

# 研究報告書

## 「無細胞合成生物学による人工二次代謝産物の発見と生産」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研究者: 後藤 佑樹

### 1. 研究のねらい

幅広い生物種において、多種多様な二次代謝産物が産生されている。これらは産生生物の発生・生殖・細胞増殖などには必須でないものの、異種間の攻撃/防御や病原体の感染防御に利用されており、生物の効率的な生存に重要な役割を果たしている。これら二次代謝産物の中には、産生生物にとってだけでなく人類にとっても有用な生物活性を示すものがあり、古くから薬剤として活用されてきた。しかしながら、この古典的な薬剤開発アプローチでは、天然から発見される化合物に頼っているため、生命が進化の過程で必要とした活性の分子しか入手できず、人類が求める任意の生物活性分子を得られる訳ではない、という潜在的な制限が存在していた。

本研究では、天然の二次代謝産物の化学的な骨格モチーフを活かしつつも、全体的な構造は人工かつ新規な、『人工二次代謝産物』という化合物を提唱している。高い薬効を示す天然物を骨格モチーフとしていることから、人工二次代謝産物は強い生物活性や良好な薬物動態が期待される上、人工的に構築した大規模化合物ライブラリーから望みの生物活性を示す新規化合物を *de novo* に開発するため、任意の活性を示す薬剤の開発が原理上可能である。

具体的には、人工二次代謝産物ライブラリーの構築及び目的活性種の発見を、一貫した試験管内再構成アプローチにより実施することを目指した。この一連の研究を通し、「進化の過程で偶然生み出された二次代謝産物を発見/利用するというセレンディピティーに頼ったアプローチ」から、「人類が必要な効能を持つ化合物を自在に創り出すアプローチ」へとパラダイムシフトを起こすことを長期的な最終目標としている。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では、『人工二次代謝産物』の候補化合物として、天然の二次代謝産物に多くみられる、ヘテロ環骨格を主鎖に含むペプチドに着目した。主鎖ヘテロ環骨格は、ペプチダーゼによる分解に対する耐性や標的分子への結合において大きな役割を果たしており、強い生理活性を示すペプチド性天然物の重要な骨格モチーフである。この様な背景から、ヘテロ環骨格含有ペプチドは天然の二次代謝産物としてだけでなく、人工の生物活性分子の候補としても有望な化合物群ではないかと考えた。

具体的には、無細胞翻訳反応と二次代謝産物の生合成酵素とを試験管内で再構成することで、ヘテロ環骨格含有ペプチドを簡便に合成する *in vitro* 人工生合成システムを創製した。また、この人工生合成系を活用して、生合成酵素の基質認識メカニズムを解明する一方で、酵素の改変や有機化学反応との組み合わせにより、より幅広い種類のヘテロ環骨格含有ペ

プチドが生産できることも実証した。さらに、圧倒的な多様性(1兆種類)をもつランダム二次代謝産物ライク化合物ライブラリーを構築し、望みの標的タンパク質に結合する活性種を迅速にスクリーニングする試験管内分子進化系の確立にも成功している。

## (2) 詳細

研究テーマ A「改変無細胞翻訳系と翻訳後修飾酵素とを融合した in vitro 人工生合成システムの創成」

脱水ヘテロ環化酵素 PatD と再構成型無細胞翻訳系とを用いたアゾリン骨格含有ペプチドの試験管内生合成系を確立した。本生合成系では、基質の DNA 鎖を加えてインキュベートするだけで、転写反応・翻訳反応・アゾリン環修飾の三ステップの反応が一つのチューブ内で進行し、DNA にコードされた配列のアゾリンペプチドが、選択的かつ高純度に生産されるという特徴を持つ。既存のいかなる合成法と比べても、簡便かつ高汎用性のアゾリンペプチドの生産手法であると言える。

また、別の主鎖ヘテロ環骨格であるアゾール骨格の試験管内生合成システムの構築にも成功している。これについては、申請書で提案した酸化酵素 PatG を用いたアプローチは断念したものの (PatG の酵素活性は試験管内で再構成するのが非常に困難であることを実証した)、酵素的翻訳後修飾と化学的翻訳後修飾とを組み合わせる別の戦略で達成した。これにより、芳香族性のメチルオキサゾール骨格を含む任意のペプチドを生産可能な試験管内人工生合成系を確立した。

