

細菌感染症の克服を志向した新しい抗生物質の

発酵生産技術の確立

静岡大学大学院農学領域

小谷 真也

1. はじめに

微生物によって生産される抗生物質には、生合成の多様性により生み出される様々な構造の化合物が知られている。その中でもペプチドは大きな一群である。さらにペプチドの中でも、リボソーム合成翻訳後修飾ペプチド (RiPP) のランチペプチドは、ランチオニン (Lan)/メチルランチオニン (MeLan) などの珍しいアミノ酸を含む天然ペプチドで、非常に大きなグループである^{1,2}。ランチペプチドの生合成中、線状前駆体ペプチドが最初にコード遺伝子からリボソーム合成される。前駆体ペプチドには、N 末端リーダーペプチドと、Lan または MeLan の形成に参与する可能性のあるいくつかの Cys および Ser/Thr を含む C 末端コアペプチドを有する。リーダーペプチドには、修飾および細胞外輸送に参与する処理酵素の認識に必要なモチーフ配列がある。コアペプチドは、(第 1 段階) Ser/Thr 残基の脱水によるコアペプチドのデヒドロアラニン (Dha) /デヒドロブチリン (Dhb) の生成、および(第 2 段階) Cys 残基と脱水アミノ酸 (Dha/Dhb) 間のチオエーテル架橋による Lan/MeLan 環の形成という 2 段階で修飾される。現在までに、ランチペプチドは生合成経路に応じて 5 つのクラス (クラス I から V) に分類されている。クラス III ランチペプチド SapB は、放線菌 *Streptomyces coelicolor* の気胞糸を誘導する形態形成因子として単離された。生合成において、クラス III ランチペプチド合成酵素 RamC は 2 ユニットの Lan を形成する。基質ペプチドと合成酵素 CurKC を用いた生合成の *in vitro* 再構成により、同様のランチオニン含有ランチペプチドであるカーボペプチンが産生された。ラビリンスペプチン A1、A2、A3 は、ラビオニン (Lab) と名付けられた珍しいアミノ酸を分子内に含む最初のクラス III ランチペプチドであった。Lab は、修飾酵素 LabKC の機能により、Cys ユニットと 2 つの Dha ユニットを橋渡しすることによって生合成される 4 級 α,α -二置換アミノ酸である。クラス III ランチペプチドの生合成では、修飾酵素 (LanKC) が脱水と環化を触媒し、Lan/MeLan や Lab のような珍しいアミノ酸を生成する。ランチペプチドのエリスレアペプチンは、クラス III ランチペプチド合成酵素 EryKC を用いて *in vitro* で生産された。興味深いことに、エリスリアペプチンの構造は、N 末端が Lan、C 末端が Lab のミックス型ランチペプチドであることがわかった。酵素 EryKC は、シクラーゼドメインに Lan と Lab の異なる処理様式を持ち、その結果、Lab/Lan のミックス型ランチペプチドを形成することが提唱された³。新しい未開拓のランチペプチドを発見するために、ゲノムマイニング法が採用されている。この方法は、細菌ゲノムの包括的データベースを検索し、再合成遺伝子クラスターを同定する方法であり、現在の抗生物質探索研究において非常に汎用化された手法である。このような背景のもと、我々は配列類似性ネットワーク (SSN) 解析⁴ を用いたゲノムマイニングを行い、ユニークなクラス III ランチペプチド合成酵素コード遺伝子を同定した。その結果、放線菌 *Nocardiopsis alba* のゲノム中に、新規のクラス III ランチペプチド

