

令和3年度 学内研究助成金 研究報告書

| | | |
|----------|---|--------------------------------------|
| 研究種目 | <input type="checkbox"/> 奨励研究助成金 | <input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金 |
| | <input type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金) | <input type="checkbox"/> 国際共同研究推進助成金 |
| 研究課題名 | セントラルドグマを越え、天然ペプチド骨格までを再構築する次世代型合成生物学の確立 | |
| 研究者所属・氏名 | 研究代表者：薬学部 石川 文洋 共同研究者： | |

1. 研究目的・内容

本研究計画では、ケミカルバイオロジー、ゲノム編集、有機合成化学を融合し、“DNA→mRNA→タンパク質→機能性タンパク質→機能性分子”までをデザインする次世代型合成生物学の基盤技術を開発する。本研究計画で創出する技術により、大環状ペプチド系抗生物質グラミシジン S (GS) を機能性分子のモデルとして任意の位置で任意の修飾を導入し、高度な構造多様性を有する化合物ライブラリーの構築に取り組む。

2. 研究経過及び成果

1. 非天然型ペプチド化合物の生合成

環状ペプチド系抗生物質 GS の生合成に関与する 2 つの NRPS (GrsA、GrsB) をモデルに、生合成系プロテオミクス解析技術を基盤とした非天然型環状ペプチドの生合成を行った。GrsA は *L*-Phe に基質特異性をもつアデニル化酵素 (A_{Phe}) を有する。GrsB は 4 つのアデニル化酵素を有する巨大タンパク質 (500 kDa) であり、それぞれ *L*-Pro、*L*-Val、*L*-Orn、*L*-Leu に基質特異性をもつ (A_{Pro} 、 A_{Val} 、 A_{Orn} 、 A_{Leu})。GS 生産菌を培養し、微生物プロテオームを作製した。生合成系プロテオミクス機能解析技術を活用し、内在的に発現した GrsA (1 つのアデニル化酵素) および GrsB (4 つのアデニル化酵素) の基質特異性の解析を行なった。GrsA アデニル化酵素は、 A_{Phe} (8 種) のアミノ酸を基質候補とすることが判明した。一方、GrsB アデニル化酵素はそれぞれ A_{Pro} (1 種)、 A_{Val} (14 種)、 A_{Orn} (2 種)、 A_{Leu} (6 種) のアミノ酸を基質候補とすることがわかった。GrsA のアデニル化酵素 A_{Phe} の基質特異性情報を利用して生合成系プロテオミクス解析技術の妥当性を評価した。その結果、非タンパク質性アミノ酸の GS 骨格 (*L*-Phe 部) への部位特異的導入に成功した。また、寛容な基質特異性を示した GrsB のアデニル化酵素 A_{Val} および A_{Leu} を活用し、非天然型環状ペプチドの生合成を行なった。基質候補となるアミノ酸を培地へ添加し、GS 生産菌を行なった。常法に従い、ペプチド化合物を抽出し、HPLC により精製を行った。続いて、高分解能質量分析、改良 Marfey 法、NMR 解析により、非天然型環状ペプチドの構造解析を行った。

2. 環状ペプチドライブラリー構築に向けた化学修飾法の検討

ABPP-NRPSs を活用することで、天然物由来非天然型ペプチド化合物の生合成的分子設計および創製に成功した。また、非天然型環状ペプチド人工ライブラリー構築へ向けて、非タンパク質性アミノ酸を利用したペプチド化合物の化学修飾法を検討した。具体的には、ペプチド化学、タンパク質化学、ケミカルバイオロジー領域で汎用されるチオール-エン反応およびオレフィンメタセシス反応を利用した。まず、ペプチド化合物とチオール化合物とのチオール-エン反応の検討を行った。LC/MS により、反応生成物の確認を行った。その結果、ペプチド化合物の消失およびチオール化合物付加体の生成を確認できた。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

これまでに、内在性 NRPS へ目印を導入するタンパク質ラベル化技術の開発を行ってきた。NRPS ラベル化技術により、分子夾雑系 (*in cell, in vitro*) に存在する内在性 NRPS を観ることが可能になった。また、内在的に発現するすべての NRPS の基質特異性を診ることも可能になった。さらに、物質生産へ応用することで、非タンパク質性アミノ酸のペプチド系天然物への部位特異的導入に成功した (**Ishikawa, F.** *et al.* Unpublished data)。さらに、有機合成化学により導入した非タンパク質性アミノ酸の選択的化学修飾に成功した (**Ishikawa, F.** *et al.* Unpublished data)。今後、ゲノム編集技術を融合できれば、ペプチド系天然物を生合成するための革新的な手法となり、多様な骨格を有するペプチド系化合物を自在に創出できると考えている。

4. 成果の発表等

| 発表機関名 | 種類(著書・雑誌・口頭) | 発表年月日(予定を含む) |
|---------------------------------|--------------|--------------|
| RSC Chem. Biol. | 雑誌 | 2022年1月 |
| Org. Biomol. Chem. | 雑誌 | 2021年8月 |
| Cell Chem. Biol. | 雑誌 | 2021年6月 |
| 日本薬学会第142年会 | 口頭 | 2022年3月 |
| 第90回有機合成化学研究会(白鷺セミナー) | 口頭 | 2021年12月 |
| Pacificchem 2021 | 口頭 | 2021年12月 |
| 第58回ペプチド討論会 | 口頭 | 2021年10月 |
| 第71回日本薬学会関西支部 | 口頭 | 2021年10月 |
| 第71回日本薬学会関西支部 | 口頭 | 2021年10月 |
| 第71回日本薬学会関西支部 | 口頭 | 2021年10月 |
| 第71回日本薬学会関西支部 | 口頭 | 2021年10月 |
| 第71回日本薬学会関西支部 | 口頭 | 2021年10月 |
| 第47回反応と合成の進歩シンポジウム | 口頭 | 2021年10月 |
| 第47回反応と合成の進歩シンポジウム | 口頭 | 2021年10月 |
| 第49回複素環化学討論会 | 口頭 | 2021年10月 |
| 第49回複素環化学討論会 | 口頭 | 2021年10月 |
| 第15回バイオ関連化学シンポジウム | 口頭 | 2021年9月 |
| 日本生薬学会第67回年会 | 口頭 | 2021年9月 |
| 第41回有機合成若手セミナー「明日の有機合成を担う人のために」 | 口頭 | 2021年8月 |