

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：23401
 研究種目：若手研究(A)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22688007
 研究課題名(和文) 抗生物質ストレプトスリシン生合成酵素を利用した生理活性物質の膜透過性向上への試み
 研究課題名(英文) Improvement of the membrane permeability of compounds used by streptothricin biosynthetic enzymes
 研究代表者
 濱野 吉十 (HAMANO YOSHIMITSU)
 福井県立大学・生物資源学部・准教授
 研究者番号：50372834

研究成果の概要(和文)：放線菌によって生産される抗生物質ストレプトスリシン(ST)は、その側鎖にβリジンオリゴペプチドを有する。本研究で我々は、STの生合成に関与する3つの非リボソームペプチド合成酵素(NRPS)を同定し、ORF 5は単独型アデニル化ドメイン、ORF 18はチオレーションドメインと縮合ドメイン、ORF 19は単独型アデニル化ドメインであった。

研究成果の概要(英文)：The streptothricin (ST) antibiotics, produced by *Streptomyces* bacteria, contain L-β-lysine oligopeptides as pendant chains. In this study, we identified three unusual nonribosomal peptide synthetases (NRPSs) involved in ST biosynthesis: ORF 5 (a stand-alone adenylation (A) domain), ORF 18 (containing thiolation (T) and condensation (C) domains) and ORF 19 (a stand-alone A domain).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2012年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	17,500,000	5,250,000	22,750,000

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：NRPS、ペプチド合成酵素

1. 研究開始当初の背景

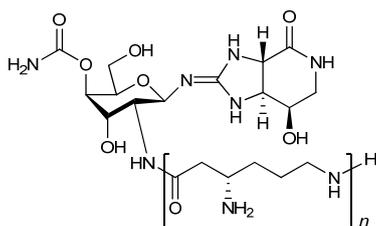
我々は、強力な抗菌活性や抗ガン活性などの有用な生理活性を示すにも関わらず、毒性のためにこれまで実用化されていない抗生物質ストレプトスリシン(ST)について、そ

の有効利用の可能性を探ってきた。STの構造に含まれ、強力なポリカチオン性を示すβ-リジンペプチド構造(1~7残基)は細胞膜の流動性にダメージを与えることで自身の細胞膜透過性を改善することで抗菌活性を発揮

すると考えられている。

2. 研究の目的

多くの天然化合物は、医薬品リード化合物の潜在能力を持っているにも関わらず、利用されないまま薬品庫に眠ったままになっている。これら化合物において、生体膜の透過性を促進させることができれば、生理活性が向上し、臨床応用につながる新たな化合物を見出すことができると考えられる。我々は、この化合物ライブラリーの質的向上に、ポリカチオン性を示すβ-リジンペプチドによる修飾が有効であると考えている。また、抗生物質耐性菌の多くが薬剤排出タンパク質の



$n = 1$, ST-F $n = 5$, ST-B
 $n = 2$, ST-E $n = 6$, ST-A
 $n = 3$, ST-D $n = 7$, ST-X
 $n = 4$, ST-C

変異によって抗生物質耐性を獲得していることを考えると、薬剤をβ-リジンペプチド化し、その透過性を高めることができれば、その抗菌活性を復活させることが可能になると考えられる。特に、耐性菌で問題になっているアミノグリコシド系抗生物質 (AGs) について、膜透過性を向上できれば、その有用性は高い。抗ガン抗生物質においても、その薬剤耐性メカニズムの多くが細胞における薬剤排出タンパク質の変異であることから、耐性メカニズムを回避する手段として、化合物の透過性を改善できる新たな方法として期待できる。

そこで、本研究では、STの生合成メカニズム、特に、β-リジンペプチドの生合成にメカニズムを解明し、それら生合成酵素の応用利用によって、化合物のβ-リジンペプチド化することを目的とする。

