

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：32702

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H02842

研究課題名（和文）翻訳後修飾を受けた新規ペプチドフェロモンの探索

研究課題名（英文）Screening of novel post-translationally modified peptide pheromone

研究代表者

岡田 正弘（Masahiro, Okada）

神奈川大学・工学部・教授

研究者番号：40377792

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：これまでに枯草菌のみにしか確認されていなかった、翻訳後修飾によるトリプトファン残基のプレニル化が、放線菌やシアノバクテリアなどの様々なバクテリアに広く存在する普遍的な翻訳後修飾の様式であることが判明した。さらに、トリプトファン残基ではなくヒスチジン残基のプレニル化酵素をシアノバクテリアから発見した。他の修飾様式を含めたヒスチジン残基の修飾酵素の報告例は全くなく、新規性の非常に高い翻訳後修飾酵素であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに枯草菌のみにしか確認されていなかった、翻訳後修飾によるトリプトファン残基のプレニル化が、放線菌やシアノバクテリアなどの様々なバクテリアに広く存在する普遍的な翻訳後修飾の様式であることが判明した。さらに、トリプトファン残基ではなくヒスチジン残基のプレニル化酵素をシアノバクテリアから発見した。他の修飾様式を含めたヒスチジン残基の修飾酵素の報告例は全くなく、新規性の非常に高い翻訳後修飾酵素であった。

研究成果の概要（英文）：Although post-translational prenylation of tryptophan residue had been identified only in *Bacillus subtilis*, it was found to be a universal pattern of post-translational modification widely observed in various bacteria, including Actinomycetes, Cyanobacteria, Chloroflexi, and Clostridia. Furthermore, post-translational prenylation enzyme of histidine residue has been identified from Cyanobacteria. It shows extremely high novelty because there is no report for post-translational modification of histidine residue at all.

研究分野：天然物化学

キーワード：翻訳後修飾 トリプトファン クオラムセンシング プレニル化 生物活性物質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

増殖の早い細菌にとって集団の数(密度)は重要な環境要因であり、クオラムセンシングと呼ばれる密度依存的な遺伝子発現制御機構により様々な現象を引き起こす。例えば、抗生物質や毒素の生産、バイオフィルムの形成、孢子形成や形質転換、生物発光など特徴的な多くの現象がクオラムセンシングによって制御されている。クオラムセンシングにおける細菌の密度感知方法は単純明快で、クオラムセンシングフェロモンと呼ばれるケミカルシグナルを常に分泌することである。すなわち、集団の密度をフェロモンの濃度に置き換えて感知しており、フェロモンが細菌の振る舞いを制御しているとも言える。

グラム陽性細菌である枯草菌は、クオラムセンシングにより自発的に形質転換を行うが、それを誘導するフェロモンが ComX フェロモンである。応募者らは、ComX フェロモンが、トリプトファン残基のイソプレニル化という新規翻訳後修飾を受けたオリゴペプチドであることを解明し^[1]、フェロモン活性を発現するためにはこの修飾構造が必須であることも明らかにした^[2]。一般的に、翻訳後修飾によるイソプレニル化とは、システイン残基のイソプレニル化のことを言い、担子菌の接合管の形成を誘導する性フェロモンに初めて発見された^[3]。その後、がん遺伝子産物である K-Ras などからも見つかり抗がん剤の標的タンパク質としての研究も行われている。現在ではシステイン残基のイソプレニル化は、真核生物に普遍的に存在し、タンパク質の機能発現を制御する翻訳後修飾であることが判明しているが、原核生物には存在しない。以上の学術的背景と両修飾様式の類似性から、トリプトファン残基のイソプレニル化は、原核生物に広く存在するタンパク質やペプチドの機能発現を制御する翻訳後修飾ではないかと考えた(図1)。

