orf11 ホモログ酵素の探索

放線菌のゲノムデータベースから、Orf11 のホモログ酵素遺伝子を探索したところ、70%程度の相同性を示す遺伝子 (*sba18*) を見出した。そこで、本酵素の組換え酵素 (rSba18) を構築し、rOrf11 と同様に基質特性を評価したところ、Gly-tRNA<sup>Gly</sup> だけでなく、Ala-tRNA<sup>Ala</sup>、Ser-

tRNA<sup>Ser</sup>も基質として認識に、alanylthricinおよびserylthricinを生産した。これら化合物は新規 ST 類縁化合物であり、本研究の最終目標を計画通りに達成できた。

#### 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. C. Maruyama, H. Niikura, M. Izumikawa, J. Hashimoto, K. Shin-ya, M. Komatsu, H. Ikeda, M. Kuroda, T. Sekizuka, J. Ishikawa, Y. Hamano, tRNA-dependent aminoacylation of an amino-sugar intermediate in the biosynthesis of a streptothricin-related antibiotic, *Appl. Environ. Microbiol.*, 82, 3640-3648 (2016).

[学会発表] (計 7 件)

1. ストレプトスリシン類縁生合成遺伝子群に見出した Ala-tRNA<sup>Ala</sup>依存型ペプチド合成酵素の機能解析:松田貫暉, 丸山千登勢, 橋本絢子, 新家一男, 濱野吉十, 2016年度日本生物工学会大会, 2016年9月28日-30日, 富山国際会議場(富山県、富山市)
2. 抗生物質 BD-12 生合成に関与する N-メチル基転移酵素の機能解析:新倉春香, 丸山千登勢, 新家一男, 濱野吉十, 2016年度日本生物工学会大会, 2016年9月28日-30日, 富山国際会議場(富山県、富山市)
3. ストレプトスリシン類縁生合成遺伝子群に見出した Ala-tRNA<sup>Ala</sup>依存型ペプチド合成酵素の機能解析:松田貫暉, 丸山千登勢, 橋本絢子, 新家一男, 濱野吉十, 日本農芸化学会・中部支部・第177回例会, 2016年9月24日, 名古屋大学(愛知県、名古屋市)
4. ストレプトスリシン類縁生合成遺伝子群に見出した Ala-tRNA<sup>Ala</sup>依存型ペプチド合成酵素の機能解析:松田貫暉, 丸山千登勢, 橋本絢子, 新家一男, 濱野吉十, 2016年度日本放線菌学会大会, 2016年9月8日-9日, 東京大学(東京都)
5. BD-12 生合成における N-formimidoyl 基転移酵素の酵素学的諸性質:新倉春香, 丸山千登勢, 泉川美穂, 新家一男, 濱野吉十, 日本農芸化学会 2016年度大会, 2016年3月27日-30日, 札幌市コンベンションセンター(北海道、札幌市)
6. 抗生物質 BD-12 生合成遺伝子の機能解析:新倉春香, 丸山千登勢, 泉川美穂, 石川淳, 池田治生, 新家一男, 濱野吉十, 2015年度日本生物工学会大会, 2015年10月26日-28日, 城山観光ホテル(鹿児島県、鹿児島市)
7. 抗生物質 BD-12 生合成遺伝子の機能解析:新倉春香, 丸山千登勢, 泉川美穂, 石川淳, 池田治生, 新家一男, 濱野吉十, 2015年度日本放線菌学会大会, 2015年9月7日-8

日, 富山国際会議場(富山県、富山市)

[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:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
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

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

(2)研究分担者 ( )

研究者番号:

(3)連携研究者 ( )

研究者番号:

(4)研究協力者 ( )