

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05722

研究課題名(和文) NRPS異性化酵素機能を解明する共有結合型分子ツールの開発

研究課題名(英文) Developing crosslinkers specific for epimerization domain in initiation modules to evaluate mechanism

研究代表者

石川 文洋 (Fumihito, Ishikawa)

近畿大学・薬学部・講師

研究者番号：50631553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、キャリアータンパク質担持型共有結合性異性化酵素阻害剤(クロスリンク剤)を設計および創製し、異性化酵素の触媒機構およびキャリアータンパク質認識機構を明らかにすることを目的とした。本研究では、クロスリンク剤の創製に成功した。また、チロシジン合成酵素TycAをモデルとして、異性化酵素の活性部位変異体を作製した。さらに、本クロスリンク剤を利用することでGlu882がクロスリンク剤との反応部位であることが明らかとなった。このことから、Glu882が異性化反応においてアミノ酸の位水素を引き抜く塩基触媒として作用していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発したクロスリンク剤を利用することで、1) 異性化酵素の触媒残基を捕捉することによる異性化機構の解明、2) 異性化反応の瞬間を捕捉することにより、異性化酵素とキャリアータンパク質相互作用の生化学的解析および異性化酵素とキャリアータンパク質複合体構造の結晶構造を解くこと、が可能となりペプチド系天然物の多様性の創出に関わる酵素の機能や構造が分子レベルで明らかになる。それら情報を基に合理的に生合成システムをデザインすることにより、天然にはないペプチド系化合物の創製など応用に結びつけることができる。

研究成果の概要(英文)：Nonribosomal peptide synthetases (NRPSs) unique molecular factories can produce peptides with nonproteinogenic D-amino acids in which the epimerization (E) domain catalyzes the conversion of L-amino acids to D-amino acids, but its mechanism remains not fully understood. Here, we describe the development of pantetheine crosslinking probes that mimic the natural substrate L-Phe of the initiation module of tyrocidine synthetase, TycA, to elucidate and study the catalytic residues of the E domain. Mechanism-based crosslinking assays and MALDI-TOF MS were used to identify both H743 and E882 as the crosslinking site residues, demonstrating their roles as catalytic bases. Mutagenesis studies further validated these results and allowed the comparison of reactivity between the catalytic residues, concluding that glutamate acts as the dominant nucleophile in the crosslinking reaction, resembling the deprotonation of the Ca-H of amino acids in the epimerization reaction.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：非リボソームペプチド合成酵素 異性化酵素 キャリアータンパク質 共有結合性異性化酵素阻害剤
タンパク質間相互作用

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

バンコマイシン、ダプトマイシン、シクロスポリンなどに代表されるペプチド系天然物は、医薬品の開発に利用されるなど、創薬における役割は非常に大きい。ペプチド系天然物の多くは、非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) により合成される (Hur, G.H. *et al. Nat. Prod. Rep.* 2012, 10, 1074).¹ NRPS は、複数の酵素ドメインが連結したモジュールと呼ばれる基本単位からなる巨大ポリペプチドである (図 1A)。NRPS の酵素触媒機構は、I. アデニレーション (A) ドメインがアミノ酸基質をアミノアシル-AMP に活性化する (図 1B); II. チオレーション (T) ドメインのホスホパンテテイン末端チオール基によるアミノアシル-AMP への求核攻撃により、チオレーションドメインがアミノ酸基質を共有結合により担持する (図 1B); III. コンデンセーション (C) ドメインがチオレーションドメインに担持されたアミノ酸のペプチド結合形成反応を触媒する (図 1A)。最後に、チオエステラーゼの作用により、生じたポリペプチド中間体が環化することで、ペプチド系天然物が合成される (図 1A)。

ペプチド系天然物は、D-アミノ酸、N-メチルアミノ酸、ヒドロキシカルボン酸などを含有することで構造的多様性を広げ、強力な生物活性を示すものが多く発見されている。また、これらの特殊アミノ酸の存在により、ペプチダーゼに対する抵抗性や骨格的剛直性・脂溶性・膜透過性の向上がもたらされる。ペプチド系天然物の多様性は、NRPS の利用するアミノ酸基質の違いやアミノ酸修飾酵素の違いにより生み出される。そのため、ペプチド系天然物合成に関わる修飾酵素群の酵素化学的性質や構造を明らかにすることができれば、その情報を基に人為的に修飾酵素の改変を行い、有用な生理活性を有するペプチド系化合物の創製など、応用研究に結びつけることができる。

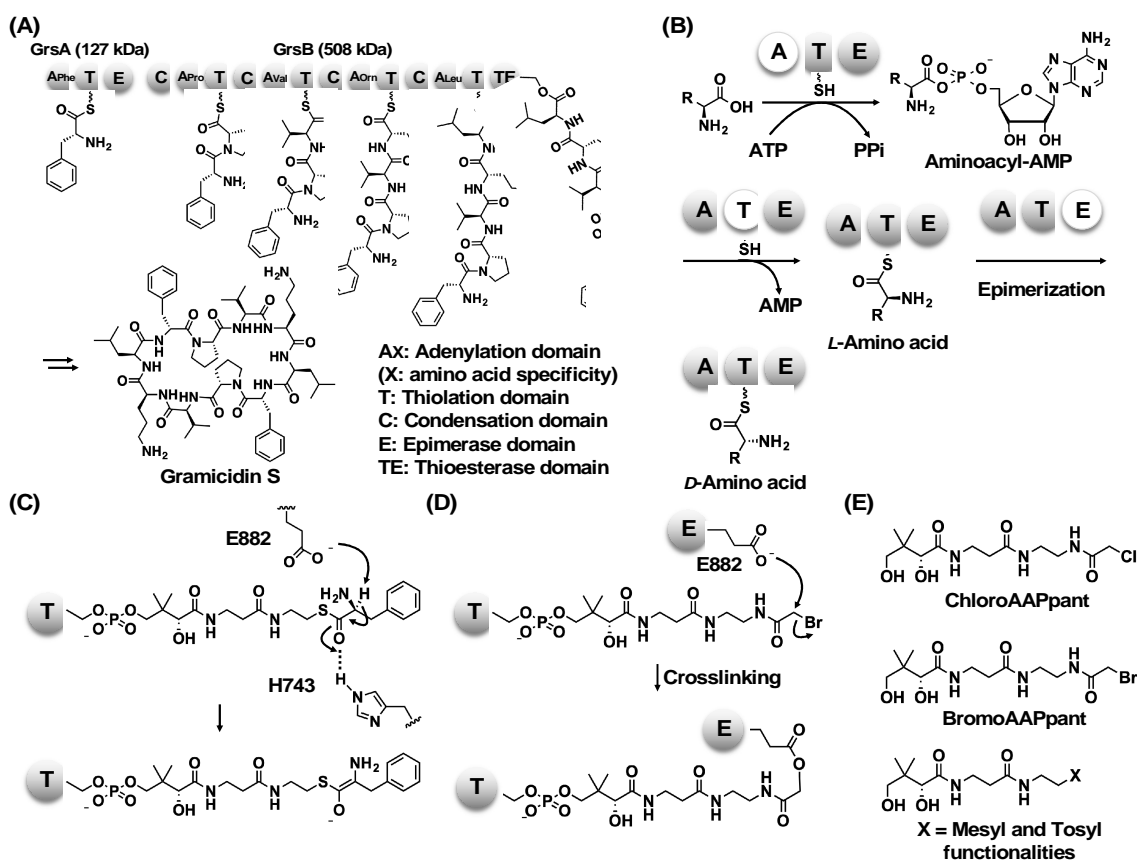


図 1. (A) グラミシジン S 生合成経路. (B) アデニレーションドメイン, チオレーションドメイン, エピメラーゼドメインの機能. (C) エピメラーゼドメインが触媒するアミノ酸異性化機構. (D) クロスリンク反応機構. (E) チオレーションドメイン担持型共有結合性エピメラーゼドメイン阻害剤.

2. 研究の目的

ペプチド系天然物の生合成過程において重要なアミノ酸修飾酵素であるエピメラーゼ (E) ドメインは、チオレーションドメインに担持された L-アミノ酸の D-アミノ酸への異性化反応を触媒する (図 1B および 1C)。そのため、アミノ酸基質を厳密に認識するだけでなく、チオレーションドメインに関して他のチオレーションドメインと区別して特異的に認識する。エピメラーゼドメインはペプチド骨格の多様性創出に重要な役割を有しているにも関わらず、酵素化学

的性質（基質特異性、反応機構、タンパク質間相互作用）はほとんど明らかになっていない。また、エピメラーゼドメイン-チオレーションドメインタンパク質間相互作用は一時的で弱く、複合体の生化学的および構造生物学的解析が難しいため、これまでにエピメラーゼドメインによるチオレーションドメインの認識機構は明らかになっていない。そこで、チオレーションドメイン担持型共有結合性エピメラーゼドメイン阻害剤を創製し、反応機構のみならずタンパク質間相互作用まで明らかにすることを目的とした（図 1D および 1E）。

3. 研究の方法

(1) 共有結合型エピメラーゼドメイン阻害剤の設計および合成

異性化酵素に作用する化合物は、ピリドキサルリン酸依存型アラニンラセマーゼに選択的な不可逆的阻害剤クロロビニルグリシンが報告されているのみである。^{2,3} エピメラーゼドメインの異性化機構は、グラミシジン S 生合成に關与する GrsA-NRPS (A_{Phe}-T-E) のエピメラーゼドメインの生化学的解析により、753 番目のヒスチジンおよび 976 番目のチロシンの關与する“二塩基機構”が、⁴ また、チロシジン生合成に關与する TycA-NRPS (A_{Phe}-T-E) のエピメラーゼドメインの X 線結晶構造解析より、743 番目のヒスチジンおよび 882 番目のグルタミン酸が關与する“酸塩基触媒機構”が提案されている（図 1C）。⁵ そこで、ヒスチジン、チロシン、グルタミン酸の求核攻撃による共有結合形成を期待して（図 1D）、S_N2 反応の良い脱離基であるメシル基およびトシル基を選択した。また、メシル基およびトシル基をパントテン酸へ連結し、チオレーションドメインへ担持可能なエピメラーゼドメイン阻害剤の設計を行なった（図 1E および図 2）。さらに、リンカーの長さを検討できるよう、炭素鎖の異なるリンカーを導入した（図 2）。