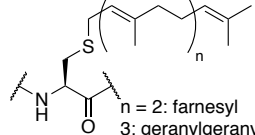
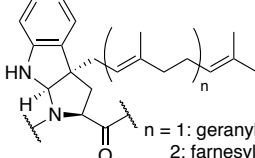
被修飾アミノ酸残基(コドン)	化学構造	初めて発見された物質	役割	普遍性
システイン (UGC,UGU)		担子菌の性フェロモン	タンパク質やペプチドの機能発現に必須	真核生物に普遍的
トリプトファン (UGG)		枯草菌のクオラムセンシングフェロモン	ペプチドの機能発現に必須	枯草菌のみ ↓ 原核生物に普遍的

図1. システインとトリプトファンの翻訳後修飾によるイソプレニル化の比較。

2. 研究の目的

仮に、システイン残基の場合と同様にトリプトファン残基のイソプレニル化が他の原核生物にも存在するならば、イソプレニルトリプトファンを有する未知のペプチドフェロモン、または機能性タンパク質が他にも存在する可能性が極めて高く、翻訳後修飾を介した新規制御機構の発見という卓越した成果が得られる。そこで、様々な細菌からイソプレニルトリプトファンを有する修飾ペプチドを探索し、その機能の解明を目的に研究することにした。

残念ながら、ComX フェロモンは難溶性であり分泌量も少なく、イソプレニルトリプトファン部分が化学的に不安定であったことから、培養液からの精製は極めて困難であった。さらに、ComX フェロモンのアミノ酸配列が菌株ごとに大きく異なり、トリプトファン残基以外の相同性が見いだせないため、今のところ、ランダムスクリーニングや相同性検索による発見例はなく、近縁種の納豆菌を含む枯草菌7株しかその存在が確認されていない(図2)。

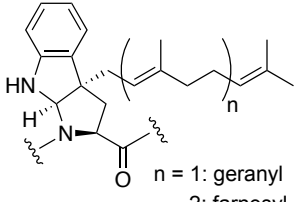
枯草菌株	アミノ酸配列	修飾様式	修飾トリプトファン W の化学構造
168	ADPITRQWGD	farnesylation	
RO-C-2	TREWDG	farnesylation	
Natto	KWPPIE	farnesylation	
RO-E-2	GIFWEQ	geranylation	
RO-B-2	YTNGNWVPS	geranylation	
RS-B-1	MMDWHY	geranylation	
RO-H-1	MLDWKY	geranylation	

図2. ComX フェロモンのアミノ酸配列と修飾構造。

ComX フェロモンは菌株ごとにアミノ酸配列が大きく異なるが、唯一保存されているトリプトファン残基のガンマ位がイソプレニル化され、さらにプロリン様の五員環が形成されている。

一般的に、クオラムセンシングフェロモンは種特異的に作用するため、細菌はフェロモンというそれぞれ異なるケミカルを言語として用いて会話をしていると言え、例えば腸内のような様々な細菌が共存する細菌叢においては様々なフェロモンが様々な濃度で存在していることになる。一方で、宿主はフェロモンに対する感知能力を独自に獲得し、サイトカインを分泌するなどの適応行動をする、すなわち、細菌の会話を盗み聞きしていることが近年明らかとなっている(図3)。したがって、翻訳後修飾を受けたペプチドフェロモンを介した異種間クロストークの解明研究へと展開可能であり、極めて先駆的、独創的な研究課題であると言える。また、前述したように、多くの現象がクオラムセンシング機構により制御されるため、クオラムセンシングを利用した医薬品開発や産業応用研究が精力的に進められている。特に、クオラムセンシング機構を阻害しても細菌が死滅するわけではなく、現象のみを特異的に誘導または抑制できるため、従来の抗菌剤では本質的に避けられない問題である薬剤耐性菌の出現を抑制できる理想的な抗菌剤である抗クオラムセンシング剤の開発に貢献できる成果となることが期待できる。

