

## 〈総説〉

# 不思議な構造と多様な活性を有する投げ縄ペプチド

供田 洋

(学)北里研究所・北里大学 大学院薬学研究科 微生物薬品化学

(2019年1月30日受付)

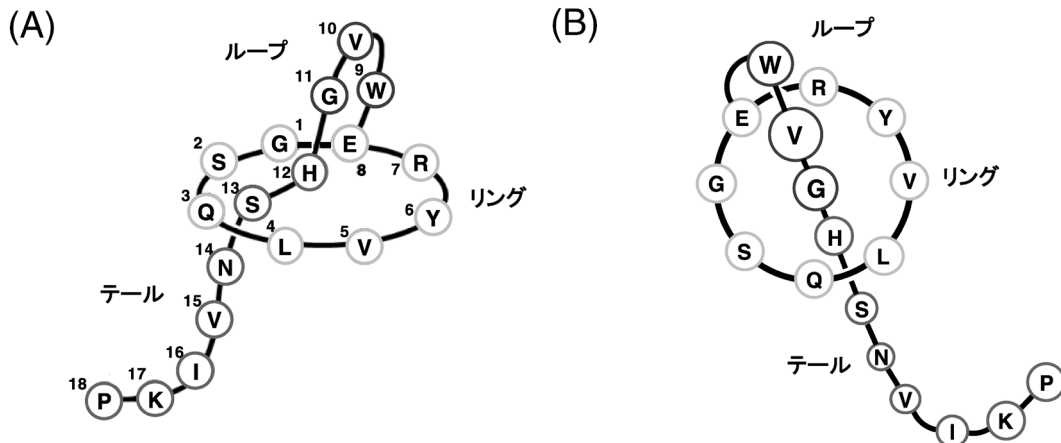
微生物は多様な構造を有する化合物を生産する能力を有している。投げ縄ペプチド (lasso peptide) は、細菌のリボソームで生合成された約20残基のアミノ酸からなるポリペプチドで、N末端アミノ酸のアミノ基が7から9残基目に存在する Asp あるいは Glu の側鎖カルボン酸とイソペプチド結合して環状マクロラクタムリングを形成し、このリングをC末端側のペプチド鎖テールが通り抜け、投げ縄あるいは結び目のような立体構造を示す化合物群である。投げ縄ペプチドはこのような特殊な3次元構造と多様な生物活性を有することから、この10年間でその研究が大きく進展した。本総説では、その構造、活性、生合成について解説する。

## 序 文

著者が「投げ縄ペプチド」と出会ったのは、北里生命科学研究所に在籍中に開始した抗結核剤探索の研究過程においてである。結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* の代わりに、安全で生育の早い抗酸菌 *M. smegmatis* を検定菌として、微生物の培養液を対象に抗 *M. smegmatis* 活性物質の探索を行った。臨床で使われている化学合成医薬品であるイソニアジド (isoniazid, ミコール酸生合成阻害作用<sup>1)</sup>) とエタンブトール (ethambutol, アラビノガラクトサン生合成阻害作用<sup>2)</sup>) はいずれも抗酸菌に特有な細胞壁の生成を阻害することから、天然資源から同様な作用点を示す化合物が得られることを期待した。これら合成医薬品は結核を含め抗酸菌にしか抗菌活性を示さないことに着目し、実際のスクリーニングでは *M. smegmatis* にのみ抗菌活性

を示し他のグラム陰性菌・陽性菌、真菌や酵母には活性を示さない培養液を選択するという極めて単純な選択基準を設けた。この選択基準では約1万株から1株の頻度でしかヒットしなかったが、その1株 *Rhodococcus jostii* K01-B0171 の培養液から新規化合物としてラリアチン (lariatrin) A と B を発見した<sup>3,4)</sup>。その構造は分解反応、アミノ酸分析、マスペクトル解析、各種NMR解析などにより投げ縄ペプチドであることを明らかにした。図1に成分Aの構造を示したが、18個のL-アミノ酸から構成されるペプチドで、リング、ループとテール部分を有する。N末端のGlyのアミノ基と8番目のGluの側鎖カルボン酸がイソペプチド結合して環状ラクタムリングを形成し、このリングからループを介してC末端側のテールペプチドがこのリング部分を通り抜けた特異な3次元構造である。このような化合物群は「投げ縄ペプチド」と呼ばれていることを初めて知ったわけである。

図1. ラリアチンAの立体構造の模式図



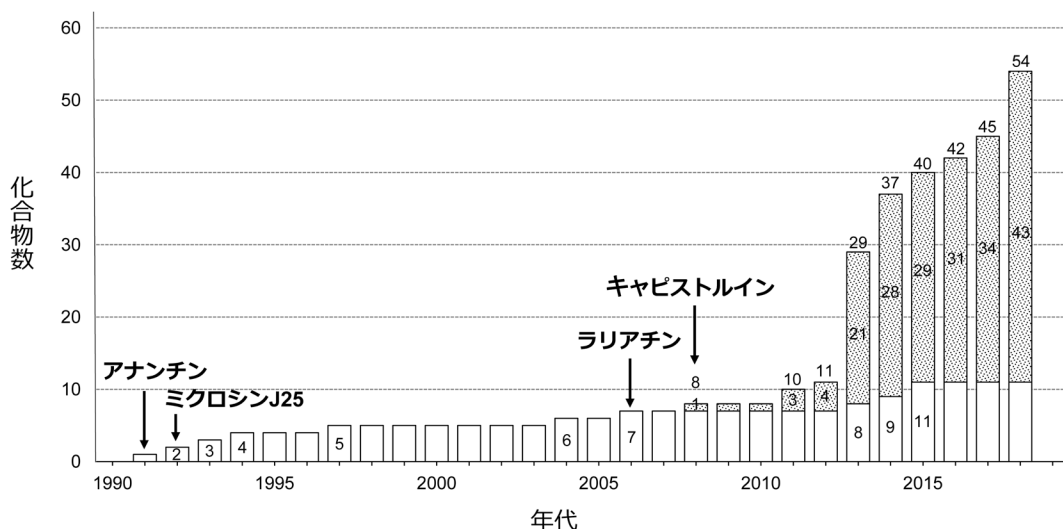
- (A) ラリアチンAは18個のアミノ酸から構成される。1位のグリシン残基のアミノ基と8位のグルタミン酸の側鎖カルボン酸がイソペプチド結合し、8アミノ酸からリング部分を形成する。3アミノ酸がループ部分を形成し、12位のヒスチジン残基から18位プロリンまでのテール部分はリング部分を通してのっている。
- (B) (A) のモデルを上から見た図。リング部分のアミノ酸を反時計まわりに設定すると、ループ部分は紙面の手前に出てきて、テール部分は紙面の向こう側に伸びる立体を形成する。

