

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2013

課題番号：25892008

研究課題名(和文)新規作用機序の抗生物質開発を目的としたゴードスポリン耐性化機構の解明

研究課題名(英文)Studies on the mechanism for goadsporin resistance

研究代表者

尾崎 太郎(Ozaki, Taro)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：40709060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円、(間接経費) 330,000円

研究成果の概要(和文)：ゴードスポリンは放線菌の生育を阻害する抗生物質である。既存の薬剤と異なる分子を標的とすることが示唆されていたため、ゴードスポリンの作用機構の解明により、新たな抗生物質の開発が可能になると期待されていた。本研究では、ゴードスポリンの作用機構を明らかにすることを目的として研究を行った。ゴードスポリンの標的であると考えられたFfhと、ゴードスポリン耐性型FfhホモログであるGodIについて大腸菌を宿主として組換え蛋白質を調製することに成功した。X線結晶構造解析を目的として結晶化条件のスクリーニングを行い、結果としていくつかの条件で微結晶状のサンプルを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Goadsporin is an antibiotic which inhibits the growth of actinomycetes. As the molecular target of goadsporin was proposed to be unprecedented, it was expected that the characterization of the mechanism of goadsporin action would lead to the development of drugs which possessed novel mechanism of action. This study aimed to reveal the mechanism of goadsporin action. Ffh, a possible target of goadsporin was successfully expressed as a soluble protein in Escherichia coli. GodI, a goadsporin-resistant Ffh homologue was also obtained as a recombinant protein. Using recombinant Ffh and GodI, crystallization experiments were performed. As a result, microcrystal-like objects were obtained in some conditions.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用微生物学

キーワード：抗生物質

## 1. 研究開始当初の背景

抗生物質には、その使用に伴って薬剤耐性菌が出現するという問題点が存在する。それらの薬剤耐性菌は、もとの薬剤と同じ作用機構を有する類縁の薬剤に対しても耐性を示すため、耐性菌を駆逐するためには既存の薬剤とは作用標的が異なる新たな薬剤の開発が求められる。

上記のような問題の解決を目的として、本研究では放線菌 *Streptomyces* sp. TP-A0584 株の生産するペプチド系抗生物質であるゴードスポリンを対象として研究を行った。ゴードスポリンは、放線菌に対して孢子形成などの形態分化、および二次代謝産物の生産を誘導する活性を指標として単離された化合物である。本化合物は低濃度では *Streptomyces lividans* をはじめとした様々な放線菌に対して色素生産や孢子形成を誘導する活性を示すが、より高い濃度ではその生育を阻害する活性を有することも報告されていた。

その後、ゴードスポリンの生合成遺伝子群が生産菌である TP-A0584 株からクローニングされた。各生合成遺伝子の機能予測の結果から、本化合物の生合成機構が以下のように推測された。初めに、*godA* 遺伝子にコードされた前駆体ペプチドが蛋白質と同じようにリボソームによって合成される。その後、リーダー配列の切断やアゾール環の形成、デヒドロアミノ酸の形成や N 末端のアセチル化など、種々の修飾反応を受けることで最終産物であるゴードスポリンが生合成される。

生合成遺伝子に加えて、生合成遺伝子群の近傍には、*godI* 遺伝子も見出された。ゴードスポリンに感受性を示す *S. lividans* に *godI* 遺伝子を導入することでゴードスポリン耐性を獲得することから、*godI* はゴードスポリンの生合成遺伝子ではなく、生産菌における自己耐性遺伝子であることが明らかとなった。*godI* 遺伝子は、Signal Recognition Particle (SRP) を構成する蛋白質である Ffh をコードしていた。そのことからゴードスポリンが SRP を標的として活性を發揮することが示唆されていた。

SRP は生物に普遍的に存在する核酸蛋白質複合体である。N 末端にシグナルペプチドを有する蛋白質の翻訳の過程で、リボソームによってシグナルペプチド部分が翻訳されると、その配列を認識して結合し、翻訳を一時停止させる。その後、膜上に存在する SRP 受容体と相互作用することで、翻訳途中の蛋白質とリボソームの複合体を膜上へと局在させる。SRP が解離した後、翻訳が再開されることで、分泌蛋白質や膜局在蛋白質が正しい位置に局在することが可能となる。原核生物における SRP は 4.5S RNA と Ffh により構成されることが知られていた。