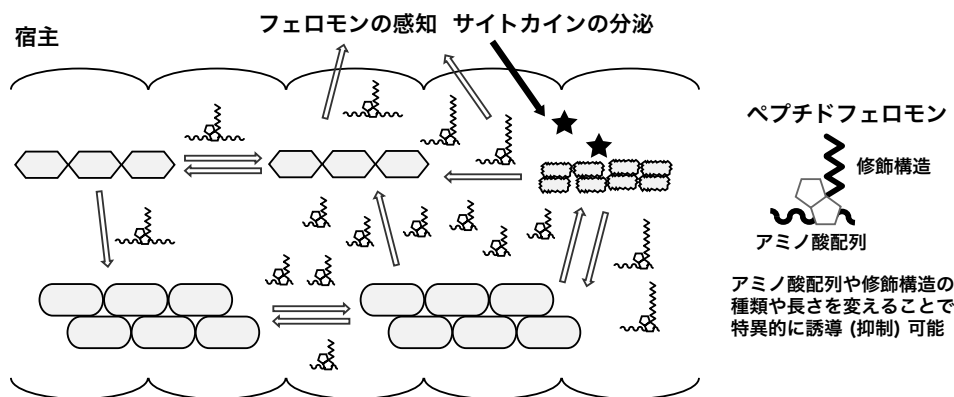


図3. フェロモンを介した異種間クロストークの模式図と修飾ペプチドフェロモンの概要。

3. 研究の方法

前述のように ComX フェロモンには相同性が見いだせないため、トリプトファンプレニル化酵素 ComQ に着目した相同性検索を行った。しかし ComQ はプレニルニリン酸合成酵素と相同性があるため、BLAST 検索や HMM 検索を用いて ComQ をクエリーとした相同性検索を行ったところ、既知のプレニルニリン酸合成酵素が上位に検出された。そこで ComQ の酵素活性に重要な役割を果たす擬イソペンテニルニリン酸結合モチーフに着目した。プレニルニリン酸結合モチーフを有する約 10 万種のタンパク質から、プレニルニリン酸合成酵素様のイソペンテニルニリン酸結合モチーフではなく、ComQ 様の擬イソペンテニルニリン酸結合モチーフを有するタンパク質を選別したところ、約 500 種類のタンパク質が選別でき、既知の ComQ を除くと、これらは全て機能未知の細菌由来タンパク質であった。その中から、枯草菌や納豆菌の属するフェルミキューテス門バチルス綱以外のシアノバクテリア門由来や、放線菌門由来や、クロロフレクサス門由来の候補タンパク質をコードする人工 DNA をそれぞれ購入した。また、嫌気性細菌であるフェルミキューテス門クロストリジヤ綱細菌が入手可能であったので購入し、その DNA を鋳型に用いて、発現プラスミドを作製し、大腸菌にて過剰発現を行った。なお、基本的に C 末端に His タグを導入したが、不溶性タンパク質となってしまった場合には N 末端に His タグを導入した発現プラスミドを作製し、大腸菌にて過剰発現を行った。一方で、基質となるトリプトファン含有ペプチドについては、トリプトファンそのものの誘導體や 2 残基目にトリプトファンを有するトリペプチドを化学合成により準備した。さらに、各種プレニルニリン酸 (ジメチルアリルニリン酸、ゲラニルニリン酸、ファルネシルニリン酸) も化学合成により準備した。化学合成した各種基質ペプチドと、各種プレニルニリン酸、各種候補タンパク質水溶液をそれぞれ用いて、 Mg^{2+} 存在下、*in vitro* プレニル化反応を行った。得られた反応液を ComX フェロモン検出法を参考にした LC-MS/MS 分析法を用いてプレニルトリプトファン誘導體もしくは含有ペプチドの検出を行った。