### 投げ縄ペプチド発見数の推移

1991年に心房性ナトリウム利尿因子アンタゴニストとして発見されたアナンチン (anantin) が最初の投げ縄ペプチドであり<sup>5)</sup>、図2にそれ以降に発見された投げ縄ペプチドの積算数を示す<sup>6)</sup>。ラリアチンの発見時 (2006年) まで投げ縄ペプチドの報告例は少なく、放線菌 (アクチノバクテリア門・放線菌門に属する) からの5種と大腸菌 (プロテオバクテリア門に属する) からのマイクロシン J25 (microcin J25, MJ25 と略す) の1種のみであり、いずれも生物活性を指標に発見されていた (表1)。中でも投げ縄ペプチドとして証明されていたものは、サイアマイシン (siamycin) 類<sup>9)</sup> と MJ25<sup>13-15)</sup> に過ぎなかった。MJ25は大腸菌が生産するバクテリオシン (bacteriocin) として発見され<sup>21)</sup>、その生合成遺伝子、生合成メカニズム<sup>22)</sup> や抗菌作用メカニズムが活発に研究されていた<sup>23,24)</sup>。当初その構造は、N末端アミノ酸とC末端のアミノ酸が結合した大環状ペプチドと考えられていたが<sup>25)</sup>、2003年に3つのグループがほぼ同時に独立して投げ縄ペプチドであることを報告した<sup>13-15)</sup>。2008年にはMJ25生合成遺伝子情報をもとに、プ

ロテオバクテリア *Burkholderia thailandensis* から投げ縄ペプチド・キャピストリン (capistrin) が初めてゲノムマイニング (genome mining) の手法で発見された<sup>26)</sup>。一方、ラリアチン発見時、まだアクチノバクテリアから投げ縄ペプチドの生合成遺伝子情報は報告例がなかった。ゲノム配列の情報がようやく蓄積しつつある時期ではあったが、微生物の全ゲノム配列の決定はまだ高価であった。著者らは *R. jostii* よりファージ感染を利用してラリアチン非生産変異株を取得し、変異点近傍の遺伝子配列を精査しラリアチンに対応するアミノ酸配列の有無を検索した。その結果、1変異株からラリアチンのアミノ酸配列が確認され、2012年、その周辺から全生合成遺伝子クラスターを特定することに成功した<sup>27)</sup>。これがアクチノバクテリアから投げ縄ペプチドの生合成遺伝子を報告した最初の例となった。その頃には、微生物の全ゲノム解析が安価となり一般化し、多くのゲノム配列情報が蓄積し利用できるようになっていたこともあり、2013年以降ゲノムマイニングの手法による投げ縄ペプチドの発見が一気に増加した (図2)。2018年12月まで約54種の投げ縄ペプチ

図2. 投げ縄ペプチド発見累積数の推移



白罫い：生物活性で発見された数

黒罫い：ゲノムマイニングで発見された数

2014年までのデータは文献(6)より引用

2015年以降のデータは著者がPubMedより lasso peptide で検索して加算

ドが報告されているが、生物活性を指標に発見された数は11種に過ぎない(表1)。ゲノムマイニングの手法が、投げ縄ペプチドの発見にいかにも有効であるかを物語っている。本稿で登場する投げ縄ペプチドのコア部分のアミノ酸配列は、表2にまとめて示している。

### 投げ縄ペプチドの構造と生合成

投げ縄ペプチドはその分子内のジスルフィド(S-S)結合の数により3つの型に分類されている<sup>6,28)</sup>。2つのS-S結合(4分子のCys残基)を有する投げ縄ペプチドはI型、1つのS-S結合を有するものはIII型(2分子のCys残基)そしてS-S結合を有さない投げ縄ペプチドはII型に分類されている。それぞれの基本構造モデルを図3に示す。I型の構造として証明されている典型的なものとしてサイアマイシン類があり<sup>9,10)</sup>、N末端のCys(<sup>1</sup>Cys)と<sup>9</sup>Aspがイソペプチド結合し環状ラクタムリングを形成し、さらに<sup>1</sup>Cys-<sup>13</sup>Cysそして<sup>7</sup>Cys-<sup>19</sup>Cysの2箇所S-S結合し、複雑で厳密な立体構造を作り上げて

いる<sup>29,30)</sup>。II型の投げ縄ペプチドとしてはMJ25<sup>13~15)</sup>、ラリアチン類<sup>3)</sup>(いずれも<sup>1</sup>Gly-<sup>8</sup>Gluでリング)やRES-701類<sup>31,32)</sup>(<sup>1</sup>Gly-<sup>9</sup>Aspでリング)などが、III型の投げ縄ペプチド例は少なくBI-32169(<sup>1</sup>Gly-<sup>9</sup>Aspでリングを、<sup>6</sup>Cys-<sup>19</sup>CysでS-S結合)<sup>16)</sup>とLP2006(<sup>1</sup>Gly-<sup>8</sup>Gluでリングを、<sup>13</sup>Cys-<sup>17</sup>CysでS-S結合し図3のモデルIIIと少し異なる)<sup>28)</sup>が挙げられる。いずれの投げ縄ペプチドも固有の立体構造を有していると考えられる。リング形成は7~9アミノ酸が適切な構成数のようであり、8か9アミノ酸数が多く、7アミノ酸からなるリングを形成する報告はこれまでのところザンソモニン類(xanthomonin I-III)のみである<sup>33)</sup>。N末端のアミノ酸としてGlyが最も多く<sup>34)</sup>、Cys(サイアマイシン類など)、Ser(ストレプトモノマイシン streptomomicin<sup>19)</sup>)、Ala(ペニロディン paeninodin<sup>35)</sup>)など側鎖の比較的小さいアミノ酸が好まれると考えられていたが、最近、Leu(シトルラシン A citrulassin<sup>A28)</sup>)やTrp(ファシラシン fasilassin/フスカネディン fuscanedin<sup>36,37)</sup>)もN