合成酵素コード遺伝子 *nptKC* を発見した。異種発現実験により、我々はノカルジオペプチンと呼ばれる新規ランチペプチドの生産に成功したので報告する。

2. ノカルジオペプチンの生合成遺伝子クラスターの解析

クラス III ランチペプチドの生合成遺伝子群は放線菌のゲノム上に分布している。クラス III ランチペプチド合成酵素遺伝子 *labKC* のアミノ酸配列をクエリー配列として、配列類似性ネットワーク (SSN) 解析を行った。大きなグループ (グループ A) が見つかった。グループ A には、既知のクラス III ランチペプチド *labyrinthopeptin* の *laKCb*⁵ 等の合成酵素遺伝子が含まれていた。また、今回の SSN 解析により 11 のマイナーグループが存在することが示された。前駆体ペプチドの配列を調べた。グループ H には 5 つの酵素コード遺伝子が含まれていた。これらはすべて *Nocardiosis* 属に属する放線菌由来である。このグループにおいて、*Nocardiosis alba* の遺伝子クラスターを調べた。*N. alba* のゲノム配列から、遺伝子クラスターの同定を試みた。その結果、クラス III ランチペプチド合成酵素コード遺伝子 *nptKC* (アクセッション番号: AFR06803.1) とトランスポーターコード遺伝子 *nptT* (AFR06027.1) を発見した。前駆体ペプチドをコードする遺伝子 *nptA1*, *A2*, *A3* は *nptKC* から 13kbp 離れていた (図 1A)。前駆体ペプチド (*nptA1*, *A2*, *A3*) のアラインメントから、分子内に SXXTXXXC と SXXSXXXC のモチーフ配列が示された (図 1B)。合成酵素遺伝子と前駆体ペプチドをコードする遺伝子の共発現実験により、新しいランチペプチドが生成されることが期待された。そこで、大腸菌での異種発現を行った。

