

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 lariat in

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 synthesized by Gram positive *Rhodococcus jostii*. The compounds are unique cyclic peptides, the rigid lasso structure. Production of lariatins in *R. jostii* is dependent upon a five-gene cluster, *larA* to *larE*. We established a simple system of amino acid substitutions of lariat in by *R. jostii* delta *larA*. Using this system, mutational scanning of lariat in was carried out. The results showed that three aa residues (G1, R7 and E8) in the circle and three aa residues (W9, V10 and G11) in the threaded segment of the tail are important for lariat in 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

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 pDEL*larA* 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 (*lariat*in A-6xHis, *lariat*in B-6xHis) では LC/MS によりラリアチン A が検出された。

ラリアチン生産菌の無細胞抽出液を用いたラリアチンの合成

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* 欠損株の無細胞抽出液を混合し、30 分で反応させたのち、反応液を 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は *LarD* 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* がコードする環状構造を形成するアミダーゼ反応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

シーケ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ケンサーで読み、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.jostii* 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) Inokoshi J, Matsuhama M, Miyake M, Ikeda H, Tomoda H. Molecular cloning of the gene cluster for lariatins biosynthesis of *Rhodococcus jostii* K01-B0171. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012 95:451-460 (2012) 査読有

〔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) 猪腰淳嗣, 供田 洋 抗結核活性を示す放線菌由来投げ縄ペプチド・lariatins 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

(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