表1. 生物活性を指標として発見された投げ縄ペプチド

年	投げ縄ペプチド	生物活性	抗菌活性	全アミノ酸数 (環のアミノ酸数)	構造分類	生産菌	文献
1991	Anantin	心房性ナトリウム利尿因子アンタゴニスト活性	無	17 (9)	II型	<i>Streptomyces coeruleus</i>	5
1993	RP-71955 (Aborycin)*	抗HIV活性	無	21 (9)	I型	<i>Streptomyces</i> sp.	7
1994	RES-701類	エンドセリンB型受容体アンタゴニスト活性	有	16 (9)	II型	<i>Streptomyces</i> sp.	8
1995	Siamycin II*	HIV融合阻害活性	有	21 (9)	I型	<i>Streptomyces</i> sp.	9
1996	MS-271 (Siamycin I)*	カルモジュリン活性化ミオシン軽鎖キナーゼ阻害活性 フタロシン経路阻害活性	有	21 (9)	I型	<i>Streptomyces</i> sp.	10, 11
1997	Propeptin	プロリルエンドペプチターゼ阻害活性	有	19 (9)	II型	<i>Microbispora</i> sp.	12
2003	Microcin J25	抗菌 (Gram-negative) 活性, RNA polymerase 阻害活性	有	21 (8)	II型	<i>E. coli</i> AY25	13-15
2004	BI-32169	グルカゴン受容体アンタゴニスト活性	無	19 (9)	III型	<i>Streptomyces</i> sp.	16
2006	Lariat A	抗結核活性	有	18 (8)	II型	<i>Rhodococcus jostii</i>	3, 4
2013	Sungsanpin	抗がん活性 (肺がん細胞)		15 (8)	II型	<i>Streptomyces</i> sp.	17
2014	Lassomycin	抗結核活性, ATP依存性プロテアーゼ (CipC1) 阻害活性	有	17 (8)	II型	<i>Lentzea kentuckyensis</i>	18
2015	Streptomomycin	抗菌活性, walR/walK阻害活性	有	21 (9)	II型	<i>Streptomonospora</i> sp.	19
2015	Humidimycin	抗力ピ薬 caspofungin 活性増強活性	無	19 (8)	I型	<i>Streptomyces</i> sp.	20

\*Siamycin類

表2. 主な投げ縄ペプチドのコア部分のアミノ酸配列

アクチノバクテリア																							
< I 型 >																							
Humidimycin (MDN-0010)	①	L	G	V	G	S	②	D	③	F	A	G	④	C	G	Y	A	I	V	⑤	C	E	W
Siamycin I (MS-271)	①	L	G	I	G	S	②	N	③	F	A	G	④	C	G	Y	A	I	V	⑤	C	E	W
Siamycin II	①	L	G	V	G	S	②	N	③	F	A	G	④	C	G	Y	A	I	V	⑤	C	E	W
RP-71955 (Aborycin)	①	L	G	I	G	S	②	N	③	F	A	G	④	C	G	Y	A	V	V	⑤	C	E	W
Sviceucin	①	V	W	G	G	D	②	T	③	F	L	G	④	C	G	T	A	W	I	⑤	C	E	I
< II 型 >																							
Albusnodin	①	Q	G	G	G	Q	S	②	K	R	R	A	Y	N	C								
Anantin	①	F	I	G	W	G	N	②	I	F	G	H	Y	S	G	D	F						
Citrulassin A	①	L	L	G	L	A	G	N	②	R	L	V	L	S	K	N							
Fusilassin (Fuscanedin)	①	W	Y	T	A	E	W	G	L	②	E	L	I	F	V	F	R	R	E	I			
Lariatrin A (B)	①	S	Q	L	V	Y	R	②	W	V	G	H	S	N	V	I	K	P	G	P			
Lassomycin	①	L	R	R	L	F	A	②	Q	L	V	G	R	R	N	T							
Propeptin	①	Y	P	W	W	D	Y	R	②	L	F	G	G	H	T	F	I	S	P				
RES-701-1	①	N	W	H	G	T	A	P	②	W	F	E	N	Y	Y	W							
RES-701-3	①	N	W	H	G	T	S	P	②	W	F	E	N	Y	Y	W							
Streptomonicin	①	L	G	S	S	P	Y	N	②	I	L	G	Y	P	A	L	I	V	I	Y	P		
Sungsanpin	①	F	G	S	K	P	I	②	S	F	G	L	S	W	L								
< III 型 >																							
BI-32169	①	L	P	W	G	C	P	S	②	I	P	G	W	N	T	P	W	A	C				
LP2006	①	R	P	N	W	G	F	②	N	D	W	S	C	V	R	V	C						
プロテオバクテリア																							
< II 型 >																							
Acnetodin	①	G	K	G	P	I	F	②	T	W	V	T	E	G	N	Y	Y	G					
Astexin I	①	L	S	Q	G	V	E	P	②	I	S	Q	T	Y	E	E	S	R	I	N	Q	D	
Astexin II	①	L	T	Q	I	Q	A	L	②	S	V	S	G	Q	F	R	D	Q	L	G	L	S	A
Astexin III	①	P	T	P	M	V	G	L	②	S	V	S	G	Q	Y	W	D	Q	H	A	P	L	A
Capistruin	①	T	P	G	F	Q	T	P	②	A	R	V	I	S	R	F	G	F	N				
Caulonodin I	①	D	V	L	N	A	P	②	P	G	I	G	R	E	P	T	G	L	S	R	D		
Caulonodin II	①	D	V	L	F	A	P	②	P	G	V	G	R	P	M	G	L	S	E	D			
Caulonodin III	①	Q	I	Y	D	H	P	②	V	G	I	G	A	Y	G	C	E	G	L	Q	R		
Caulosegnin I	①	A	F	V	G	Q	P	②	A	V	N	P	L	G	R	E	I	Q	G				
Caulosegnin II	①	T	L	T	P	G	L	P	②	D	F	L	P	G	H	Y	M	P	G				
Caulosegnin III	①	A	L	V	G	L	L	L	②	D	I	T	V	A	R	Y	D	P	M				
Klebsidin	①	S	D	G	P	I	I	②	F	F	N	P	N	G	V	M	H	Y	G				
Microcin J25	①	G	A	G	H	V	P	②	Y	F	V	G	I	G	T	P	I	S	E	Y	G		
Xanthomonin I	①	G	P	L	A	G	②	E	I	G	G	E	N	V	P	G	I	S	E				
Xanthomonin II	①	G	P	L	A	G	②	E	M	G	G	I	T	T	L	G	I	S	Q	D			
Xanthomonin III	①	G	A	G	A	G	②	V	N	G	M	S	P	I	A	G	I	S	E				
ファーミキューテス																							
< II 型 >																							
Paeninodin	①	A	G	P	G	T	S	T	P	②	A	F	Q	P	D	P	D	E	D	V	H	Y	D