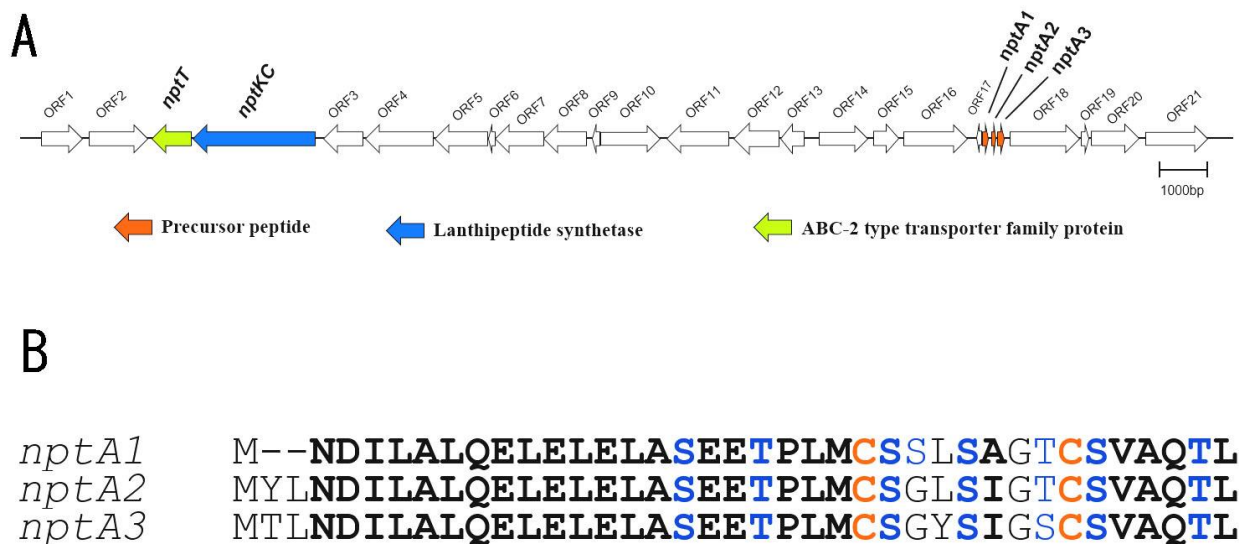


図 1. A) 遺伝子クラスター、B) 前駆体遺伝子のアミノ酸配列

3. 生合成遺伝子の大腸菌での共発現実験

異種共発現により新規ランチペプチドを産生するために、市販のベクターpET-29b (+)をベースにベクターpET29b-NPT-A2KC を構築した。この DNA 配列は、nptA2 (前駆体ペプチドコード遺伝子)および nptKC(ランチペプチド合成酵素コード遺伝子)のコドン最適化配列を用い、各開始コドンの前に Shine-Dalgarno 配列を用いて化学合成した。共発現のために、遺伝子 nptA2 と nptKC は、ベクター pET29b-NPT-A2KC 中の T7 プロモーター領域の下流に別々に配置された。構築後、ベクターpET29b-NPT-A2KC を大腸菌 BL21(DE3)細胞に形質転換した。これらの細菌を IPTG とカナマイシンを添加した改良寒天培地で培養した。その後、実験用スパチュラを用いて細胞を採取し、MeOH で抽出した。得られた MeOH 抽出液を HPLC と ESI-MS 分析にかけたところ、抽出液中にノカルジオペプチン A2 と名付けた新しいランチペプチドが検出された。

4. ノカルジオペプチン A2 の質量分析による構造解析

精密質量分析から、ノカルジオペプチン A2 の分子式は $C_{79}H_{128}N_{20}O_{28}S_3$ であると決定した。nptA2 のアミノ酸配列との分子式の違いから、配列から 3 単位の水が取り除かれて脱水が起こったことが示唆された。さらに、ノカルジオペプチン A2 の衝突誘起解離質量分析 (CID-MS) 実験によって構造を解析した。y 系列イオン (y12, y13, y14, y15, y16, y17, y18, y19) および b 系列イオン (b5, b7, b8, b18) を含むフラグメンテーションイオンが観察され、ノカルジオペプチン A2 の直鎖部分が ASEETPLM の配列であることが示された (図 2A)。しかし、環状部分は CID-MS 実験ではフラグメンテーションイオンを与えなかった。CSGLSIGTCS の配列では、3 単位の水の除去が Ser または Thr 上で起こることが示された。直鎖ペプチド領域の C 末端の Ser 残基と Thr 残基は脱水されていないことがわかった。我々は DMSO- d_6 を用いてノカルジオペプチン A2 の 1H NMR 分析を試みた。しかし、 1H NMR スペクトルのプロトンシグナルはブロードであり、それ以上の解析は困難であった。