研究テーマ B「ペプチド骨格の変換を行う翻訳後修飾酵素反応の分子メカニズムの解明」

テーマ A で開発した試験管内生合成系を活用し、翻訳後修飾酵素の触媒特性及び基質特異性を迅速に評価する方法論を開発した。これにより、PatD 酵素の基質特異性を網羅的に解析し、未知の部分が多かった PatD の基質認識機構に関する新たな知見を、以下の通り得た。

- ・ 基質上に強く保存されている 37 残基のリーダー配列が酵素の活性化に関わることを明らかにした。
- ・ 酵素の活性化に必要な、リーダー配列上の重要なアミノ酸残基を同定した。
- ・ これまで「認識配列」と呼ばれていた、基質上に強く保存される 8 残基の配列モチーフが実際には酵素反応に重要でないことを発見した。実際には、認識配列はリーダー配列と被修飾領域との間に存在するスペーサーとしての役割を持つことを提唱している。
- ・ 以上の結果を基に、PatD 酵素による修飾を受けうる最小のペプチド(ミニマム基質ペプチド)を設計し、実際にアゾリン骨格が酵素により導入されることを実証した。

これらの知見は、これまで不明であった翻訳後修飾型のペプチド修飾酵素の基質認識機構を世界で初めて明らかにしただけでなく、後述するテーマ D におけるアゾリンペプチドライブラリー構築のための基質ペプチドライブラリーを設計する上で重要な情報となった。

研究テーマ C「様々な二次代謝産物ライク化合物の in vitro 生合成」

天然に存在する PatD の基質ペプチドの配列は、その長さや構成アミノ酸が限られており、

PatD が相応の基質特異性を持つことが想定された。この修飾酵素の基質特異性は、人工二次代謝産物候補の化合物ライブラリーの構築に利用する上で障害となる可能性がある。しかしながら、試験管内で反応条件を最適化した本研究の生合成系においては、天然には存在しない様々な配列要素をもつ人工アゾリンペプチドを合成できることが明らかになった。また、遺伝暗号のリプログラミング法を利用した翻訳合成で生産した非タンパク質性アミノ酸を持つ基質ペプチドを PatD で修飾することで、多彩な非天然型アゾリン骨格を構築できることも実証した。この様に、基質ペプチド配列と、合成されるヘテロ環骨格の両方について大きなバリエーションを持たせられることを示したことで、多種多様な二次代謝産物ライク化合物を生産できる生合成系が確立された。

計画書で提案した上記の目標に加え、

- ・ 合成したアゾリンペプチドを化学的に還元することで、アゾリジン骨格含有ペプチドを簡単に生産する手法を確立した。
  - ・ 天然では基質上に存在するリーダー配列を PatD 酵素上に移植することで、自己活性化させた人工改変 PatD 酵素の構築に成功した。これにより、リーダー配列を持たないアゾリンペプチドの合成も可能となった。
  - ・ 自己活性型の修飾酵素を用い、大環状アゾリンペプチドの試験管内生合成にも成功した。
- といった成果も研究展開の中であげることができ、多種多彩なヘテロ環含有ペプチドを簡単に合成する複数の生合成ツールの確立に成功した。

#### 研究テーマ D「細胞機能を制御する新規人工二次代謝産物の探索」

本テーマでは、上記で開発した試験管内生合成系を活用することで、人工二次代謝産物の候補となりうるアゾリン環含有ペプチドの大規模ライブラリーを構築した。具体的には、ランダム縮重コドンからなる mRNA ライブラリーをまとめて生合成系に加えることで、1兆種類を超える異なるアゾリンペプチドの集団をワンポットで生産した。さらに、mRNA ディスプレイ法を組み合わせ、この大規模ライブラリーの中から、任意の標的タンパク質に結合する活性種を迅速に探索する試験管内分子進化実験系を確立することにも成功した。実際に本手法を用いてヒストンやチューブリンの脱アセチル化に関与するタンパク質 SIRT2 に選択的に結合するアゾリンペプチドの探索を実施し、SIRT2 を阻害する人工二次代謝産物の候補となるアゾリンペプチドを複数同定した。

### 3. 今後の展開

今後は、本研究で確立した人工生合成系と試験管内分子進化系を用いることで、新奇な生物活性を示す人工化合物の創製と生産を目指した研究を、引き続き実施する。天然には存在しない人工二次代謝産物の存在を実証できれば、天然物は現在発見されている以外の生物活性を示し得ないのか？という命題に一定の答えを与えることとなり、「天然化合物の進化と起源」研究に新たな一石を投じうると期待している。