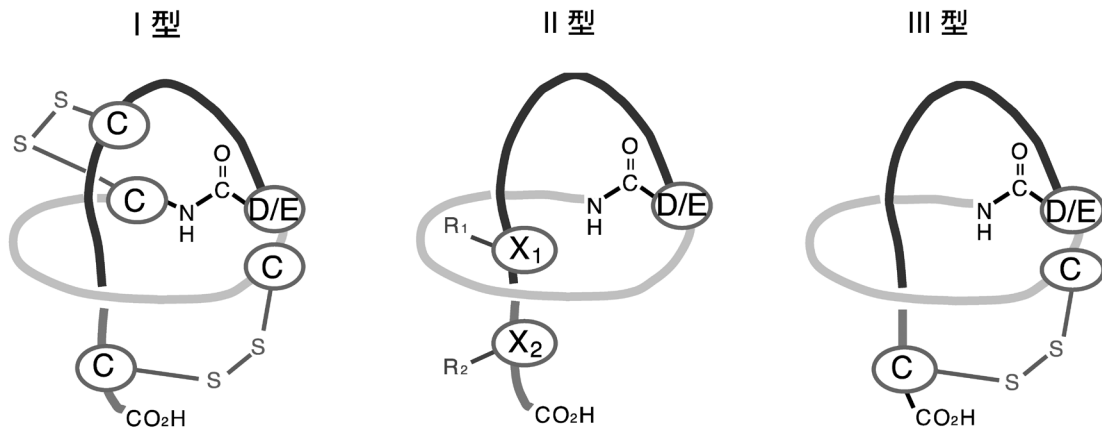
○:リングを形成するアミノ酸, 下線: 栓として働くアミノ酸, 灰色: 切断されうるC末側アミノ酸,  
 二重下線: S-S結合するシステイン残基

末端に存在することが報告されている。しかし Pro だけは立体障害が生じ投げ縄ペプチドを形成できず, N末端には存在しない。リング形成の要となるイソペプチド形成に関与するカルボン酸側のアミノ酸は Asp か Glu に限られる。ループの大きさも様々であり, テールは多くの場合リングから簡単には外れない仕組みができています。II型の投げ縄ペプチドの場合, テールはリングを挟んで両側あるいはC末側に側鎖の大きいアミノ酸(多

くの場合芳香族アミノ酸)が存在し, 栓 (plug) の役割を果たしている。実際, ラリアチンの場合<sup>12</sup>His と<sup>14</sup>Asn が栓として働き小さなループを形成し<sup>3)</sup>, MJ25 の場合は<sup>19</sup>Phe と<sup>20</sup>Tyr がその役割を果たし大きなループを形成している<sup>13-15)</sup>。

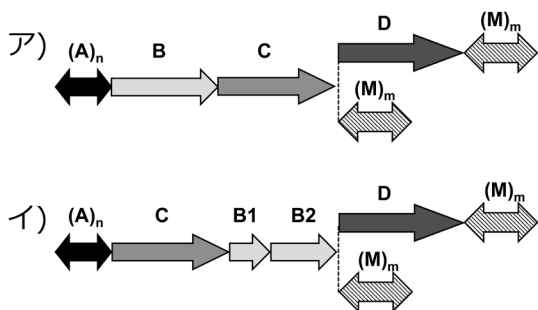
これまで報告された投げ縄ペプチドの生合成遺伝子クラスターを大きく2種類 (アとイ) に分類し, その特徴をモデル化して図4に示す<sup>6,36)</sup>。全ての投げ縄ペプチド生合成遺伝子クラスターは, 基

図3. 投げ縄ペプチドの基本立体構造のモデル



C: Cys, D/E: AspまたはGlu, X: 大きな側鎖Rを有するアミノ酸

図4. 投げ縄ペプチド合成遺伝子クラスターの基本構造

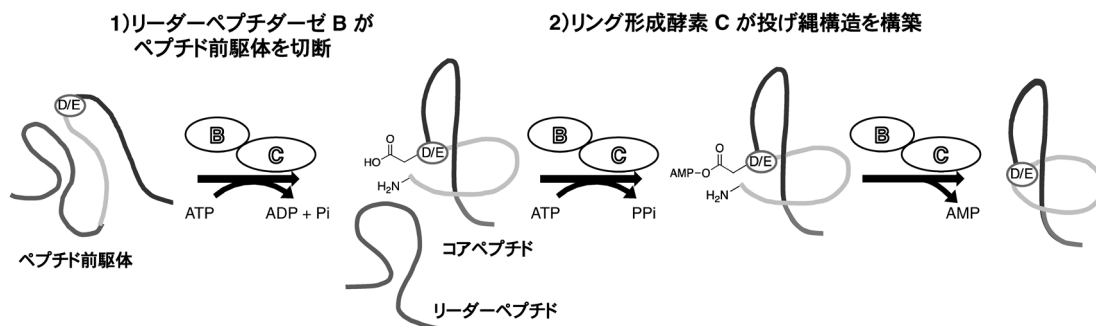


A: ペプチド前駆体, B: リーダーペプチダーゼ, C: リング形成酵素  
D: ABCトランスポーター, M: さまざまな修飾酵素,  
n=1, 2, 3 m=0, 1, 2, ...

本的にA (投げ縄ペプチド前駆体), B (リーダペプチダーゼ) とC (リング形成酵素) の3つの遺伝子を含む。プロテオバクテリアの場合 (ア), 基本遺伝子はA-B-Cの順に配列し, 一方ラリアチンの属するアクチノバクテリアの場合 (イ) は, BはB1とB2の2つの遺伝子に分離し, A-C-B1-B2の順で配列している。MJ25とラリアチンはさらにABCトランスポーターをコードするD遺伝子を有している。推定される投げ縄ペプチド生成メカニズムを図5に示した<sup>39-41)</sup>。まずリボソームでA遺伝子から投げ縄ペプチド前駆体が生合成される。この前駆体は, リーダーペプチダーゼB (あるいは

B1とB2) でリーダペプチド部分が切断 (B1はリーダペプチドを認識し, B2はペプチダーゼ活性を有する<sup>42)</sup>) され, 生じたコアペプチドはリング形成酵素CによりATPのエネルギーを利用してリング形成に関与するAsp/Glu残基の側鎖カルボン酸のアデニル化を経て, 投げ縄ペプチドへと変換される。このBとCは協奏的に働くと思われている<sup>40)</sup>。最終的にDのトランスポーターで細胞外へ排出される。最終生成の投げ縄ペプチドが抗菌活性を示す場合は, トランスポーターを有することで自己耐性機構として働いていると考えられている。さらに修飾を行う多様な遺伝子群 (Mとしてまとめて示す) がその周りに存在し, 生合成クラスターを形成している場合も少なくない。Dの代わりにMとしてイソペプチダーゼを有する場合 (例: アステキシン astexin類<sup>43)</sup>, コロノディン caulonodin類<sup>44)</sup> やコロセグニン caulosegnin類<sup>45)</sup> など) もあり, Dの機能と同様に自己耐性に関与していると考えられている。またDに加えさらにMとして, ジスルフィド (S-S) 結合を触媒する酵素遺伝子 (例: スビセウシン svuceucin<sup>46)</sup> やMS-271<sup>47)</sup> など), C末端のSer残基のリン酸化を触媒するキナーゼ遺伝子 (例: ペニノディン<sup>48)</sup>), Lysの末端アミノ基のアセチル化酵素遺伝子 (例: アルブス