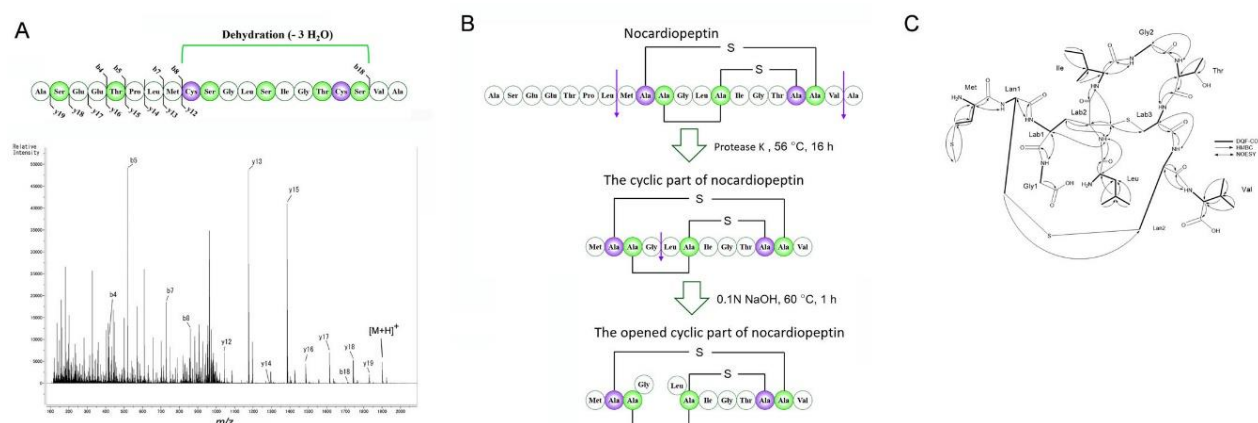


図 2. A) CID-MS 分析、B) ノカルジオペプチンの切断反応、C) NMR 構造解析

5. ノカルジオペプチン A2 の化学分解

ノカルジオペプチンの直鎖部分は、溶液中で自由なコンフォメーションをとりうるため、 ^1H NMR スペクトルがブロードになるのではないかと推測した。そこで、プロテアーゼ K を用いて化学的に分解し、ペプチドの直鎖部分を切断して、ノカルジオペプチンの環状部分を得ることを計画した。ノカルジオペプチンをプロテアーゼ K で消化し、環状部分を得た。HPLC 分離により、環状部分のノカルジオペプチンを得た。ノカルジオペプチンの環状部分を ESI-MS で分析した結果、イオン 1103.4 が得られ、ノカルジオペプチンの環状部分は 3 単位の水が脱水した MCSGLSIGTCSV の分子であることがわかった。DMSO- d_6 を用いてノカルジオペプチンの環状部分の ^1H NMR スペクトル解析を行った。しかし、ペプチドの溶媒への溶解性が悪く、解析は困難であった。溶解度を上げるため、プロテアーゼ K 処理後、0.1N NaOH (50°C, 1 時間) で塩基性加水分解を行った結果 (図 2B)、ノカルジオペプチンの開裂した環状部分を得られた。ノカルジオペプチンの切断された環状部分の ESI-MS 分析は、イオン $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1121.4 を示し、塩基性加水分解実験で 1 つのアミノ酸結合が加水分解されたことを示した。

6. ノカルジオペプチン A2 の環状部分の構造解析

^1H 、 ^{13}C 、DEPT135、DQF-COSY、NOESY、HMBC、HMQC を含む NMR 解析は、ノカルジオペプチン A2 の開環した環状部分に対して行った。DQF-COSY と HMQC のデータを利用して、分子内の構成アミノ酸 (Met、Lan1、Lab1、Gly1、Leu、Ile、Gly2、Thr、Lab3、Lan2、Val) のプロトンスピン系を同定した。各アミノ酸の ^1H と ^{13}C の化学シフトは、HMQC と HMBC のデータを用いて決定した。アミノ残基と隣接する 2 つのアミノ酸のカルボニル炭素への α -プロトンからの NOESY 相関は、部分アミノ酸配列 (Met-Lan1-Lab1-Gly1、Leu-Lab2、Ile-Gly2-Thr-Lab3-Lan2-Val) を決定するために使用された。Lab の構造決定 (部分構造: Lab1, Lab2, Lab3) では、Lab1 の β -プロトンから Lab2 の 4 級炭素までの HMBC 相関から、Lab1 と Lab2 の結合が示された (図 2C)。Lab2 の β -プロトンと Lab3 の β -プロトンの NOESY 相関は、Lab2 と Lab3 のつながりを示した (図 2C)。Lan の構造決定に関しては、Lan1 の β -プロトンから Lan2 の β -炭素への HMBC 相関から、Lan1 と Lan2 の接続が明らかになった (図 2C)。Gly と Leu の間の HMBC と NOESY の相関は検出されず、Gly と Leu の間のペプチド結合は穏やかな塩基性加水分解の間に切断されたと結論した。特に、ノカルジオペプチンの切断された環状部分の化学構造を図 2A に示すように決定した。ノカルジオペプチンの CID-MS 実験の結果を考慮し、ノカルジオペプチンの化学構造を図 2B のように提案した。

7. ノカルジオペプチン A2 の抗菌活性試験

ノカルジオペプチン A2 は、大腸菌、緑膿菌、枯草菌等の 5 つの細菌株に対する抗菌活性を試験した。しかし、64 $\mu\text{g/mL}$ の濃度では、いずれの細菌株に対しても活性は認められなかった。

