

研究成果報告書

研究テーマ (和文) AB		シャトルベクターを用いたラッソペプチドの高生産システムの開発			
研究テーマ (欧文) AZ		Development of high production system of lasso peptide using shuttle vector			
研究氏 代表名 者	カタカナ CC	姓) コダニ	名) シンヤ	研究期間 B	2018～2019年
	漢字 CB	小谷	真也	報告年度 YR	2019年
	ローマ字 CZ	Kodani	Shinya	研究機関名	静岡大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		静岡大学 小谷真也			
概要 EA (600字～800字程度にまとめてください。)					
<p>ラッソペプチドとは細菌の産生する環状ペプチドの一種であり、プロテアーゼに対して耐性を有することから、創薬のターゲットとして注目が集まっている。また、アミノ酸残基 20 残基程度の分子であり、中分子ペプチドとして抗原抗体医薬の格好の標的である。ラッソペプチドの生合成遺伝子クラスターは、プロテオバクテリア、放線菌などに広く分布しているが、天然の状態では生産されることはまれで、大腸菌の異宿主発現で生産されてきた。本研究においてスフィンゴモナス属細菌を用いた異宿主発現系を構築し、ラッソペプチドの大量生産系の確立を目指し研究を行った。プロテオバクテリア <i>Sphingomonas koreensis</i> に新規ラッソペプチドの遺伝子クラスターを発見した。そこで、この遺伝子クラスターを標的にして、PCR 法により、遺伝子の増幅を行った。さらに大腸菌-<i>Sphingomonas</i> 間で使用できるシャトルベクター p HSG396Sp を用いて、ラッソペプチドの発現用シャトルベクター構築に成功した。大腸菌でクローニングを行い、エレクトロポレーション法によって、<i>Sphingomonas subterranea</i> の形質転換に成功した。形質転換体の <i>Sphingomonas subterranea</i> を培養することにより、新規ラッソペプチドの生産に成功した。新規ラッソペプチドの構造決定は、ESI-MS および NMR を用いて行った。また、NOE およびカップリングコンスタントのデータを用いて三次元立体構造の決定に成功した。その結果、Koreensin は典型的なラッソペプチドの環状構造を有していることが明らかとなった。</p>					
キーワード FA	ペプチド	異宿主生産	シャトルベクター	生合成遺伝子	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}	How to harness biosynthetic gene clusters of lasso peptides							
	著者名 ^{GA}	Shinya Kodani, Kohta Unno	雑誌名 ^{GC}	Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology					
	ページ ^{GF}	現在投稿中です	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要 EZ

Lasso peptide is a kind of cyclic peptide produced by bacteria and has resistance to proteases, and therefore has attracted attention as a target for drug discovery. In addition, it is a molecule with about 20 amino acid residues and is an ideal target for antigen-antibody drugs as a medium-molecular peptide. Lasso peptide biosynthetic gene clusters are widely distributed in proteobacteria, actinomycetes, etc., but are rarely produced in the natural state and have been produced by heterologous expression of *Escherichia coli*. In this study, we constructed a heterologous host expression system using *Sphingomonas* and conducted research aiming to establish high yield production system for lasso peptides. We found a novel lasso peptide gene cluster in the proteobacterium *Sphingomonas koreensis*. Therefore, by targeting the gene cluster, the gene was amplified by the PCR method. Furthermore, using shuttle vector pHSG396Sp which can be used between *Escherichia coli* and *Sphingomonas*, a shuttle vector for expression of lasso peptide was successfully constructed. Cloning was performed in *Escherichia coli*, and *Sphingomonas subterranea* was successfully transformed by electroporation. We succeeded in producing a novel lasso peptide by culturing the transformant of *Sphingomonas subterranea*. The structure of the novel lasso peptide was determined using ESI-MS and NMR. Moreover, we succeeded in determining the three-dimensional structure using the data of NOE and coupling constant. As a result, Koreensin was indicated to have a typical lasso peptide cyclic structure.