図5. 投げ縄ペプチド生成の推定メカニズム



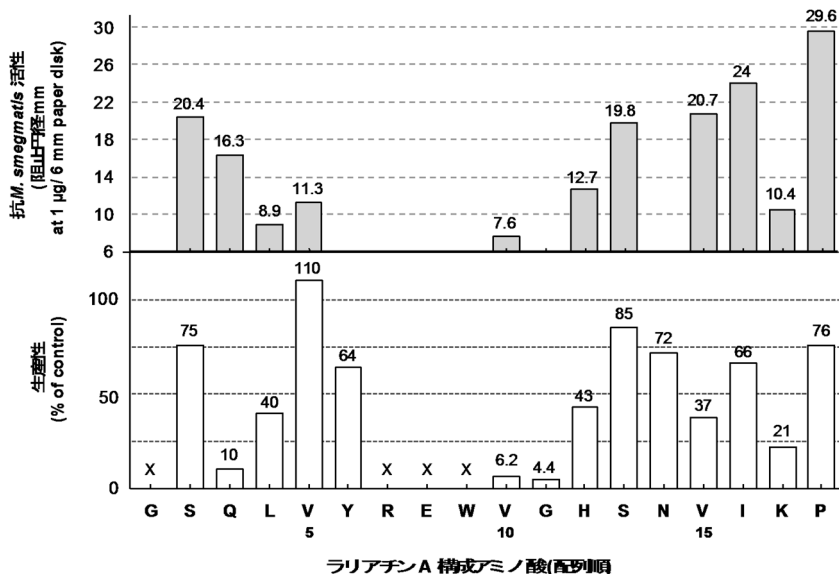
ノディン albusnodin<sup>49)</sup>), C末端カルボニル基のメチル化酵素遺伝子(例: ラッソマイシン lassomycin<sup>18)</sup>)やL-TrpをD-Trpに変換するエピメラーゼ遺伝子(例: MS-271<sup>47)</sup>)などが挙げられる。このように生成した投げ縄ペプチドはさらに多様な構造体へと導かれる。また、ファーミキューテス(Firmicutes, グラム陽性菌門)に属する*Paenibacillus*が生産するベニノデンの生合成遺伝子クラスターの配列は、アクチノバクテリアやプロテオバクテリアの細菌とは異なり、C-A-M-B1-B2-D (Mは上記のSer残基のリン酸化する修飾酵素遺伝子)と並んでいる<sup>50)</sup>。この門の細菌からの投げ縄ペプチド生合成遺伝子クラスターは、異なる配列を有しているのかもしれない。

#### ゲノムマイニングによる投げ縄ペプチドの検索

現在、投げ縄ペプチドを発見する効率的な方法として、ゲノムマイニングのアプローチが中心となっている。全ゲノム配列情報からリボソーム生合成されるペプチドの発掘方法として、いくつかの解析アルゴリズム (antiSMASH, BAGEL3やRODEOなど<sup>51,52,28)</sup>) が利用されてきた。投げ縄ペプチド発掘の場合は、このような解析アルゴリズムに加えて投げ縄ペプチド前駆体Aの配列情報(例えば、コアペプチド部分の8か9番目がAspかGluであること、切断されるリーダーペプチドの後ろから2番目がThrであることなど)や相同

性が低いもののリーダーペプチダーゼBやリング形成酵素Cに関する配列情報などを考え合わせてゲノム検索されてきた。Mitchellらはこのような手法により細菌遺伝子を解析し、1300種以上もの投げ縄ペプチドが細菌に広く存在していると推定した<sup>28)</sup>。その解析結果から、投げ縄ペプチドについて多くの情報がもたらされている。投げ縄ペプチドのN末端はGly (62%), Ala (16%), Leu (7%)の割合で存在すること、リング部分にはGly (22.8%)が高い頻度で存在(柔軟性が重要)すること、テール部分は芳香族アミノ酸が高頻度で存在(投げ縄構造維持に必須)すること、C末端はSer (26%)が高頻度で存在しリン酸化などの修飾を受ける可能性などが示唆されている。これらの解析結果は、上記のこれまで実際に報告された投げ縄ペプチドの特色を基本的にはよく説明しているが、その存在比は多少食い違っている。今後さらに投げ縄ペプチドが発見されることにより、その存在比に近づくのかもしれない。またリーダーペプチド部分については800 (63%)の投げ縄ペプチドがYxxPxLxxxGxxxxTxの配列を有する。ラリアチン生合成の場合、B1タンパク質はこのリーダーペプチドのみならずコアペプチド部分も認識し結合することが示されている<sup>53)</sup>。A, B, C以外の遺伝子としてABCトランスポーター (62%), キナーゼ (32%), ヌクレオチド転移酵素 (26%), グルコシル転移酵素 (14%), アセチル転移酵素 (6.6%)

図6. ラリアチンA構成アミノ酸のアラニン置換体の生産性と生物活性



X: アラニン置換体検出されず

ラリアチンAを構成する各アミノ酸に対するAla置換体の培養液中の生産量(ラリアチンA自身の生産量を100%, 下の棒グラフ)と置換体の抗*M. smegmatis*活性(1µg/6mmペーパーディスクでの阻止円径, ラリアチンAでは阻止円径は21.6mm, 上の棒グラフ)

をコードする遺伝子を伴っていることなど、翻訳後修飾される投げ縄ペプチドが生成される可能性が高いことも予想されている。

投げ縄ペプチド生物活性

生物活性を指標に発見された投げ縄ペプチドを表1にまとめた。最も多く報告されている活性は抗菌活性である。その他として、抗ウイルス活性、受容体アンタゴニスト活性や酵素阻害活性が報告されている。抗菌活性の場合、その作用機構が証明されているものもある。MJ25は抗グラム陰性細菌活性を示し、これはプロテオバクテリアのRNAポリメラーゼを阻害することによる<sup>23,24</sup>。ゲノムマイニングの手法でプロテオバクテリアから発見されたキャピストリン、アシネトジン(acinetodin)やクレブシジン(klebsidin)もプロテオバクテリアのRNAポリメラーゼを阻害する<sup>54</sup>。ラッソマイシンは結核菌(*M. tuberculosis*)に対して阻害活性を示し、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)