このように SRP は細胞内の蛋白質局在化において重要な役割を担うため、これまでに盛んに研究が行われてきた。しかしながら、

これまでに SRP を標的とする薬剤については報告がなく、抗生物質の作用標的としては考えられてこなかった。そのため、ゴードスポリンが SRP を標的として抗菌活性を發揮する機構を明らかにすることができれば、既存の薬剤とは異なる作用機構を有する新たな抗生物質の開発が可能になると期待された。

また、高濃度における抗菌活性に加えて、低濃度においてゴードスポリンが放線菌に対して形態分化や二次代謝産物の生産を誘導する機構も興味深い。放線菌はストレプトマイシンやエバームクチンをはじめとした、様々な抗生物質の単離源として重要な微生物群である。近年急速に進展しているゲノム解析の結果から、1 株の放線菌のゲノム上には数十の二次代謝産物生合成遺伝子群が存在することが明らかになった。一方で、多くの場合実験室における培養条件下ではそれらの遺伝子群に由来する化合物がすべて生産されるわけではなく、ごく一部しか同定することができていないため、多くの生合成遺伝子群は休眠状態にあると考えられる。ゴードスポリンは *S. lividans* に対する色素生産を誘導することから、休眠二次代謝産物の生産誘導活性を有していることが期待される。この機構を解明することで、放線菌に由来する新規有用物質探索のための新たな方法論を構築できることも期待された。

## 2. 研究の目的

背景で述べたように、ゴードスポリンは SRP の構成タンパク質である Ffh を標的として作用することが、これまでの遺伝学的な解析により示唆されていた。これまでに、Ffh を作用標的とする抗生物質は報告されていないことから、ゴードスポリンの作用機構、およびその耐性化機構を明らかにすることで既存の薬剤とは異なる新たな作用機序を有する抗生物質の開発が可能になると期待される。それに加えて、放線菌に対して形態分化や二次代謝産物の生産を促す活性にも興味を持たれるため、ゴードスポリンの作用機構の解明は、新規有用物質探索のための新たな方法論の構築にもつながると期待される。しかし、前述した遺伝学的な解析の他にはゴードスポリンが Ffh を標的とすることの直接的な証拠は報告されておらず、作用機構の詳細については不明であった。本研究では、ゴードスポリンの作用標的が Ffh であることを X 線結晶構造解析により直接的に示すことを目的に研究を行った。

ゴードスポリン生産菌である TP-A0584 株は二つの Ffh を有している。一つが放線菌間で保存されている Ffh (以下 Ffh)、もう一つがゴードスポリン耐性遺伝子にコードされている GodI である。このように 2 種類の Ffh が TP-A0584 株に存在することから、ゴード

スポリンによる生育阻害などの活性は、ゴードスポリンが Ffh に直接結合し、その機能を阻害したことによるものであると推測された。そして、ゴードスポリンに耐性を示す TP-A0584 株では、ゴードスポリンによって Ffh が阻害されている状況でも、GodI がその機能を代替することで生育が可能となるという耐性化機構を推測することもできた。仮説が正しければ、ゴードスポリンは Ffh とは複合体を形成する一方で、GodI とは複合体を形成しないと考えられる。本研究では、TP-A0584 株由来の Ffh、および GodI の組換え蛋白質を調製し、それぞれの蛋白質の X 線結晶構造解析によりゴードスポリンとの相互作用を直接的に示すことを目的として研究を行った。両者の立体構造を比較することで、ゴードスポリンの耐性化、作用機構に関する知見を得ることができると期待された。

### 3. 研究の方法

X 線結晶構造解析を行うには、可溶性蛋白質を安定、かつ大量に調製することが必要である。これまでに行われた予備実験の結果から、TP-A0584 株の *ffh*、および *godI* 遺伝子を直接利用した大腸菌を宿主とした発現系では、可溶性の組換え蛋白質を大量に調製することは困難であることが示唆されていた。しかし、遺伝子操作が簡便であることや培養のスケールアップが容易であることから、大腸菌を利用した蛋白質発現系の構築の利点は大きいと考えられた。放線菌の遺伝子配列中のグアニン (G) やシトシン (C) の含有量は約 70% と高く、大腸菌とは大きく異なることが知られている。この G+C 含量の差や各アミノ酸に対応するコドンの使用頻度の違いが、大腸菌を宿主とした組換え蛋白質の調製を困難にしている原因であると考えられた。そのため、G+C 含量やコドンの使用頻度を大腸菌に最適化した合成遺伝子を利用して、大腸菌を宿主とした組換え蛋白質の発現を試みることとした。蛋白質にはアフィニティー精製が可能となるようにヒスチジンタグを付加した。

