

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850043

研究課題名(和文)ゴードスポリン作用機構の解明と新規類縁体の創製

研究課題名(英文)Studies on the mechanism of action of goadsporin and generation of new derivatives

研究代表者

尾崎 太郎(Ozaki, Taro)

東京大学・農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号：40709060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ゴードスポリンはStreptomyces sp. TP-A0584株の生産する二次代謝産物であり、放線菌に対して抗菌活性や、形態分化と二次代謝の誘導活性を示す。これまでにゴードスポリンはFfhを標的とする前例のない機構で作用することが示唆されていたが、その詳細は不明であった。本研究では、Ffh蛋白質の結晶構造解析を目指し、結晶化条件のスクリーニングを行った。また、組換え蛋白質を用いたプルダウンアッセイや表面プラズモン共鳴によって、ゴードスポリンとFfhの相互作用を解析し、ゴードスポリンがFfhに結合することを生化学的に示した。これらの結果より、ゴードスポリンがFfhを標的とすることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Goadsporin is a secondary metabolite produced by Streptomyces sp. TP-A0584, which shows antibiotic activity against actinomycetes. Goadsporin is also known as an inducer of morphogenesis and secondary metabolism in actinomycetes. Previously, it was suggested that goadsporin targeted Ffh, which is an unprecedented target of antibiotics. However, the details of the mechanism of action remains to be elucidated. In this study, to reveal the mechanism of action of goadsporin, crystallization of Ffh was examined. Biochemical assays, including pull-down assay and surface plasmon resonance, were also performed to analyze the interaction between Ffh and goadsporin. As a result, goadsporin showed interaction with Ffh in both assays. These results suggested that the molecular target of goadsporin was Ffh.

研究分野：農芸化学

キーワード：抗生物質

1. 研究開始当初の背景

抗生物質は感染症を克服するうえで重要な役割を果たしてきたが、一方でその使用に伴う薬剤耐性菌の出現は近年における深刻な問題である。ある抗生物質に対する耐性菌は同じ分子を標的として作用する類縁の薬剤にも耐性を示すため、これらの薬剤耐性菌の駆逐には既存のものとは作用標的の異なる新たな薬剤が必要とされる。

本研究では、既存の薬剤と異なる作用機序の抗生物質として期待されるゴードスポリンに着目した。ゴードスポリンは放線菌 *Streptomyces* so.TP-A0584 株が生産する二次代謝産物であり、アゾール環や脱水アミノ酸、N末端のアセチル基等により高度に修飾されたペプチド骨格を有している。本化合物は低濃度で孢子形成などの形態分化や、二次代謝産物の生産を誘導する活性をしめす。さらに、より高い濃度では抗菌活性を示すことも知られていた。

これまでの研究から、ゴードスポリンの生合成遺伝子クラスターが同定されている。各生合成遺伝子の機能予測の結果から、本化合物が *godA* 遺伝子にコードされた前駆体ペプチドの転写・翻訳による合成と、前駆体ペプチドの翻訳後修飾によって生合成されることが明らかにされていた。

また、生合成遺伝子群の近傍には、TP-A0584 株における自己耐性遺伝子として *godI* が見出されていた。*godI* は Signal Recognition Particle (SRP) の構成蛋白質である Ffh 蛋白質をコードしている。通常の放線菌は *ffh* 遺伝子を 1 コピーしか有していないが、Tp-A0584 株は例外的に通常の *ffh* に加えて *godI* を有している。このことから、ゴードスポリンが Ffh を標的とし、その機能を阻害すること、およびゴードスポリン生産菌である TP-A0584 株においてはゴードスポリン耐性型 Ffh である GodI が、Ffh の機能を代替することで耐性を獲得していることが示唆されていた。

以上のようにゴードスポリンは Ffh を標的とすることが示唆される。これまでに SRP やその構成蛋白質を標的とする薬剤は報告されていないため、ゴードスポリンは新たな作用機構の薬剤であると考えられる。また、ゴードスポリンは放線菌に選択的に作用するが、SRP は放線菌のみならず、生物に普遍的に存在することが知られているゴードスポリンの作用機構を明らかにすることで、特定の病原菌の SRP を標的として選択的に作用する新たな薬剤の開発が可能になるとも期待される。

2. 研究の目的

研究の背景で述べたように、ゴードスポリンは Ffh を標的とした新規の機構で作用する薬剤であることが期待される。これまでに *godI* 遺伝子破壊株がゴードスポリン耐性を

失うこと、および *godI* 遺伝子の導入によって異種放線菌 *Streptomyces lividans* がゴードスポリン耐性を獲得することが示されている。しかしながら、これらの遺伝学的な実験の他にゴードスポリンが Ffh を標的とすることを示唆する結果は得られていなかった。そこで、本研究ではゴードスポリンの作用標的が Ffh であることを結晶構造解析や、生化学的な実験による相互作用解析等によって、より直接的に示すことを目的とした。さらに得られた知見に基づき、新規作用機序を有する抗生物質を創製することを目指した。

3. 研究の方法

これまでの研究によって Ffh や GodI の組換え蛋白質を大腸菌で発現し、アフィニティークラムやイオン交換カラム、ゲル濾過カラムなど複数のカラムクロマトグラフィーにより精製する方法を確立していた。そこで同様の方法により精製蛋白質を得て、以降の実験に供した。

Ffh および GodI 組換え蛋白質の結晶構造解析を行い、両者の立体構造を比較することでゴードスポリン耐性に寄与する構造の違いを明らかにすることができると考えられる。また、Ffh とゴードスポリンの共結晶構造を得ることができれば、ゴードスポリンの結合部位や結合様式から、その作用機構が明らかになるとも期待される。そこで、Ffh と GodI 単独での結晶化、および Ffh とゴードスポリンの共結晶化を目指し、結晶化条件のスクリーニングを行った。

また、精製蛋白質を用いたプルダウンアッセイによって、ゴードスポリンと Ffh 蛋白質の相互作用を検証した。はじめに Ffh、および GodI の精製蛋白質をゴードスポリンと混合し、アフィニティー担体に結合させた。十分な洗浄操作後、担体に結合した蛋白質を溶出させた。続いて、溶出画分を LC-MS により分析し、各画分に含まれるゴードスポリンを分析した。表面プラズモン共鳴によっても、Ffh や GodI と、ゴードスポリンの相互作用を検証した。

さらに、既に構築されている *godI* の異種発現系を利用することでも、ゴードスポリン作用機構の解析を進めた。GodI は、Ffh に対してアミノ酸配列の比較で約 80% と高い相同性を示すことがわかっている。そのため、両者のわずかな違いがゴードスポリン耐性化に寄与していると考えられる。そこで、GodI におけるいくつかのアミノ酸残基を Ffh と同一のものとなるよう変異を導入した変異型 *godI* 遺伝子を作製し、放線菌 *S. lividans* に導入した。得られた形質転換体のゴードスポリン耐性の強さを、*godI* 導入株のものと比較することでゴードスポリン耐性への寄与を試験した。

上記のようなゴードスポリンと Ffh の相互作用解析に加えて、ゴードスポリン生合成変

異株の代謝産物を解析し、その生合成経路についても解析した。

4. 研究成果

精製蛋白質を用いて結晶化条件のスクリーニングを行ったが、Ffh、GodI 単独での結晶化、Ffh とゴードスポリンの共結晶化、いずれの条件でも結晶を得ることはできなかった。補酵素アナログを添加した際の蛋白質安定化の検討等条件検討を行い、いくつかの添加剤によって蛋白質が安定化することが示唆された。そのため、今後はそれらの添加剤を用いたスクリーニングを行うことで、結果が改善することが期待される。

アフィニティー担体を用いたプルダウンアッセイを行った結果、GodI の溶出画分にはゴードスポリンがほとんど検出されない一方で、Ffh の溶出画分にはゴードスポリンが顕著に検出されることが明らかとなった。この結果より、ゴードスポリンが Ffh に特異的に結合することが強く示唆された。

