

多段階連続酵素反応によるペプチド系抗生物質の試験管内完全合成と翻訳後修飾酵素群の基質認識の解明

東京大学大学院農学生命科学研究科 尾仲 宏康

【略歴】

1993年 3月 東京大学農学部農芸化学科卒業
1998年 3月 東京大学大学院農学生命科学研究科博士課程修了
博士（農学）取得
1998年 4月 日本学術振興会特別研究員
1999年 4月 富山県立大学工学部生物工学研究センター助手
2006年 4月 富山県立大学工学部生物工学科講師。
2010年 4月 富山県立大学工学部生物工学科准教授。
2012年 10月 東京大学大学院農学生命科学研究科微生物潜在機能探索寄付講座特任教授

リボゾームによって作られる抗生物質・RiPPs

抗生物質は感染症治療に利用される重要な天然物であるが、近年、多剤耐性菌の出現により新たな抗生物質の創製が必要となっている。天然物の中でも RiPPs と呼ばれるリボゾーム翻訳系を介して合成されるペプチド系抗生物質 (Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptides) は前駆体ペプチドが遺伝子に構造遺伝子としてコードされており、リボゾーム翻訳系を介して基質ペプチドが合成され、その後に翻訳後修飾酵素 (PTM 酵素) が基質ペプチドを修飾することにより産生される。そのため、遺伝子の塩基置換により多様なアナログ体を創製できることが特徴であり、特に医薬品探索のような多様なアナログ体を調製する必要のある際に有利である。RiPPs の構造多様性の創出には PTM 酵素の機能解析が必要不可欠であり、現在、様々な RiPPs の PTM 酵素に関して欧米を中心に精力的な研究が続けられている。

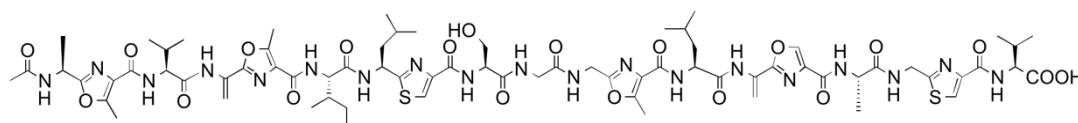
新規薬剤作用機作を有するゴードスポリン

RiPPs に含まれる化合物はその翻訳後修飾の様式、化合物が環状構造か直鎖構造かなどの違いによって幾つかのグループに分けられる。ゴードスポリン (GS) は我々が 1999 年に放線菌 *Streptomyces* sp. TP-A0584 より発見した直鎖構造の RiPPs であり、内部にデヒドロアラニンとアゾール環を有している。GS は放線菌の二次代謝と形態分化を誘導する化合物として単離されたが、その後、タンパク質の局在化に関与する SRP (Signal Recognition Particle) が GS の結合標的であることがわかった。SRP の阻害剤はこれまでに報告例がなく、そのため GS を用いた新規作用機序による抗生物質の創製が期待される。

多段階連続酵素反応によるゴードスポリンの試験管内完全合成

RiPPs の特徴は塩基置換によって構造遺伝子の配列を置換するだけで、多様な類縁体を創出できる点であるが、従来の組換え放線菌を作出する方法を用いた類縁体作製では多種類の遺伝子組換え形質転換体を用意することが律速となってしまう。そこで、本研究では、PTM 酵素を組換えタンパク質としてあらかじめ調製しておき、無細胞翻訳系と組み合わせることによって、生体を使わずに試験管内で簡便に GS およびその類縁体を創製するシステムを開発した。GS 合成遺伝子は全部で 10 個の *god* 遺伝子からなるクラスターを形成している。

そのうち、*godA* は構造遺伝子であり、ゴードスポリンの前駆体ペプチドをコードしている。翻訳後修飾酵素は *godD*, *godE*, *godF*, *godG*, *godH* の 5 つであり、それぞれ、アゾール環形成、デヒドロアラニン形成、N 末アセチル化をしていると推定されている。本システムにおいては無細胞翻訳系を用いて *godA* よりゴードスポリン前駆体ペプチドを調製し、これに大腸菌組換え蛋白質として調製した GodD、GodE を反応させることによるアゾール環の形成、GodF、LazF (GodG のホモログ) によるデヒドロアラニン形成、GluC によるリーダー配列消化、GodH による N 末アセチル化反応を試験管内でワンポットに行うことによりゴードスポリンの全合成を達成した。本システムではプラスミド構築などの面倒な作業を必要とせず、人工遺伝子等でも調製可能な、わずか 200 bp 長の遺伝子を投入するだけで、1 日で GS の合成が達成される。



ゴードスポリンの化学構造

今後の展望

今回確立した GS の試験管内完全合成系を用い、PTM 酵素の基質認識の解析を迅速に進めることにより GS 類縁体の合理的な設計手法を確立したい。また、本合成系を他の RiPPs 生合成にも適応することにより、様々な RiPPs の迅速簡便な合成系の確立を目指し、RiPPs を用いた創薬へとつなげたい。

謝辞

本研究は主に東京大学微生物潜在機能探索寄付講座において行われたものであり、本研究に携わった浅水俊平特任助教、尾崎太郎特任助教、菅井佳宣特任助教ならびに学生諸氏に心より感謝申し上げます。また、無細胞翻訳系の供与などで多大な協力を賜りました東京大学理学部菅裕明教授、後藤佑樹准教授に御礼申し上げます。

参考文献

1. T. Ozaki, K. Yamashita, Y. Goto, M. Shimomura, S. Hayashi, S. Asamizu, Y. Sugai, H. Ikeda, H. Suga, and H. Onaka. Dissection of goadsporin biosynthesis by *in vitro* reconstitution leading to designer analogs expressed *in vivo*. *Nature communications*, 8:14207 (2017)
2. T. Ozaki, Y. Kurokawa, S. Hayashi, N. Oku, S. Asamizu, Y. Igarashi, and H. Onaka Insights into the biosynthesis of dehydroalanines in goadsporin. *ChemBioChem*, 17(3):218-223 (2016)
3. K. Haginaka, S. Asamizu, T. Ozaki, Y. Igarashi, T. Furumai, and H. Onaka. Genetic approaches to generate hyper-producing strains of goadsporin: the relationships between productivity and gene duplication in secondary metabolite biosynthesis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 78(3): 394-399 (2014)
4. S. Hayashi, T. Ozaki, S. Asamizu, H. Ikeda, S. Ōmura, N. Oku, Y. Igarashi, H. Tomoda, and H. Onaka. Genome mining reveals a minimum gene set for the biosynthesis of 32-membered macrocyclic thiopeptides lactazoles. *Chem. Biol.*, 21(5): 679-688 (2014)
5. H. Onaka, M. Nakaho, K. Hayashi, Y. Igarashi, and T. Furumai, Cloning and characterization of goadsporin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. TP-A0584. *Microbiology*, 151: 3923-3933 (2005)
6. H. Onaka, H. Tabata, Y. Igarashi, Y. Sato and T. Furumai, Goadsporin, a chemical substance which promotes secondary metabolism and morphogenesis in streptomycetes. I. Purification and Characterization, *The Journal of Antibiotics*, 54, 1036-1044, (2001)