蛋白質の大量かつ安定に発現できる培養系を構築した後、蛋白質の精製を行った。蛋白質の精製には、ヒスチジンタグを利用したアフィニティークロマトグラフィーやゲル濾過クロマトグラフィーを利用する。最終的な目的は組換え蛋白質の結晶構造解析であるので、各精製段階で SDS-PAGE などを利用してサンプルの精製度を確認しながら精製を進める。必要に応じて、前述の方法以外にもイオン交換クロマトグラフィーなど、分離モードの異なるクロマトグラフィーを組み合わせるなどして、純度の高い精製蛋白質を調製する。

精製した蛋白質を用いて、蛋白質の結晶化実験を行った。結晶化条件の検討にはハンプトンリサーチ社から発売されている Crystal Screen I、および Crystal Screen II、Emerald Biosystems 社から発売されている Wizard などの結晶化キットを参考に調製した沈殿剤溶液を使用した。蛋白質の結晶化には、ハンギングドロップ、およびシッティングドロップによる蒸気拡散法を用い、20 度で結晶の成長を試みた。顕微鏡下での観察を続け、微結晶状のサンプル、および結晶化の傾向が見られたサンプルについては沈殿剤濃度、および pH 条件の検討を行い、結晶の成長を試みた。

### 4. 研究成果

大腸菌用に遺伝子配列を最適化した合成遺伝子を利用し、組換え蛋白質の発現を試みた。条件検討を行い、結果として、*Escherichia coli* BL21(DE3) を宿主として N 末端、および C 末端にヒスチジンタグを付加した Ffh、および GodI 組換え蛋白質を可溶性画分に発現することに成功した。これらの蛋白質のうち C 末端にヒスチジンタグを付加した組換え蛋白質を以下に示す精製、結晶化実験に供した。

発現したそれぞれの蛋白質をアフィニティークロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、およびゲル濾過クロマトグラフィーを利用することでほぼ単一の蛋白質を精製することにも成功した。精製蛋白質は  $10 \text{ mg ml}^{-1}$  以上の高濃度に濃縮することが可能であった。また、精製蛋白質を SEC-MALS 解析に供したところ、溶液中で各精製蛋白質が単量体として存在することが示唆された。ピークが単一であり、均質な蛋白質溶液が調製できたと判断できたため、結晶化実験に供した。

Ffh、および GodI の組換えタンパク質を結晶化実験に供した。結晶化実験に供した。20°C で観察を続けたところ、いくつかの条件で微結晶状のサンプルを得ることができた。また、蛋白質の沈殿の傾向を観察することで結晶化に適していると推測される沈殿剤の種類等を絞り込むことができた。それらの条件を参考に、緩衝液の pH や沈殿剤の種類や濃度などを検討し、結晶化条件の最適化を試みたが、現在のところ結晶構造解析が可能な結晶は得られていない。N 末端にヒスチジンタグを付加した蛋白質やタグを除去した蛋白質での結晶化の検討や、タグの種類や宿主などの蛋白質の発現・精製条件の再検討も含めてさらなる条件の最適化が必要であると考えられるが、本研究によって沈殿剤による沈殿・結晶化の傾向など今後結晶化実験を継続するうえで参考となる知見を得ることができた。

## 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

尾崎太郎, 浅水俊平, 尾仲宏康、「二次代謝誘導物質ゴードスポリン耐性化機構の解析」,  
2013年度(第28回)日本放線菌学会大会、  
メルパルク広島、広島市、2013/9/5, 6

〔その他〕

ホームページ等

微生物潜在機能探索寄付講座ホームページ  
<http://microbial-potential.bt.a.u-tokyo.ac.jp/>

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

尾崎 太郎 (OZAKI, Taro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・  
特任助教

研究者番号：40709060

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし