

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2019

受付番号 60269

氏 名

杉山 龍介

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：シンガポール（国名：シンガポール）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
特異なラジカル SAM 酵素によって修飾された新規ペプチド天然物の探索
3. 派遣期間：令和 元年 6 月 1 日 ~ 令和 元年 12 月 31 日
4. 受入機関名及び部局名
Department of Pharmacy, National University of Singapore
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

<背景>

微生物や植物をはじめとする様々な生物は特異な生物活性を有する低分子化合物を生産する。これらの天然有機化合物（天然物）は創薬シードや化合物ツールとして長年重要な地位を占めてきた。近年、RiPP (Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptide) という比較的最近定義されたペプチド天然物グループに関する研究が急速に発展を遂げている。RiPPs の生合成においては、まずリーダーペプチドとコアペプチドという 2 つのドメインからなる前駆体があり、リボソームにより合成され、コアペプチドが多様な酵素による翻訳後修飾を受けたのち、プロテアーゼがリーダーペプチドを除去することで成熟 RiPP が得られる。母骨格がリボソームで合成されるために天然物としては巨大な分子を容易に形成することができ、さらにユニークな翻訳後修飾酵素によって化学構造・生物活性の多様性が与えられる。RiPPs は今や、構造的特徴にもとづいて細分化された数多くのサブカテゴリをもつ巨大な天然物ファミリーと認識されており、多剤耐性菌にも有効な抗生物質 teixobactin や放線菌の二次代謝を活性化させる godsporin などの興味深い生物活性も相まって、多様な RiPPs を捉えようとする研究が盛んに行われている。中でも、基質にラジカルを発生させ特異な化学変換を行うラジカル S-アデノシルメチオニン酵素 (rSAM) の注目度は高い。例えば pM オーダーで細胞毒性を発揮する polytheonamide の生合成では、コアペプチドの偶数番目に位置する 18 個ものアミノ酸残基を選択的に D-アミノ酸に立体反転させる反応を PoyD というたった 1 つの rSAM が担い、この修飾によりはじめて細胞毒性発現の鍵となる三次元構造が形成される。しかしながら、RiPPs の修飾酵素としての rSAM 研究は現在、遺伝子の異種宿主発現による酵素レベルの機能

解析が主流であり、天然物として単離された rSAM 修飾型 RiPPs の報告例はごく少数に留まっている。

また、近年、ゲノム関連技術の発展により多種多様な生物種のゲノム情報が急速に蓄積された結果、自然界には未知の生合成遺伝子群が無数に存在し、過去に報告された 10 万を超える天然物は氷山の一角に過ぎないことがわかってきた。原核生物のゲノム上では、RiPPs は前駆体・修飾酵素・プロテアーゼなどをコードする遺伝子群がクラスター状に配置されているため、このようなデータベースを活用しやすい天然物といえる。一方で、データベース上の遺伝子情報のみで最終産物の構造を推定するのは未だ困難であるほか、遺伝子クラスターを有する微生物が実験室で培養できないケースや、仮に培養できても遺伝子群が発現しないケースなど、最終産物の取得までに多くの課題を抱えている。このような遺伝子群を覚醒させる試みとしては、異種宿主発現や転写翻訳系の調節、低分子化合物の添加、複数微生物の共培養などで成功例があるが、rSAM 修飾型 RiPPs の探索に十分応用されているとは言えないのが現状である。

<研究成果>

本研究では、rSAM によってユニークな化学修飾を受けた新規 RiPPs を未開拓な天然資源から単離・同定することを目指した。受入研究室では大腸菌への異種発現と LCMS により rSAM の迅速な機能評価が可能な実験系を構築しており、これまでに特定のアミノ酸残基間に C-C 結合を形成する新規 rSAM ファミリーを見出し、同酵素によって翻訳後修飾を受けた RiPPs を triceptide 類と命名し研究を進めてきた。本研究ではこの評価系に質量スペクトルデータを数値行列として抽出した情報処理を取り入れ、派遣期間中、主に 2 つの課題に取り組んだ。

1. *Xnc* 遺伝子クラスターによって生産される成熟 RiPP の単離・同定

これまで受入研究室では、ゲノムデータベースから見出した遺伝子クラスター中の前駆体ペプチドと rSAM のみを *E. coli* に発現させ、修飾された前駆体ペプチドのトリプシン消化物を LCMS および NMR で解析することで rSAM の機能解析を行ってきた。そのため、生合成遺伝子クラスター全体から生産される最終化合物 (=天然物) に関する知見が不足しており、当該 rSAM で修飾された「天然物としての triceptide」を取得することが目下の大きな課題の一つであった。そこで本研究では、*Xenorhabdus* 属細菌由来の triceptide 生合成遺伝子クラスター (*Xnc*) によって生産される成熟 RiPP の探索を行った。*Xnc* 遺伝子群は前駆体 (*XncA*)、rSAM (*XncB*) に加えて 3 つの遺伝子 (*XncC-E*) を含んでおり、それぞれペプチダーゼ、トランスポーター、ペプチダーゼ/トランスポーター融合タンパク質をコードすると予想された。生産菌ゲノムから各遺伝子をクローニングし、*XncA-E* の組み合わせを種々発現ベクターに組み込んで形質転換した *E. coli* BL21 (DE3) 株について、LCMS による代謝物の解析を行った。検討の結果、*XncA-E* すべてを発現させた場合にのみリーダーペプチドの切り出しが認められ、目的の修飾を受けた RiPP が生産されていることが示唆された。本化合物は *E. Coli* 細胞抽出物からは検出されず、トランスポーターにより培地中に放出されていることが予想された。培養に用いた TB 培地に含まれる多量の不純物が LCMS 分析の障害となったが、プレパック固相抽出カラムによる粗精製処理を検討し、目的化合物のみを主たるピークとして与える画分を簡便に得られる抽出条件を見出し、その単離・同定に成功した。

一方、受入研究室では *Xnc* 遺伝子群のホストである *Xenorhabdus* 属細菌の培養液からの天然物探索も並行して行われていた。実験室培養では *Xnc* 遺伝子群が発現していないことがわか

ったため、プロモーター領域の改変により当該遺伝子群を強制発現させた変異体について、培養液を本研究で最適化した単離スキームに付したところ、同一化合物が生産されていることが確認された。以上より、tripeptide 型 RiPP を天然物として初めて取得することに成功し、xenorceptide と命名するに至った（論文投稿中）。

2. NLA サブファミリーの修飾様式の解明

Tripeptide 類の特徴である特異な C-C 結合の形成を担う rSAM ファミリーは、基質とするアミノ酸配列モチーフの違いによりいくつかのサブファミリーに分けられる。その 1 つである NLA 群は、前駆体ペプチドの配列や遺伝子が分布する微生物種が他のサブファミリーとは大きく異なっていることから、特に優先度の高い研究対象であった。一方で、同群の rSAM と共発現させた前駆体のトリプシン消化物のうち、LCMS 分析上で修飾が認められるペプチドはほとんどの残基が親水性アミノ酸で構成されていたため、通常の逆相 HPLC カラムでは保持されず単離精製が困難であることから、詳細な修飾様式が未解明であった。本研究では分取 HPLC におけるカラムと溶媒条件を種々検討し、2 度の分取 HPLC により当該ペプチドを高純度で精製する方法を確立した。精製した修飾ペプチドについて各種 NMR 解析を行い、NLA 群 rSAM による修飾様式を立体化学を含めて明らかにした。

<総括・今後の展望>

本研究は7ヶ月間という短い派遣期間であったが、受入研究室で取り組まれている rSAM 修飾型 RiPPs に関する研究に進展をもたらすことができた。特に、*Xnc* 遺伝子クラスターについて、大腸菌発現系で①rSAM による前駆ペプチドの化学修飾、②プロテアーゼによるコアペプチドの切り出し、③トランスポーターによる最終生成物の細胞外への分泌を機能させることに成功し、tripeptide 型 RiPP 天然物である xenorceptide の単離・同定に至った。これらの知見は、本来の生産菌が培養可能か否かにかかわらず、データベース上の遺伝子情報のみをもとに異種宿主（特に大腸菌）にて tripeptide 類や他の天然物を生産する方法論の発展に寄与する。Tripeptide 類に属する生合成遺伝子クラスターの一部はヒトマイクロバイオーーム中に分布する微生物も保有することがわかっており、これら遺伝子群によって生産される生理活性 RiPPs を探索することで、ヒトと共生する難培養性微生物をターゲットとした創薬展開や研究ツールへの応用も期待される。

RiPPs の翻訳後修飾における rSAM は、tripeptide 類の C-C 結合をはじめユニークな構造変換を触媒するため、得られる化合物の新規性が強く保証されている。さらに、rSAM は比較的幅広い基質特異性を有する場合が多く、前駆体の遺伝子組換えにより本来の基質の枠を超えた多様な類縁体を創造できる分子ツールとしても期待度が高い。*Xnc* 遺伝子クラスターの大腸菌異種発現では最終産物を培地中に放出するため、tripeptide 型修飾を受けたペプチドを簡便に創出するプラットフォームとしての活用が見込まれる。以上、本研究成果は特異な化学修飾を受ける RiPPs を題材に、未開拓な天然資源で行う化合物探索の裾野を広げ、創薬シードなどを指向したケミカルスペースの拡充にも貢献できると期待される。