には阻害を示さないという基準で微生物培養液を検索し発見された<sup>18</sup>。このスクリーニングアイデアは著者らのラリアチンの発見のアイデアと類似している。彼らのスクリーニング段階での選択率は2%とやや高いが、同様に投げ縄ペプチドが発見された点に驚かされた。ラッソマイシン発見時、テール部分はリングを通過していない構造(投げ縄構造ではない)と報告された。しかしこの知見に従って合成されたペプチド(投げ縄構造を取らないペプチド)には、抗結核活性が認められなかったことから<sup>55</sup>、現在ではラッソマイシンは投げ縄構造を有していると推定されている。ラリアチンと同じII型の投げ縄ペプチドに分類されるものの、その配列の相同性は低い。ラッソマイシンの作用機構についても研究されている。ラッソマイシンに対して耐性化した結核菌を分離し、その変異部位を解析することにより、その標的は結核菌独自のプロテアーゼに関与するClpC1 ATPaseと証明された<sup>18,56</sup>。ラリアチンについても解析を



進めているが、これとは異なる標的と推定しているがまだ結論は出ていない。一方、ゲノムマイニングで発見された投げ縄ペプチドについては、基本的には生物活性を調べる必要があり、実際には報告されていないものも多い。

ラリアチンは先にも述べたが、*M. smegmatis* に対する選択的な抗菌作用を指標に微生物培養液をスクリーニングして発見し、結核菌にも強い阻害活性を示した。そこで著者らはさらに活性の優れたラリアチン変異体を生合成的に調製することとした<sup>57)</sup>。まず、ラリアチン生産菌 *R. jostii* からラリアチン前駆体ペプチドをコードする遺伝子 A を欠損させた変異株 (A 欠損株) を取得した。次に、前駆体ペプチドのコア部分のアミノ酸置換に対応した A 変異遺伝子をプラスミドベクター中に組み込み、これを A 欠損株に形質転換し培養することにより、さまざまなラリアチン変異体を取得することができた。ラリアチン A を構成する 18 アミノ酸残基を 1 箇所ずつ Ala に代えた置換体では、Gly1Ala (1 位の Gly を Ala に置換した変異体)、Arg7Ala、Glu8Ala と Trp9Ala の 4 置換体は培養液中に全く検出されず (生合成されない)、Val10Ala と Gly11Ala 置換体もほとんど検出されなかった (図 6)。また、Gly1Cys や Glu8Asp も生合成されなかった。これらアミノ酸残基は投げ縄ペプチドの骨格を形成する必須の部位であり、その生合成過程は個々に厳密に規制されていることが予想される。得られた Ala 置換体の *M. smegmatis* に対する抗菌活性を図 6 に示す。その多くはラリアチン A よりも *M. smegmatis* に対する抗菌活性は減弱していたが、C 末端側の Ile16Ala と Pro18Ala 置換体の抗菌活性は上昇した。C 末端側のテール部分は構造的に揺らぎのある部分であり、この部分の置換や修飾がより強い抗菌活性をもたらすことが期待されている。MJ25 の場合、リング部分を形成する 3 アミノ酸 (<sup>1</sup>Gly、<sup>2</sup>Gly と <sup>8</sup>Glu) は他のアミノ酸に置換することができず、テール部分に位置し

投げ縄構造の要である栓の役割を果たす<sup>20</sup>Tyr 残基は Phe と Ile への置換のみが可能である。その他のアミノ酸は比較的自由に他のアミノ酸に置換できると報告されている<sup>58)</sup>。

### 投げ縄ペプチドの将来

近年、分子量が 500 以上数千までの中分子化合物の創薬リードとしての可能性が期待されている。微生物や植物からは多くの中分子化合物が生産され、投げ縄ペプチドもこの範疇に分類される。投げ縄ペプチドの多くはその特殊な構造により、プロテアーゼに抵抗性を示し、熱に対しても安定な物理化学的性状を示す。ラリアチンの場合もプロテアーゼで分解されず、唯一カルボキシペプチダーゼによって C 末端側が分解されるのみであった。80°C で処理しても安定であり、投げ縄構造を保持していた。このような特色は一般的なタンパク質や L-アミノ酸から生合成される鎖状のポリペプチドでは考えられない特性であり、これは創薬シーズとしての大きな魅力である。実際、細胞接着分子 (インテグリン) に対する結合配列 (Arg-Gly-Asp あるいは RGD) モチーフを投げ縄ペプチド MJ25 中のループ部 <sup>12</sup>Gly-<sup>13</sup>Iso-<sup>14</sup>Gly と置換・挿入することにより、がんとの関わり合いの深い分子種のインテグリンの形成を特異的に阻害することが示されている。このように抗がん剤を創製する試みもなされている<sup>59,60)</sup>。

これまで投げ縄ペプチドの生合成に関与する酵素群を用いて、*in vitro* で投げ縄ペプチドの生合成に成功した報告はなかった。酵素群が膜酵素である可能性やその安定性、また未知の介在タンパクがさらに存在している可能性など、解決しなければならない問題点があるものと考えられた。しかしごく最近、好熱性アクチノバクテリア *Thermobifida fusca* が生産するフシラシン (あるいはフスカンディン、N 末端が Trp。上述) の生合成酵素を大腸菌で発現させて *in vitro* で投げ縄ペプチドを造らせる

ことに成功したと報告され<sup>36,37)</sup>、今後のさらなる展開が予想される。一方化学的には、投げ縄ペプチドを（半合成も含め）合成できたとする報告はこれまで見当たらない。細胞、酵素あるいは化学的にも大量に投げ縄ペプチドを調製できる技術が発展することにより広い領域で投げ縄ペプチドが利用されるものと予想される。また、生物活性で発見された投げ縄ペプチドは、ゲノムマイニングの手法ではクラスターを形成していない場合が多く、今後、創薬につながる投げ縄ペプチドが出現することも大いに期待される。