8. ノカルジオペプチンの生合成経路に関する考察

ノカルジオペプチン A2 の異種生合成では、ランチペプチド合成酵素 NptKC が nptA2 のコアペプチド中の 3 単位の Ser を脱水する。NptKC はシクラーゼとして機能し、Lab と Lan をそれぞれ 1 単位ずつ形成する (図 3)。大腸菌の内因性プロテアーゼは、前駆体ペプチドの N 末端と C 末端を切断し、ノカルジオペプチン A2 を産生する。ABC トランスポーターをコードする遺伝子 *nptT* は *nptKC* の近くに位置している。一方、クラス III のランチペプチドの膜トランスポーターはペプチダーゼドメインを持たない。ほとんどのクラス III ランチペプチドの生合成に関与するペプチダーゼは不明であるが、クラス III ランチペプチドのプロセッシングに関与するペプチダーゼは 2 つ (NAI-112 の AplP16 とフラビペプチンの FlaP14) しか知られていない。そこで、*N. alba* のゲノムから *aplP* と *flaP* に類似した遺伝子を検索した。その結果、*flaP* と 38.3% の同一性を持つペプチダーゼコード遺伝子 (AFR10071.1) を同定した。現在のところ、この遺伝子が *N. alba* 細胞におけるランチペプチドの生合成に関与しているかどうかは不明である。この遺伝子 (AFR10071.1) に由来するペプチダーゼの機能を明らかにするためには、さらなる *in vitro* 実験が必要である。