また、高い薬効を示す天然物をモチーフとしていることから、本研究の人工二次代謝産物は既存の創薬アプローチでは対応困難であった疾病関連タンパク質に対しても有効であることが期待される。本研究の人工二次代謝産物を新機軸の創薬候補分子群として活用し、次世代バイオ医薬品として活用する研究も今後も展開する計画である。

## 4. 評価

### (1) 自己評価

(研究者)

計画書で設定した目標の多くは、順調に成果をあげることができたと考えている。特に、研究テーマAとCでは、上で詳述した通り、想定外の研究成果を多く得ることができた。テーマDについては、現時点では人工二次代謝産物の候補化合物を同定したところであり、今後生物活性を確認する必要は残っているものの、本さがけ研究を展開する中で得たノウハウの蓄積は膨大であり、今後の展開も順調に進むと期待している。

また、本さがけ研究の実施体制としては、少人数の学生に参画してもらい、各人に責任を持って取り組める個別の研究テーマを設定する方針で研究を進めた。それにより、学生の責任感と潜在能力を引き出すことに成功し、それが上記の予想以上の成果に繋がったと自負している。

本さがけ研究では、二次代謝産物の類似化合物の汎用合成ツールを開発し、合成化学やケミカルバイオロジーの分野において大きな成果をあげたと自負している。しかし、本計画で目標設定し達成した成果は、あくまでも大きな最終目標に向けた研究展開の第一歩と想定している。今後本成果を発展させることで、より多くの人工二次代謝産物を開発し、新機軸の創薬モチーフとしての地位を確立できれば、既存とは一線を画した新しい創薬アプローチを提示でき、薬学や医学の分野への波及効果を通じて、社会に大きな貢献ができると期待している。

### (2) 研究総括評価

脱水ヘテロ環化酵素PatDを用いたアゾリン骨格含有ペプチドの試験管内生合成系を確立して、ヘテロ環骨格含有ペプチドを簡便に合成するin vitro人工生合成システムを創製しました。この人工生合成系を活用して、生合成酵素の基質認識メカニズムを解明する一方で、酵素の改変や有機化学反応との組み合わせにより、より幅広い種類のヘテロ環骨格含有ペプチドの生産ができることを実証しました。さらに、多様性(1兆種類)をもつランダム二次代謝産物ライブラリーを構築し、望みの標的タンパク質に結合する活性種を迅速にスクリーニングする試験管内分子進化系の確立にも成功しています。

創薬スクリーニングに欠かせない最新技術として、注目を集め、製薬業界から高い評価を得ています。生物と非生物の融合の分野で、このさがけの短い期間中に多くの成果を挙げられました。そして、これらの成果は、PNAS論文や特許出願(2件)で、公開し、形にしていることも高く評価します。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. B.J. Desai; Y. Goto; A. Cembran; A.A. Fedorov; S.C. Almo; J. Gao; H. Suga; J.A. Gerlt  
Investigating the role of a backbone to substrate hydrogen bond in OMP decarboxylase using a site-specific amide to ester substitution, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,

2014.Oct.21:111(42):15066-71.
2. Y. Goto; Y. Ito; Y. Kato; S. Tsunoda; H. Suga One-pot synthesis of azoline-containing peptides in a cell-free translation system integrated with a posttranslational cyclodehydratase, Chem. Biol., 2014, 21, 766-74.
3. T. Passioura; T. Katoh; Y. Goto; H. Suga Selection-based discovery of druglike macrocyclic peptides, Annu. Rev. Biochem., 2014, 83, 727-52.
4. Y. Goto; M. Iseki; A. Hitomi; H. Murakami; H. Suga Nonstandard peptide expression under the genetic code consisting of reprogrammed dual sense codons, ACS Chem. Biol., 2013, 8, 2630-4.
5. Y. Goto; S. Tsunoda; Y. Kato; Y. Ito; H. Suga PatD-FIT system: A versatile synthetic tool for azoline-containing peptides, Pept. Sci., 2013, 50, 89-90.

(2)特許出願

研究期間累積件数:2件(1件非公開)

1.  
 発明者: 菅裕明、後藤佑樹、角田翔太郎  
 発明の名称: ヘテロ環を含む化合物の製造方法  
 出願人: 国立大学法人東京大学  
 出願日: 2013/3/7  
 出願番号: 特願 2013-45888

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 2013年4月 文部科学大臣表彰 若手科学者賞
2. 2013年3月 日本化学会第93春季年会 優秀講演賞(学術)
3. 2013年9月 生体機能関連化学部会講演賞
4. 2013年11月 Excellent Stone Award
5. 2014年3月 日本化学会第94春季年会 若い世代の特別講演