### 謝辞

本総説を推敲して頂いた小山信裕講師と小林啓介助教に感謝申し上げる。

### 利益相反自己申告

申告すべきものなし

〔この総説は1997年度住木・梅沢記念賞受賞者 供田 洋博士が受賞後の研究の一部をまとめたものです。〕

### 引用文献

- Slayden RA, Lee RE, Barry CE 3rd: Isoniazid affects multiple components of the type II fatty acid synthase system of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 2000; 38: 514–25.
- Takayama K, Datta AK: Structure-to-function relationship of mycobacterial cell envelope components. *Res Microbiol.* 1991; 142: 443–8.
- Iwatsuki M, Tomoda H, Uchida R, Gouda H, Hirano S, Omura S: Lariatins, antimycobacterial peptides produced by *Rhodococcus* sp. K01-B0171, have a lasso structure. *J Am Chem Soc.* 2006; 128: 7486–91.
- Iwatsuki M, Uchida R, Takakusagi Y, *et al.*: Lariatins, novel anti-mycobacterial peptides with a lasso structure, produced by *Rhodococcus jostii* K01-B0171. *J Antibiot.* 2007; 60: 357–63.
- Weber W, Fischli W, Hochuli E, Kupfer E, Weibel EK: Anantin—a peptide antagonist of the atrial natriuretic factor (ANF). I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity. *J Antibiot.* 1991; 44: 164–71.
- Hegemann JD, Zimmermann M, Xie X, Marahiel MA: Lasso peptides: an intriguing class of bacterial natural products. *Acc Chem Res.* 2015; 48: 1909–19.
- Helynck G, Dubertret C, Mayaux JF, Leboul J: Isolation of RP 71955, a new anti-HIV-1 peptide secondary metabolite. *J Antibiot.* 1993; 46: 1756–7.
- Morishita Y, Chiba S, Tsukuda E, *et al.*: RES-701-1, a novel and selective endothelin type B receptor antagonist produced by *Streptomyces* sp. RE-701. I. Characterization of producing strain, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot.* 1994; 47: 269–75.
- Constantine KL, Friedrichs MS, Detlefsen D, *et al.*: High-resolution solution structure of siamycin II: novel amphipathic character of a 21-residue peptide that inhibits HIV fusion. *J Biomol NMR.* 1995; 5:271–86.
- Katahira R, Yamasaki M, Matsuda Y, Yoshida M: MS-271, a novel inhibitor of calmodulin-activated myosin light chain kinase from *Streptomyces* sp. II. Solution structure of MS-271: characteristic features of the lasso structure. *Bioorg Med Chem.* 1996; 4: 121–9.
- Ogasawara Y, Dairi T: Searching for potent and specific antibiotics against pathogenic *Helicobacter* and *Campylobacter* strains. *J Ind Microb Biotech* 2018 Nov 20. doi: 10.1007/s10295-018-2108-3.
- Kimura K, Kanou F, Takahashi H, Esumi Y, Uramoto M, Yoshihama M: Propeptin, a new inhibitor of prolyl endopeptidase produced by *Microbispora*. I. Fermentation, isolation and biological properties. *J Antibiot.* 1997; 50: 373–8.
- Bayro MJ, Mukhopadhyay J, Swapna GV, *et al.*: Structure of antibacterial peptide microcin J25: a 21-residue lariat protoknot. *J Am Chem Soc.* 2003; 125: 12382–3.
- Wilson KA, Kalkum M, Ottesen J, *et al.*:

- Structure of microcin J25, a peptide inhibitor of bacterial RNA polymerase, is a lassoed tail. *J Am Chem Soc.* 2003; 125: 12475–83.
- 15) Rosengren KJ, Clark RJ, Daly NL, Göransson U, Jones A, Craik DJ: Microcin J25 has a threaded sidechain-to-backbone ring structure and not a head-to-tail cyclized backbone. *J Am Chem Soc.* 2003; 125: 12464–74.
- 16) Potterat O, Wagner K, Gemmecker G, *et al.*: BI-32169, a bicyclic 19-peptide with strong glucagon receptor antagonist activity from *Streptomyces* sp. *J Nat Prod.* 2004; 67: 1528–31.
- 17) Um S, Kim YJ, Kwon H, *et al.*: Sungsanpin, a lasso peptide from a deep-sea streptomycete. *J Nat Prod.* 2013; 76: 873–9.
- 18) Gavrish E, Sit CS, Cao S, *et al.*: Lassomycin, a ribosomally synthesized cyclic peptide, kills mycobacterium tuberculosis by targeting the ATP-dependent protease ClpC1P1P2. *Chem Biol.* 2014; 21: 509–18.
- 19) Metelev M, Tietz JI, Melby JO, *et al.*: Structure, bioactivity, and resistance mechanism of streptomonicin, an unusual lasso peptide from an understudied halophilic actinomycete. *Chem Biol.* 2015; 22: 241–50.
- 20) Valiante V, Monteiro MC, Martín J, *et al.*: Hitting the caspofungin salvage pathway of human-pathogenic fungi with the novel lasso peptide humidimycin (MDN-0010). *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59: 5145–53.
- 21) Salomón RA, Farías RN: Microcin 25, a novel antimicrobial peptide produced by *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1992; 174: 7428–35.
- 22) Solbiati JO, Ciaccio M, Farías RN, González-Pastor JE, Moreno F, Salomón RA: Sequence analysis of the four plasmid genes required to produce the circular peptide antibiotic microcin J25. *J Bacteriol.* 1999; 181: 2659–62.
- 23) Delgado MA, Rintoul MR, Farías RN, Salomón RA: *Escherichia coli* RNA polymerase is the target of the cyclopeptide antibiotic microcin J25. *J Bacteriol.* 2001; 183: 4543–50.
- 24) Yuzenkova J, Delgado M, Nechaev S, *et al.*: Mutations of bacterial RNA polymerase leading to resistance to microcin j25. *J Biol Chem.* 2002; 277: 50867–75.
- 25) Blond A, Péduzzi J, Goulard C, *et al.*: The cyclic structure of microcin J25, a 21-residue peptide antibiotic from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem.* 1999; 259: 747–55.
- 26) Knappe TA, Linne U, Robbel L, Marahiel MA: Insights into the biosynthesis and stability of the lasso peptide capistruin. *Chem Biol.* 2009; 16: 1290–8.
- 27) Inokoshi J, Matsuhama M, Miyake M, Ikeda H, Tomoda H: Molecular cloning of the gene cluster for\_lariatoin\_biosynthesis of *Rhodococcus jostii* K01-B0171. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012; 95: 451–60.
- 28) Tietz JI, Schwalen CJ, Patel PS, *et al.*: A new genome-mining tool redefines the lasso peptide biosynthetic landscape. *Nat Chem Biol.* 2017; 13: 470–478.
- 29) Detlefsen DJ, Hill SE, Volk KJ, *et al.*: Siamycins I and II, new anti-HIV-1 peptides: II. Sequence analysis and structure determination of siamycin I. *J Antibiot.* 1995; 48: 1515–7.
- 30) Fréchet D, Guitton JD, Herman F, *et al.*: Solution structure of RP 71955, a new 21 amino acid tricyclic peptide active against HIV-1 virus. *Biochemistry* 1994; 33: 42–50.
- 31) Yamasaki M, Yano K, Yoshida M, Matsuda Y, Yamaguchi K: RES-701-1, a novel and selective endothelin type B receptor antagonist produced by *Streptomyces* sp. RE-701. II. Determination of the primary sequence. *J Antibiot.* 1994; 47: 276–80.
- 32) Katahira R, Shibata K, Yamasaki M, Matsuda Y, Yoshida M: Solution structure of endothelin B receptor selective antagonist RES-701-1 determined by 1H NMR spectroscopy. *Bioorg Med Chem.* 1995; 3: 1273–80.
- 33) Hegemann JD, Zimmermann M, Zhu S, *et al.*: Xanthomonins I-III: A new class of lasso peptides with a seven-residue macrolactam ring. *Angew Chem Int Ed.* 2014; 53: 2230–34.
- 34) Maksimov MO, Pelczer I, Link AJ: Precursor-centric genome-mining approach for lasso peptide discovery. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109: 15223–28.
- 35) Zimmermann M, Hegemann JD, Xie XL, Marahiel MA: Characterization of caulonodin lasso peptides

- revealed unprecedented N-terminal residues and a precursor motif essential for peptide maturation. *Chem Sci*. 2014; 5: 4032–43.
- 36) DiCaprio AJ, Firouzbakht A, Hudson GA, Mitchell DA: Enzymatic reconstitution and biosynthetic investigation of the Lasso Peptide Fusilassin. *J Am Chem Soc*. 2018 Dec 27. doi: 10.1021/jacs.8b09928.
- 37) Koos JD, Link AJ: Heterologous and in vitro reconstitution of fuscanodin, a lasso peptide from *Thermobifida fusca*. *J Am Chem Soc*. 2018 Dec 11. doi: 10.1021/jacs.8b10724.
- 38) Maksimov MO, Link AJ: Prospecting genomes for lasso peptides. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2014; 41: 333–44.
- 39) Clarke DJ, Campopiano DJ: Maturation of McjA precursor peptide into active microcin MccJ25. *Org Biomol Chem*. 2007; 5: 2564–6.
- 40) Duquesne S, Destoumieux-Garzón D, Zirah S, Goulard C, Peduzzi J, Rebuffat S: Two enzymes catalyze the maturation of a lasso peptide in *Escherichia coli*. *Chem Biol*. 2007; 14:793–803.
- 41) Vincent PA, Morero RD: The structure and biological aspects of peptide antibiotic microcin J25. *Curr Med Chem*. 2009; 16: 538–49.
- 42) Cheung WL, Chen MY, Maksimov MO, Link AJ: Lasso peptide biosynthetic protein larB1 binds both leader and core peptide regions of the precursor protein larA. *ACS Cent Sci*. 2016; 2: 702–9.
- 43) Maksimov MO, Link AJ: Discovery and characterization of an isopeptidase that linearizes lasso peptides. *J Am Chem Soc*. 2013; 135: 12038–47.
- 44) Hegemann JD, Zimmermann M, Zhu S, Klug D, Marahiel MA: Lasso peptides from proteobacteria: genome mining employing heterologous expression and mass spectrometry. *Biopolymers*. 2013; 100: 527–42.
- 45) Hegemann JD, Zimmermann M, Xie X, Marahiel MA: Caulosegnins I–III: a highly diverse group of lasso peptides derived from a single biosynthetic gene cluster. *J Am Chem Soc*. 2013; 135: 210–22.
- 46) Li Y, Ducasse R, Zirah S, *et al.*: Characterization of svuceucin from *Streptomyces* provides insight into enzyme exchangeability and disulfide bond formation in lasso peptides. *ACS Chem Biol*. 2015; 10: 2641–9.
- 47) Feng Z, Ogasawara Y, Nomura S, Dairi T: Biosynthetic gene cluster of a d-tryptophan-containing lasso peptide, MS-271. *Chembiochem*. 2018; 19: 2045–9.
- 48) Zhu S, Hegemann JD, Fage CD, Zimmermann M, Xie X, Linne U, Marahiel MA: Insights into the unique phosphorylation of the lasso peptide paeninodin. *J Biol Chem*. 2016; 291: 13662–78.
- 49) Zong C, Cheung-Lee WL, Elashal HE, Raj M, Link AJ: Albusnodin: an acetylated lasso peptide from *Streptomyces albus*. *Chem Commun (Camb)*. 2018; 54: 1339–42.
- 50) Zhu S, Hegemann JD, Fage CD, *et al.*: Insights into the unique phosphorylation of the lasso peptide paeninodin. *J Biol Chem*. 2016; 291: 13662–78.
- 51) Weber T, Blin K, Duddela S, *et al.*: antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res*. 2015; 43: W237–43.
- 52) van Heel AJ, de Jong A, Montalbán-López M, Kok J, Kuipers OP: BAGEL3: Automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-) bactericidal posttranslationally modified peptides. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41: W448–53.
- 53) Cheung WL, Chen MY, Maksimov MO, Link AJ: Lasso peptide biosynthetic protein LarB1 binds both leader and core peptide regions of the precursor protein LarA. *ACS Centr Sci*. 2016; 2: 702–9.
- 54) Metevlev M, Arseniev A, Bushin LB, *et al.*: Acinetodin and klebsidin, RNA polymerase targeting lasso peptides produced by human isolates of *Acinetobacter gyllenbergii* and *Klebsiella pneumoniae*. *ACS Chem Biol*. 2017; 12: 814–24.
- 55) Lear S, Munshi T, Hudson AS, *et al.*: Total chemical synthesis of lassomycin and lassomycin-amide. *Org Biomol Chem*. 2016; 14: 4534–41.
- 56) Lee H, Suh JW: Anti-tuberculosis lead molecules from natural products targeting *Mycobacterium tuberculosis* ClpC1. *J Ind Microbiol Biotechnol*.

- 2016; 43: 205–12.
- 57) Inokoshi J, Koyama N, Miyake M, Shimizu Y, Tomoda H: Structure-activity analysis of Gram-positive bacterium-producing lasso peptides with anti-mycobacterial activity. *Sci Rep.* 2016; 6: 30375.
- 58) Pavlova O, Mukhopadhyay J, Sineva E, Ebricht RH, Severinov K: Systematic structure-activity analysis of microcin J25. *J Biol Chem.* 2008; 283: 25589–95.
- 59) Knappe TA, Manzenrieder F, Mas-Moruno C, *et al.*: Introducing lasso peptides as molecular scaffolds for drug design: engineering of an integrin antagonist. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2011; 50: 8714–7.
- 60) Hegemann JD, De Simone M, Zimmermann M, *et al.*: Rational improvement of the affinity and selectivity of integrin binding of grafted lasso peptides. *J Med Chem.* 2014; 57: 5829–34.

---

## Bacterium-producing lasso peptides: Their fascinating structures and diverse biological functions

Hiroshi Tomoda

Graduate School of Pharmaceutical Sciences,  
Kitasato Institute and Kitasato University

Lasso peptides belong to the class of ribosomally assembled and post-translationally modified peptides in bacteria. They consist of a macrolactam ring comprised of 7 to 9 amino acid residues and a linear C-terminal peptide tail. The ring, formed between the N-terminal  $\alpha$ -amino group and the carboxylic acid side chain of an Asp or Glu, is threaded by the C-terminal peptide tail. The fascinating topological and biological features of lasso peptides have attracted interest of many researchers for the decade. In this review, I summarize the overview of lasso peptides from the initial discovery up to the current state.