4. 研究成果

放線菌門由来の候補タンパク質は、トリプトファン誘導體とファルネシルニリン酸を用いた *in vitro* ファルネシル化反応により、トリプトファンプレニル化酵素であることが判明した。また、シアノバクテリア門由来やクロロフレクサス門由来の候補タンパク質は、2 残基目にトリプトファンを有するトリペプチドとファルネシルニリン酸を用いた *in vitro* ファルネシル化反応により、トリプトファンプレニル化酵素であることが判明した。また、フェルミキューテス門クロストリジヤ綱細菌由来の候補タンパク質は、トリプトファン誘導體もしくは 2 残基目にトリプトファンを有するトリペプチドと、ファルネシルニリン酸を用いた *in vitro* ファルネシル化反応により、トリプトファンプレニル化酵素であることが判明した。以上の結果から、トリプトファン残基のプレニル化は原核生物に広く存在するタンパク質やペプチドの翻訳後修飾様式であることが判明した。一方で、シアノバクテリア由来の候補タンパク質とゲラニルニリン酸を用いて *in*

vitro ゲラニル化反応を行ったところ、トリプトファン残基ではなく、ヒスチジン残基のゲラニル化酵素であることが判明した。他の修飾様式を含めたヒスチジン残基の修飾酵素の報告例は全くなく、新規性の非常に高い酵素であることが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 K. Hirooka, S. Shioda, and M. Okada.	4. 巻 84
2. 論文標題 Identification of critical residues for the catalytic activity of ComQ, a Bacillus prenylation enzyme for quorum sensing, by using a simple bioassay system.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biosci. Biotechnol. Biochem.	6. 最初と最後の頁 347-357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1685371.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ozaki Kaori, Jinno Atsuhide, Natsume Noriyuki, Sumimoto Shimpei, Iwasaki Arihiro, Suenaga Kiyotake, Teruya Toshiaki	4. 巻 85
2. 論文標題 Komesuamide and odopenicillatamide, two linear lipopeptides from the marine cyanobacterium <i>Caldora penicillata</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tetrahedron	6. 最初と最後の頁 131969 ~ 131969
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tet.2021.131969	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Zhang Yuchen, Hamada Keisuke, Nguyen Dinh Thanh, Inoue Sumika, Satake Masayuki, Kobayashi Shunsuke, Okada Chikako, Ogata Kazuhiro, Okada Masahiro, Sengoku Toru, Goto Yuki, Suga Hiroaki	4. 巻 5
2. 論文標題 LimF is a versatile prenyltransferase for histidine-C-geranylation on diverse non-natural substrates	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Catalysis	6. 最初と最後の頁 682 ~ 693
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41929-022-00822-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ohno Osamu, Iwasaki Arihiro, Same Kyouhei, Kudo Chihiro, Aida Erika, Sugiura Kazuya, Sumimoto Shimpei, Teruya Toshiaki, Tashiro Etsu, Simizu Siro, Matsuno Kenji, Imoto Masaya, Suenaga Kiyotake	4. 巻 24
2. 論文標題 Isolation of Caldorazole, a Thiazole-Containing Polyketide with Selective Cytotoxicity under Glucose-Restricted Conditions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 4547 ~ 4551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.2c01566	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉村果歩・石川まるみ・北川史也・入山瑠理・韋思思・高橋巧真・澄本慎平・岡田正弘
2. 発表標題 枯草菌由来トリプトファンプレニル化酵素の基質特異性に関する研究
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田正弘
2. 発表標題 シアノバクテリア由来のプレニル化酵素に関する研究
3. 学会等名 第34回海洋生物活性談話会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澄本 慎平
2. 発表標題 液相ペプチド合成を指向した疎水性アンカー分子の開発
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山田 涼生
2. 発表標題 ゲラニルトリプトファン残基を有するペプチド型フェロモンの構造活性相関研究
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村 香月
2. 発表標題 枯草菌由来のファルネシルトリプトファン残基を有するペプチドフェロモンの合成研究
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 澄本 慎平
2. 発表標題 シアノバクテリア由来の環状修飾ペプチドOscillatorinの合成研究
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ペプチドライブラリーの製造方法	発明者 菅裕明, 後藤佑樹, 阿部郁朗, 岡田正弘, 井上澄香.	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願 PCT/JP2019/40975	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	澄本 慎平 (Sumimoto Shimpei) (20852502)	神奈川大学・工学部・助教 (32702)	化学系研究の実行

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------