NptA2

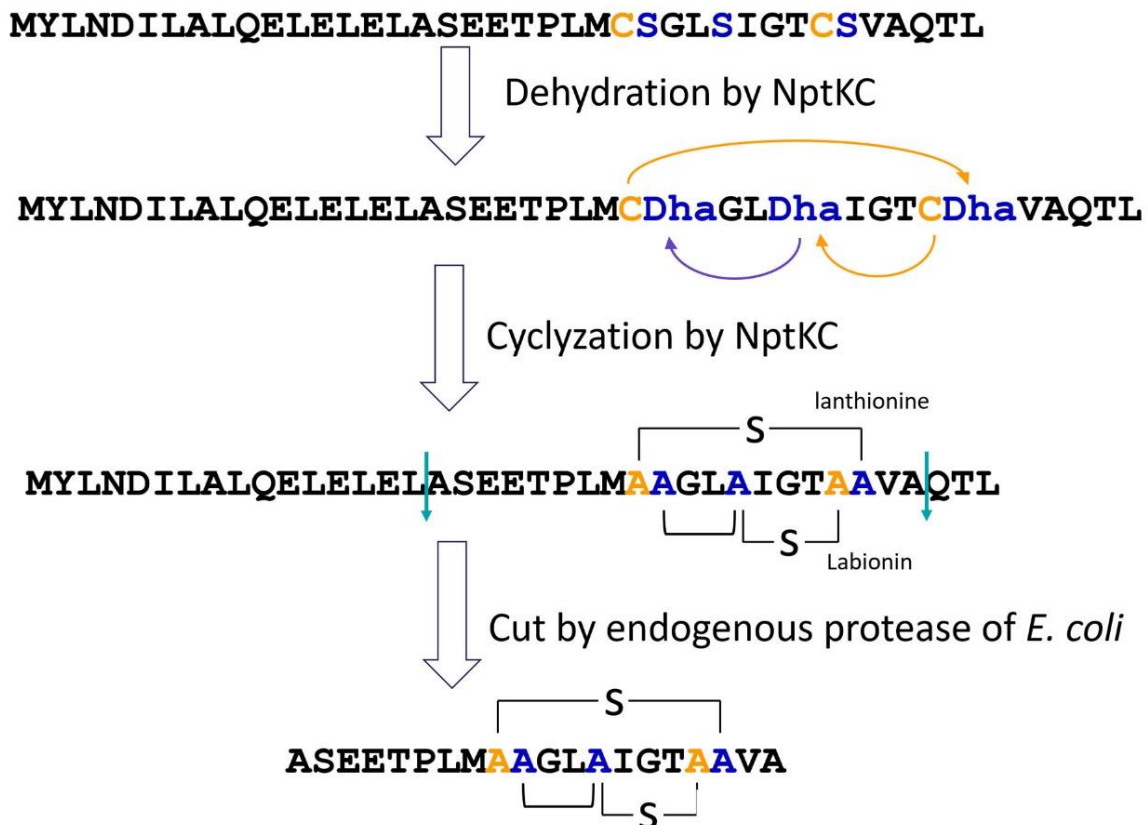


図 3. ノカルジオペプチン A2 の生合成経路

9. まとめ

細菌ゲノムのデータベースへの蓄積に伴い、ゲノムマイニングは二次代謝産物の新しい生合成酵素を発見するための効率的な手法として浮上してきた。特に、配列類似性ネットワーク (SSN) 解析は、遺伝子をグループ化し、ユニークで多様な遺伝子を同定するための強力なツールであることが証明されている。本研究では、SSN 解析を利用して、新しいランチペプチド合成酵素コード遺伝子 *nptKC* を同定した。生合成遺伝子 *nptKC* と *nptA2* の異種発現により、ノカルジオペプチド A1-A3 と名付けられた新規ランチオペプチドの生産に成功した。特に、ノカルジオペプチン A2 は、Lan と Lab の橋渡しというこれまでにないパターンを示し、ランチペプチド合成酵素 NptKC が既知のクラス III ランチペプチド合成酵素とは異なる反応特性を持つことを示した。この発見にもかかわらず、データベースにはまだ未解明のクラス III ランチペプチド合成酵素コード遺伝子が多数存在する。合成遺伝子を利用し、大腸菌で異種発現させることで、常在菌を培養することなく、新規なランチペプチドを生産する有望なアプローチを提示している。本研究は、ゲノムマイニングに基づく、ユニークな構造を持つ新規ランチペプチドの生産における大きな進歩である。本研究の成果は、ユニークな性質と抗菌活性などの有用な機能を持つ新規ランチペプチドのさらなる探索に貢献するものと確信している。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人天野工業技術研究所から多大なご支援を頂きました。ここに記して謝意を示します。

参考文献

- (1) Lee, H., and van der Donk, W. A. (2022) Macrocyclization and backbone modification in RiPP biosynthesis, *Annu Rev Biochem* 91, 269-294.
- (2) Hegemann, J. D., and Sussmuth, R. D. (2020) Matters of class: coming of age of class III and IV lanthipeptides, *RSC Chem Biol* 1, 110-127.
- (3) Voller, G. H., Krawczyk, J. M., Pesic, A., Krawczyk, B., Nachtigall, J., and Sussmuth, R. D. (2012) Characterization of new class III lantibiotics--erythraeptin, avermipeptin and griseopeptin from *Saccharopolyspora erythraea*, *Streptomyces avermitilis* and *Streptomyces griseus* demonstrates stepwise N-terminal leader processing, *Chembiochem* 13, 1174-1183.
- (4) Zallot, R., Oberg, N., and Gerlt, J. A. (2019) The EFI web resource for genomic enzymology tools: leveraging protein, genome, and metagenome databases to discover novel enzymes and metabolic pathways, *Biochemistry* 58, 4169-4182.
- (5) Meindl, K., Schmiederer, T., Schneider, K., Reicke, A., Butz, D., Keller, S., Guhring, H., Vertesy, L., Wink, J., Hoffmann, H., Bronstrup, M., Sheldrick, G. M., and Sussmuth, R. D. (2010) Labyrinthopeptins: a new class of carbacyclic lantibiotics, *Angew Chem Int Ed Engl* 49, 1151-1154.