3. 研究の方法

すでにST生産放線菌 *Streptomyces rochei* NBRC12908 ゲノムよりST生合成遺伝子クラスター (約34Kbp) を取得しており、非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) 遺伝子が複数存在することを明らかにしている。また、本遺伝子断片を持つコスミドを異種放線菌 *Streptomyces lividans* に導入したところ、3残基以上のβ-リジンペプチドを有するSTの生産を確認したことから、本遺伝子断片 (約34Kbp) にST生合成遺伝子セットの全てが含まれていることを明らかにしている。そこで、本研究課題では、各遺伝子の破壊コスミドを

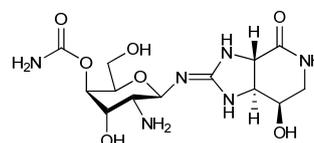
構築し *S. lividans* に導入することで、本遺伝子群に含まれる各ORFの機能解析を行った。また、得られた導入株の生成物を解析し、生合成中間体を同定すると同時に各遺伝子の機能推定と組換え酵素による解析を行った。

放線菌 *Streptomyces lavandurae* NBRC12789 は、*S. rochei* と同じくST生産菌として知られている。しかし本菌株は、*S. rochei* と異なりβ-リジン1残基を有するST-Fのみ生産することを我々は突き止めていた。したがって、*S. lavandurae* NBRC12789 由来のST生合成遺伝子群にはβ-リジンペプチド合成酵素遺伝子が存在しておらず、既得の *S. rochei* 由来ST生合成遺伝子群と比較することで、遺伝子を同定する。

4. 研究成果

STは、1943年にワックスマン博士によって *Streptomyces lavandulae* の培養液から初めて単離され、以来、数多くの放線菌から見つかっている抗生物質である。STの特筆すべき特徴は、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、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。

放線菌 *S. rochei* NBRC12908 はST-F、ST-E、ST-D、ST-Cを生産する。そこで、本菌株のゲノムライブラリーより、ST生合成遺伝子を有するコスミドを取得した。本コスミドの全塩基配列を決定したところ、4つの非リボソーム型ペプチド合成酵素 (NRPS) 遺伝子 (*orf 5*, *orf 13*, *orf 18*, *orf 19*) を含む遺伝子群が見出された。さらに、本コスミドを異種放線菌 *Streptomyces lividans* TK23 に導入したところ、ST-F、ST-E、ST-D、ST-Cを生産したことから、このゲノム断片 (32 kbp) には、STの生合成に必要な全ての遺伝子セットが含まれていることを明らかにした。さらに、これらNRPS遺伝子の破壊実験、および、組換え酵素を用いた酵素反応によって、ST生合成中間体であるストレプトスリサミンを同定するとともに、STの生合成メカニズムを次



streptothrisamine

のように明らかにした。単独型のadenylation (A)-domainであるORF5とORF19は、両者ともβ-リジンをアデニル化によって活性化するが、ORF5によって活性化されたβ-リジンだけがORF18のthiolation (T)-domainにローディングされる。興味深いことに、ORF19によって活性化されたβ-リジンは、ORF18のT-domainに結合した状態で

進行する β -リジンペプチド合成の伸長基質として直接使われ、そのペプチド合成反応は ORF19 が直接触媒する極めて興味深いメカニズムであった。これまでに様々な NRPS の A-domain が報告されているが、基質のアデニル化(活性化)だけでなく、それを直接基質として利用しペプチド結合をも合成できる A-domain は初めての例である。*S. lavandurae* NBRC12789 は、 β -リジン 1 残基を有する ST-F のみ生産する放線菌であり、本菌株から ST 生合成遺伝子クラスターを取得したところ、ORF19 のホモログ遺伝子は認められなかった。

