

古代天然物から紐解く天然物の進化と新規分子設計

Department of Paleobiotechnology, Leibniz Institute for
Natural Product Research and Infection Biology,
静岡県立大学 薬学部
日置 裕介

Introduction

天然物は、何千何万年もの間激しい生物間競争を勝ち抜いた結果として生物活性に特化しており、医薬品など有用物質の創出に大きく貢献している。しかしながら、天然物がどのような構造変遷を経て生物活性を獲得し、向上させてきたのか、という進化的側面は全く明らかになっていない。留学先 (Leibniz-HKI) の Pierre Stallforth 教授らは、現在までに世界で唯一、古代ヒト科の歯垢化石に遺された微生物遺伝子の異種発現に成功し、古代天然物探索の突破口を開いた。

留学先では、古代天然物の探索・取得と、進化過程における天然物の構造変化の解明、ならびに進化過程に基づいた新しい分子設計法の提案を目的として研究を行った。以下、その結果について報告する。なお、留学先機関との相談の結果、知的財産権の観点から本報告書では詳細な解析手法や得られた研究成果に関しては伏せさせて頂きたい。

Result

1. 古代微生物由来生合成遺伝子クラスター (BGC) の探索

はじめに、留学先の研究室で開発された BGC 解析パイプライン *nf-core/funcscan* を用いて、古代微生物メタゲノムから BGC の検出を試みた。当初の予定では、非リボソームペプチド・ミュータノバクチンの古代 BGC に着目して本研究を進めるつもりであったが、古代微生物メタゲノムは損傷が激しく断片化が進んでおり、非リボソームペプチドのような比較的大きな BGC は完全にはアセンブルできていなかった。そこで、比較的小さな BGC から生合成されるリボソーム翻訳系翻訳後修飾ペプチド (Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides, RiPPs) に着目して研究を進めることとした。

RiPPs の 1 種であるラツソペプチドは、投げ縄構造を持つ環状ペプチドであり、抗菌活性や抗ウイルス活性等の様々な生物活性を示すことが知られている。その BGC は主に、リーダーペプチドとコアペプチドからなる前駆体ペプチド、リーダー配列を認識する RiPP recognition element (RRE)、リーダーを除去するペプチダーゼ、N 末端アミノ酸とグルタミン酸またはアスパラギン酸残基のアミド結合形成を触媒し、投げ縄構造を構築する環化酵素から構成される。このうち、コアペプチドの構造に大きく関連する環化酵素に特に注目して古代 BGC の探索を行った。その結果、約 3 万年前の古代ヒト科歯垢化石サンプルから、これまでに前例のない N 末端アミノ酸を有する古代ラツソペプチド BGC を発見した。

また、異常アミノ酸のランチオニンを含むランチペプチドや、アゾール環を持つチオペプチドなどの他の RiPP BGC についても、それぞれに特徴的な生合成酵素に基づいて古代メタゲノムを探索することにより、ユニークなコアペプチドを持つ古代 BGC や、現代 BGC の進化中間体のような古代 BGC を数個見出した。

2. 放線菌を用いた高効率異種発現系の開発と古代 BGC の異種発現

古代メタゲノムの更なる解析により、見出された古代 BGC の多くが放線菌 (Actinomycetota) 由来で

あることが予想された。古代 BGC の生合成産物を取得するため、続いて放線菌を宿主として用いる高効率な異種発現系の確立を行った。複数の発現プロモーターとリボザイム、リボソーム結合部位の組み合わせを 5 種の異種発現宿主で試験し、色素生産を指標とした予備的実験の結果、試験した全ての宿主で高収量かつ安定した色素生産が得られる発現系を開発した。

開発した発現系を用いて、古代ラッソペプチド BGC を 5 種の異種発現宿主で発現させたところ、すべての BGC 導入変異体において予想されるラッソペプチドの生産が確認された。なお、既存の発現系を含む他の発現系では、一部またはすべての宿主においてラッソペプチドの生産は確認できなかった。古代ラッソペプチド BGC を導入した変異体の大量培養により、目的の新規ラッソペプチドを単離精製し、高分解能 MS および各種 NMR スペクトル解析によって、その投げ縄構造と特徴的な N 末端アミノ酸残基の存在を確認した。

現在、留学先機関内で今回発見した新規ラッソペプチドの各種生物活性試験を行っている。今後は、生物活性試験の結果と併せたその進化過程の考察、ならびに進化過程に基づく分子設計について進めていく。また、古代 BGC 探索により見出した他の RiPP BGCs についても、それらの異種発現・アミノ酸変異実験を介したペプチド系天然物の進化を探る研究を進めていく予定である。本研究結果の一部は、2025 年 5 月にドイツ・ザールブリュッケンで開催される国際学会 International Conference on Anti-infectives 2025 (ICA 2025) にて発表予定である。

最後に

本留学では、古代天然物という魅力的でチャレンジングなテーマに携わらせていただき、刺激的な日々を過ごさせていただいた。自分にとって新たな生合成に関する知識や技術、加えて研究テーマに対する柔軟性など、今後研究を進める上で多くの重要なことを学ぶことができた留学期間であった。古代メタゲノムデータに関する質的・技術的な限界から、当初研究対象として考えていた BGC が見つからなかったときは焦りを感じたが、方向性を保ちつつ古代メタゲノムデータの現実と向き合って研究を進めるため、研究対象を RiPPs へと変更したことで興味深い BGC を見出すことができた。色々と限界はあるものの、古代メタゲノムデータは依然魅力的で、様々な研究分野において高いポテンシャルを有していると感じている。

最後に、非常に有益な留学期間を経済的に支えていただきました、アステラス病態代謝研究会の皆様にご心より感謝申し上げます。