そこで、表面プラズモン共鳴を測定し、Ffh 蛋白質とゴードスポリンが強い相互作用を示すことを明らかにした。同様の条件で GodI とゴードスポリンの相互作用も検証したところ、相互作用が観察されなかったことから、ゴードスポリンは Ffh を特異的に標的とすることが明らかになった。

GodI のいくつかのアミノ酸残基を Ffh と同一のものとなるよう変異を導入し、変異型 *godI* 遺伝子を作製した。作製した遺伝子を放線菌 *S. lividans* に導入したところ形質転換体のゴードスポリン耐性が *godI* 導入株と比較して弱いことが分かった。これらの結果から、変異を導入した残基がゴードスポリン耐性に重要であることが明らかになった。プルダウンアッセイや表面プラズモン共鳴の結果から、ゴードスポリンが Ffh に直接結合することが明らかになったため、これらの残基の周辺がゴードスポリンの結合部位であることが示唆される。

以上の結果から、ゴードスポリンが Ffh に直接結合することを生化学的に示し、またその結合部位についても示唆を得ることができた。これまでに Ffh を標的とする薬剤は報告されていないことから、新規の抗生物質の開発を考える上で本成果は重要な知見となり得ると考えられる。本研究では結晶構造解析には成功しなかったが、蛋白質の安定化に寄与する添加剤について知見が得られたため、それらを利用することで今後結晶化については改善が期待される。今後結晶構造を明らかにすることができれば、ゴードスポリンの作用機構についてより詳細な部分が明らかになり、新たな薬剤の開発へ生かされると考えられる。

また、*S. lividans* を宿主としたゴードスポリン異種発現株をもとに作製されたゴードスポリン生合成変異株の代謝産物を分析

し、*godF* 遺伝子破壊株と *godG* 遺伝子破壊株より新規ゴードスポリン類縁体であるゴードスポリン B を同定した。さらに、*godG* 破壊株からはゴードスポリン C も同定した。これらの化合物を質量分析や NMR によって構造決定した。2 株に共通して見られたゴードスポリン B においてはゴードスポリンに 2 残基存在するデヒドロアラニンが形成されておらず、本来デヒドロアラニンに変換されるセリン残基が未修飾であった。このことから、GodF と GodG によってセリン残基がデヒドロアラニンへと変換されることが明らかとなった。ゴードスポリン C においては、2 つのセリン残基のうち一つがグルタミル化された構造であることが明らかとなった。これにより、デヒドロアラニンの形成がセリン残基のグルタミル化とグルタミン酸の脱離を介して進行することが強く示唆された。同様の反応には先例があるが、グルタミル化された化合物の構造は本研究により初めて明らかとなった知見であり、ゴードスポリンや類縁の化合物の生合成機構に関して重要な知見が得られた。さらに、ゴードスポリン B の生物活性を調べたところ、ゴードスポリンのような抗菌活性や、形態分化や二次代謝の誘導活性を示さなかった。このことから、デヒドロアラニンがそれらの活性に重要な構造であることが示唆された。これらの知見は今後のゴードスポリン類縁体創製の上で重要な知見となると考えられる。

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)

Ozaki T., Kurokawa Y., Hayashi S., Oku N., Asamizu S., Igarashi Y., and Onaka H., "Insights into the biosynthesis of dehydroalanines in goadsporin" *Chembiochem*, 査読有, Vol. 17, 218-223, 2016, doi: 10.1002/cbic.201500541.

[学会発表](計 5 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作用機構の解析」日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 28 日、札幌コンベンションセンター(北海道)

Ozaki T., Asamizu S., and Onaka H., "Goadsporin, a peptidic natural product which induces secondary metabolism in actinomycetes" *Pacificchem2015*, 2015 年 12 月 17 日、Honolulu(米国)

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作用機構の解析」、第 30 回日本放線菌学会、2015 年 9 月 8 日、富山国際会議場(富山県)

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の作用機構の解析」、日本農芸化学会大会 2015 年度大会、2015 年 3 月 27 日、岡山大学（岡山県）

Ozaki Y., Asamizu S., Onaka H., "Characterization of the mechanism for the goadsporin self-resistance", Natural Product Discovery and Development in the Post Genomic Era、2015 年 1 月 11 日、SanDiego (米国)

〔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