T-domain 上で伸長した β -リジンペプチドは、ORF18 の condensation (C)-domain の触媒により ST 生合成中間体ストレプトスリサミンと縮合し、ST として ORF18 からリリースされる。例えば、ORF18 の T-domain に 4 残基の β -リジンペプチドが結合した時に、C-domain によってストレプトスリサミンとの縮合が起これば、ST-C が生成する。すなわち、ST 上の β -リジンペプチドの鎖長は、どのタイミングで C-domain がストレプトスリサミンと β -リジンペプチドの縮合を触媒するかで決まる。他方、T-domain 上での β -リジンペプチドの鎖長は、ORF19 の触媒回数によって決まる。言い換えれば、ORF19 の反応が早いのか、あるいは、ORF18 の C-domain の反応が早いのかで ST の β -リジンペプチドの鎖長が決まる、いい加減なメカニズムと言える。実際、C-domain の触媒アミノ酸残基に部位特異的変異を導入し活性を弱めた変異型酵素(Q288A)を用いて反応では、C-domain によるストレプトスリサミンと β -リジンペプチドの縮合のタイミングが遅れ、より長い β -リジンペプチド鎖長を有する ST が生産された。

ORF5 と ORF19 の基質特異性を評価したところ、 β -リジンの構造アナログである β -ホモリジンも基質になることが判明した。そこで、基質として β -ホモリジン、ストレプトスリサミン、そして 3 つの酵素 ORF5、ORF18、ORF19 にて酵素反応を行ったところ、ストレプトスリサミンに β -ホモリジンが 1~3 残基結合した新規 ST 類縁化合物 ST-hF、ST-hE、ST-hD が合成された。また、最近、ORF19 はアミノグリコシド系抗生物質であるカナマイシンとアミカシンの β -リジン化を触媒することを見出した。

さらに興味深いことに、T-domain 上で伸長した β -リジンペプチドがストレプトスリサミンの代わりに H_2O と反応した場合、 β -リジンペプチドのみの構造としてリリースされる。さらに、リリースされた β -リジンペプチドは ST の生合成に利用されることは無く、*in vitro* の反応で創製された新規 ST 類縁化合物であった。最近我々は、各種 ORF18 の変異型酵素を用いた研究において、この反

応は ORF18 の C-domain によって触媒されるのではなく、非酵素的な加水分解反応で進行すること明らかにした。さらに、 H_2O だけでなく、グリセロール、トリスとも反応しこれら化合物とのエステル体も生成することを明らかにしている。

ST の β -リジンペプチドは ST の生理活性に重要な役割を有していることから、 β -リジンペプチドのみの構造が有する生理活性には、大変興味を持たれた。また、生合成中間体であるストレプトスリサミンの生理活性、さらには、*in vitro* の反応で創製された新規 ST 類縁化合物の生理活性は大変興味深い。そこで、本研究で創製できた新規化合物のうち単離精製できた化合物についてその生理活性を評価した。その結果、ストレプトスリサミンは、原核・真核細胞ともに全く抗菌活性を示さないことが判明し、強毒性として知られる ST の生理活性には、1 残基以上の β -リジンが必要であることを初めて明らかにした。ST-hF は、ST-F と同程度の生理活性を示し、真核生物への毒性は緩和されていなかった。その一方で、6 残基からなる β -リジンペプチドのみの構造においては、*Bacillus subtilis* に対して特異的な抗菌活性を示した。

現在、本研究課題の最終目標である種々化合物の β -リジンペプチドを可能にする ORF5、ORF18、ORF19 の変異型酵素の構築を進めているところである。研究期間内に計画した最終目標を達成するところまであと一歩ではあったが、ST の生合成メカニズムを解明した研究成果は国内外で高く評価された(5. 主な発表論文等を参照)。

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 3 件)

- ① 濱野吉十ほか、NRPSs and amide ligases producing homopoly(amino acid)s and homooligo(amino acid)s, Natural Product Reports, In press、査読あり、DOI:10.1039/C3NP70025A
- ② 濱野吉十、抗生物質ストレプトスリシンの修飾酵素と生合成酵素による毒性緩和、バイオサイエンスとインダストリー(財団法人バイオインダストリー協会), Vol. 71, No. 1, p32-35 (2013), 査読あり、http://www.jba.or.jp/pc/archive/2013/vol71_nol.html
- ③ Chitose Maruyama, Junya Toyoda, Yasuo Kato, Miho Izumikawa, Motoki Takagi, Kazuo Shin-ya, Hajime Katano, Takashi Utagawa, and Yoshimitsu Ham

ano, A stand-alone adenylation domain forms amide bonds in streptothricin biosynthesis, Nature Chem. Biol., 8, 791-797 (2012), 査読あり, DOI:10.1038/nchembio.1040

[学会発表] (計 16 件)

- ① 濱野吉十ほか、Streptothricin (ST) 生合成酵素群を利用した新規化合物の創製、日本生物工学会、2012 年 10 月 23 日、神戸
- ② 濱野吉十、A stand-alone adenylation domain catalyzes multiple amide-bond formation in streptothricin biosynthesis、Directing Biosynthesis III、2012 年 09 月 19 日、Nottingham (UK)
- ③ 濱野吉十ほか、Streptothricin (ST) 生合成酵素群を利用した新規 ST 類縁化合物の創製、日本放線菌学会、2012 年 09 月 06 日、東京
- ④ 濱野吉十、A stand-alone adenylation domain catalyzes multiple amide-bond formation in streptothricin biosynthesis、Society of Industrial Microbiology and Biotechnology (SIMB) 2012 meeting (招待講演)、2012 年 08 月 12 日、Washington DC (US)
- ⑤ 濱野吉十、ホモポリアミノ酸構造を有する天然生理活性物質の生合成機構と有用物質生産への展開、第 2 回生合成マシナリー札幌セミナー (招待講演)、2012 年 05 月 24 日、札幌
- ⑥ 丸山千登勢ほか、Streptothricin (ST) 生合成における非リボソームペプチド合成酵素の機能解析、日本農芸化学会、2012 年 3 月 24 日、京都
- ⑦ 濱野吉十、ホモポリアミノ酸構造を有する天然生理活性物質の生合成機構と有用物質生産への展開、東京大学薬学部講演会 (招待講演)、2012 年 2 月 9 日、東京
- ⑧ 丸山千登勢ほか、Unusual Nonribosomal Peptide Synthetase Involved in the Biosynthesis of a Classic Antibiotic, Streptothricin、International Symposium on the Biology of Actinomycetes、2011 年 12 月 12 日、Puerto Vallarta (Mexico)
- ⑨ 丸山千登勢ほか、Streptothricin (ST) 生合成酵素群を利用した新規化合物の創製、日本生物工学会、2011 年 9 月 27 日、東京
- ⑩ 丸山千登勢ほか、Streptothricin (ST) 生合成酵素群を利用した新規化合物の創製、日本放線菌学会大会、2011 年 9 月 8 日、札幌
- ⑪ 丸山千登勢ほか、Streptothricin (ST)

生合成遺伝子群の機能解析、日本農芸化学会、2011 年 3 月 5 日、学会中止のため要旨集にて発表

- ⑫ 豊田順也ほか、 β -リジンホモオリゴマー (β -LO) 生産放線菌の構築、日本農芸化学会、2011 年 3 月 5 日、学会中止のため要旨集にて発表
- ⑬ 濱野吉十ほか、Unusual non-ribosomal peptide synthetases producing amino-acid homopolymers、2010 年 12 月 16 日、ハワイ (アメリカ)
- ⑭ 丸山千登勢ほか、Identification of the peptide synthetase involved in the Streptothricin biosynthesis、Pacifichem 2010、2010 年 12 月 17 日、ハワイ (アメリカ)
- ⑮ 濱野吉十、ホモポリアミノ酸構造を有する天然生理活性物質の生合成機構と有用物質生産への展開、東京大学生物生産工学研究センターシンポジウム、2010 年 12 月 8 日、東京大学
- ⑯ 丸山千登勢ほか、Streptothricin (ST) 生合成を担う新規非リボソームペプチド合成酵素、日本生物工学会、2010 年 10 月 28 日、宮崎市

[その他]

ホームページ等

<http://www.s.fpu.ac.jp/hamano/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱野 吉十 (HAMANO YOSHIMITSU)

福井県立大学・生物資源学部・准教授

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：