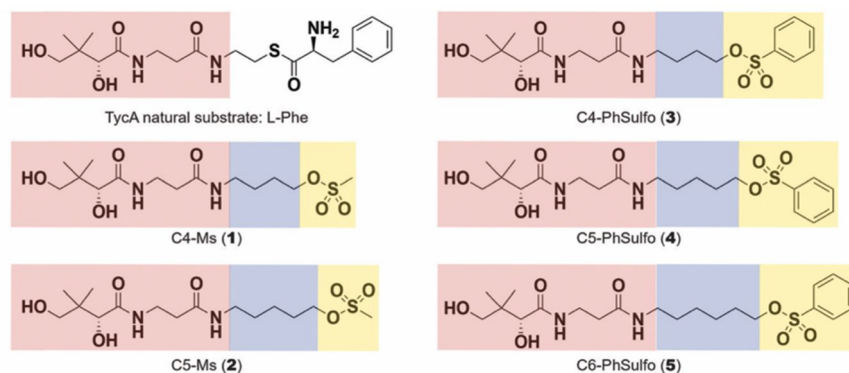


図 2. チオレーションドメイン担持型共有結合性エピメラーゼドメイン阻害剤の分子デザイン。⁶

(2) 共有結合型エピメラーゼドメイン阻害剤の機能評価

チロシジン生合成において、L-Phe を D-Phe に異性化する TycA-NRPS (A_{Phe}-T-E) を利用し、エピメラーゼドメイン阻害剤の機能解析を行なった。まず、TycA-NRPS (A_{Phe}-T-E) をヒスチジntag融合タンパク質として大腸菌にて調製後、ワンポット化学酵素合成法を活用し、⁷ エピメラーゼドメイン阻害剤を TycA-NRPS (A_{Phe}-T-E) のチオレーションドメインへ担持させる。ワンポット化学酵素合成法に必要なホスホパンテテイン転移酵素 Sfp はヒスチジntag融合タンパク質として、CoA 生合成酵素 CoaA, CoaD および CoaE はマルトース結合タンパク質 (MBP) 融合タンパク質として調製する。続いて、エピメラーゼドメインとのクロスリンク反応を検討した。さらに、クロスリンク反応条件 (pH, 温度, 時間) の最適化を実施する。これにより、クロスリンク反応効率の高いエピメラーゼドメイン阻害剤を選別する。また、クロスリンク生成物を切り出し、ゲル内酵素消化, MS/MS 解析により反応部位 (アミノ酸) を同定する。

(3) エピメラーゼドメイン異性化機構の解明

TycA-NRPS (A_{Phe}-T-E) エピメラーゼドメインの活性部位アミノ酸を 1 つずつアラニンに置換した TycA-NRPS (A_{Phe}-T-E) エピメラーゼドメイン変異体が大腸菌組換えタンパク質として調製する。変異導入部位として、743 番目のヒスチジン、882 番目のグルタミン酸、858 番目のアスパラギン酸、872 番目のセリン、873 番目のリジン、876 番目のグルタミン、880 番目のヒスチジン、887 番目のヒスチジンを選択した。クロスリンク反応を指標とすることで、アミノ酸異性化機構に關与する触媒残基を同定する。また、TycA-NRPS (A_{Phe}-T-C) および TycB1-NRPS (A_{Pro}-T-C) によるジケトピペラジン (DKP) 生成反応を利用した酵素化学的解析を行う。また、TycB1-NRPS (A_{Pro}-T-C) をヒスチジntag融合タンパク質として大腸菌にて調製する。TycA-NRPS (A_{Phe}-T-C)-TycB1-NRPS (A_{Pro}-T-C) は D-Phe-L-Pro DKP を生成する。TycA-NRPS (A_{Phe}-T-E) エピメラーゼドメイン変異体を用いることで、D-Phe-L-Pro DKP 生成を評価する。これら結果を統合的に理解することにより、エピメラーゼドメインの異性化機構を解明する。

(4) エピメラーゼドメイン-チオレーションドメインタンパク質間相互作用解析

共有結合型エピメラーゼドメイン阻害剤およびクロスリンク反応により生成するクロスリンク

複合体の精製を行い, X 線結晶構造解析を行う。

4. 研究成果

(1) 共有結合型エピメラゼドメイン阻害剤の設計および合成

メシル基 (C4-Ms (1), C5-Ms (2)) およびトシル基 (C4-PhSulfo (3), C5-PhSulfo (4), C6-PhSulfo (5)) を導入したパンテテインアナログの合成を行なった。

(2) 共有結合型エピメラゼドメイン阻害剤の機能評価

TycA-NRPS (A_{Phe}-T-E), Sfp, CoaA-MBP, CoaD-MBP および CoaE-MBP を大腸菌組換えタンパク質として調製した。TycA-NRPS (A_{Phe}-T-E) (1 μM), Sfp (0.008 μg/μL), CoaA-MBP (0.01 μg/μL), CoaD-MBP (0.01 μg/μL), CoaE-MBP (0.01 μg/μL), 8 mM ATP, 15 mM MgCl₂, C4-MS (1) あるいは C5-Ms (2) (1 mM) をリン酸緩衝液 (pH 7.0) へ添加し, 反応液とした。また, Sfp あるいは C4-MS (1), C5-MS (2) を除いたものをコントロール反応液とした。調製した反応液を 37 °C にて 12 時間反応後, SDS-PAGE により評価した (図 3A)。C4-MS (1) あるいは C5-Ms (2) のどちらを用いた場合においても, 116 kDa – 160 kDa に TycA-NRPS (A_{Phe}-T-E) の分子間クロスリンク複合体のタンパク質バンドを確認することができた (バンド A およびバンド B) (図 3A)。C4-MS (1) あるいは C5-Ms (2) を用いた場合のバンド A, バンド B および TycA-NRPS (A_{Phe}-T-E) のタンパク質のバンド強度を算出すると, バンド A : バンド B : TycA-NRPS (A_{Phe}-T-E) は 1 : 0.27 : 1.20 (C4-MS) および 4.14 : 0.41 : 1 (C5-Ms) であった。続いて, 同条件下, TycA-NRPS (A_{Phe}-T-E) を C4-PhSulfo (3), C5-PhSulfo (4), C6-PhSulfo (5) で処理することにより, TycA-NRPS (A_{Phe}-T-E) の分子間クロスリンク複合体の生成を検討した。C4-PhSulfo (3), C5-PhSulfo (4), C6-PhSulfo (5) は異なったクロスリンク反応特性を示した (図 3B)。C5-Ms (2) および C5-PhSulfo (4) はバンド A を C4-PhSulfo (3) はバンド B を主要なクロスリンク複合体として与えた。一方, C6-PhSulfo (5) はバンド A とバンド B の等量混合物を与えた。C5-Ms (2) および C5-PhSulfo (4) は天然基質の鎖長を模倣しており, 同様のクロスリンク反応特性を示したと考えられる。さらに, TycA-NRPS (A_{Phe}-T-E) のクロスリンク複合体 (バンド A) を切り出し, トリプシンおよび Asp-N 消化物断片の MALDI-TOF MS 解析からクロスリンク部位の同定を行なった。その結果, クロスリンク部位を含む 2 つのペプチド断片 (DSIQAIQVVAR および DLLIAALGLAFAEWSKLAQIVIHLEGHGRE) を同定することができた。DSIQAIQVVAR は, T ドメインのホスホパンテテイン修飾部位である 563 番目のセリン (共有結合型エピメラゼドメイン阻害剤が Sfp により導入される部位) を含み, DLLIAALGLAFAEWSKLAQIVIHLEGHGRE は, エピメラゼドメインの触媒残基として推定される 882 番目のグルタミン酸や多くの求核性アミノ酸残基を含むことが判明した。

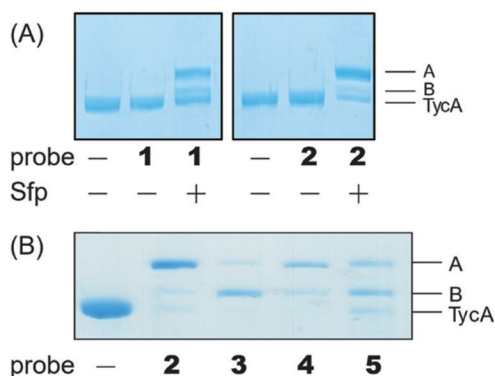


図 3. (A) 1 および 2 を用いた TycA-NRPS (A_{Phe}-T-C) とのクロスリンク反応.⁶ (B) 2, 3, 4 および 5 を用いた TycA-NRPS (A_{Phe}-T-C) とのクロスリンク反応.⁶

(3) エピメラゼドメイン異性化機構の解明

MALDI-TOF MS 解析の結果に基づき, 9 種類の TycA-NRPS (A_{Phe}-T-E) エピメラゼドメイン変異体の作製を行なった (H743A, E882A, H743A/E882A, D858A, S872A, K873A, Q876A, H880A, H887A)。常法に従い, ヒスチジンタグ融合タンパク質として大腸菌にて調製を行なった。TycA-NRPS (A_{Phe}-T-E) および 9 種類の TycA-NRPS (A_{Phe}-T-E) エピメラゼドメイン変異体 (1 μM), Sfp (0.008 μg/μL), CoaA-MBP (0.01 μg/μL), CoaD-MBP (0.01 μg/μL), CoaE-MBP (0.01 μg/μL), 8 mM ATP, 15 mM MgCl₂, C5-PhSulfo (4) (1 mM) をリン酸緩衝液 (pH 7.0) へ添加し, 反応液とした。調製した反応液を室温にて 12 時間反応後, SDS-PAGE により評価した (図 4A)。野生型 TycA-NRPS (A_{Phe}-T-E) と C5-PhSulfo (4) とのクロスリンク反応における バンド A およびバンド B の強度は, A : B = 2.6 : 1 であった (図 4A および図 4B)。TycA-NRPS (A_{Phe}-T-E) エピメラゼドメイン変異体 (H743A) と C5-PhSulfo (4) とのクロスリンク反応は, バンド A のみを与えた (図 4A および図 4B)。また, TycA-NRPS (A_{Phe}-T-E) エピメラゼドメイン変異体 (E882A) と C5-PhSulfo (4) とのクロスリンク反応は, バンド B のみを与え, その生成量は野生型 TycA-

NRPS (A_{Phe}-T-E) と比較して大きく増加した (図 4A および図 4B). さらに, TycA-NRPS (A_{Phe}-T-E) エピメラーゼドメイン変異体 (H743A/E882A) は, クロスリンク複合体を検出することはできなかった (図 4A). このことから, クロスリンク反応は 触媒残基である 743 番目のヒスチジンおよび 822 番目のグルタミン酸で起こることが判明した. すなわち, H743A 変異体では 822 番目のグルタミン酸が, E882A 変異体では 743 番目のヒスチジンが求核攻撃することによって, 異なったクロスリンク複合体が生成し, ゲルの移動度が異なることがわかった.

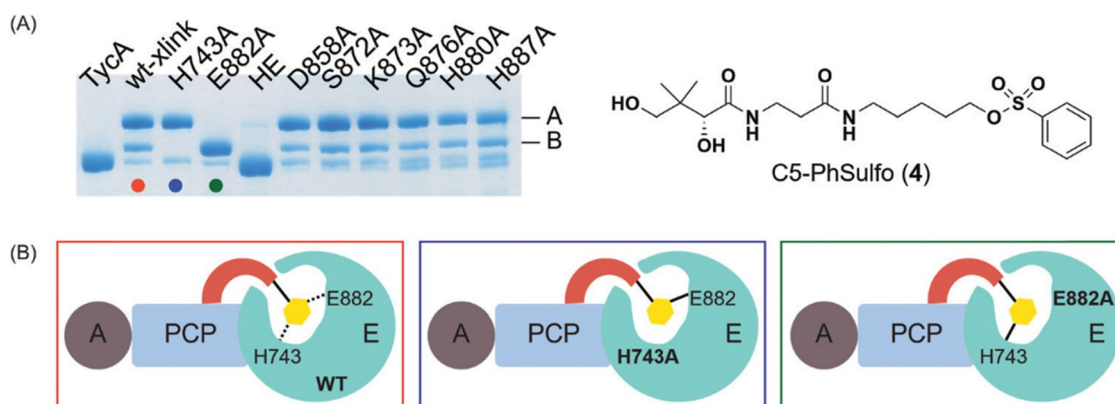


図 4. (A) 4 を用いた 野生型 TycA-NRPS (A_{Phe}-T-C) および TycA-NRPS (A_{Phe}-T-E) エピメラーゼドメイン変異体とのクロスリンク反応.⁶ (B) 野生型 TycA-NRPS (A_{Phe}-T-C) および TycA-NRPS (A_{Phe}-T-E) エピメラーゼドメイン変異体 (H743A および E882A) のクロスリンク反応模式図.⁶

さらに詳細な活性部位アミノ酸残基の役割を明らかにするために, TycA-NRPS (A_{Phe}-T-C), TycA-NRPS (A_{Phe}-T-E) エピメラーゼドメイン変異体 (H743A, E882A, H743A/E882A) および TycB1-NRPS (A_{Pro}-T-C) によるジケトピペラジン (DKP) 生成反応を利用した酵素化学的解析を行なった. TycB1-NRPS (A_{Pro}-T-C) は, 常法に従い, ヒスチジntag融合タンパク質として大腸菌にて調製した. TycA-NRPS (A_{Phe}-T-C) あるいは TycA-NRPS (A_{Phe}-T-E) エピメラーゼドメイン変異体 (H743A, E882A, H743A/E882A) (2.8 μM), TycB1-NRPS (A_{Pro}-T-C) (2.8 μM), L-Phe (8 mM), L-Pro (8 mM), ATP (8 mM) NaCl (300 mM), MgCl₂ (10 mM) を HEPES 緩衝液 (pH 7.0) へ添加し, 反応液とした. 調製した反応液を 37 °C にて 1 時間反応後, 高速液体クロマトグラフィーにより D-Phe-L-Pro DKP の生成を追跡した. H743A 変異体および E882A 変異体では, D-Phe-L-Pro DKP の生成量がそれぞれ 99% および 99.5% 減少した. H743A/E882A 変異体では, D-Phe-L-Pro DKP はまったく生成しなかった. このことから, 743 番目のヒスチジンと 822 番目のグルタミン酸は TycA-NRPS (A_{Phe}-T-C) エピメラーゼドメインによって触媒される L-Phe から D-Phe への異性化反応において必須の役割を果たしていることが判明した. また, 更なる検討は必要だが, 2 つのアミノ酸残基はアミノ酸異性化反応において, 一般酸/塩基触媒として協働していると推察している.

(4) エピメラーゼドメイン-チオレーションドメインタンパク質間相互作用解析

X 線結晶構造解析を実施するため, 共有結合型エピメラーゼドメイン阻害剤およびクロスリンク反応により生成する TycA-NRPS (A_{Phe}-T-E) クロスリンク複合体の精製を検討中である.

<引用文献>

1. Hur, G. H., Vickery, C. R., Burkart, M. D. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, 29, 1074-1098.
2. Wang, E., Walsh, C. *Biochemistry* **1978**, 17, 1313-1321.
3. Thornberry, N. A., Bull, H. G., Taub, D., Wilson, K. E., Gimenez-Gallego, G., Rosegay, A., Soderman, D. D., Patchett, A. A. *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 21657-21665.
4. Stachelhaus, T., Walsh, C. T. *Biochemistry* **2000**, 39, 5775-5787.
5. Samel, S. A., Czodrowski, P., Essen, L.-O. *Acta Cryst.* **2014**, D70, 1442-1452.
6. Kim, W. E., Ishikawa, F., Re, R. N., Suzuki, T., Dohmae, N., Kakeya, H., Tanabe, G., Burkart, M. D. *RSC Chem. Biol.* **2022**, 3, 312-319.
7. Worthington, A. S., Burkart, M. D. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 44-46.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fumihito Ishikawa, Aiko Hirano, Yuuto Yoshimori, Kana Nishida, Shinya Nakamura, Katsuki Takashima, Shinsuke Marumoto, Kiyofumi Ninomiya, Isao Nakanishi, Weijia Xie, Toshio Morikawa, Osamu Muraoka, Genzoh Tanabe*	4. 巻 11
2. 論文標題 Ligand compatibility of salacinol-type α -glucosidase inhibitors toward family GH31	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RSC Adv.	6. 最初と最後の頁 3225-3225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katsuki Takashima, Mika Sakano, Eri Kinouchi, Shinya Nakamura, Shinsuke Marumoto, Fumihito Ishikawa, Kiyofumi Ninomiya, Isao Nakanishi, Toshio Morikawa,* Genzoh Tanabe*	4. 巻 33
2. 論文標題 Elongation of the side chain by linear alkyl groups increases the potency of salacinol, a potent α -glucosidase inhibitor from the Ayurvedic traditional medicine "Salacia," against human intestinal maltase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorg. Med. Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 127751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fumitaka Kudo,* Sotaro Takahashi, Akimasa Miyana, Yuichiro Nakazawa, Kota Nishino, Yuki Hayakawa, Koichi Kawamura, Fumihito Ishikawa, Genzoh Tanabe, Naeko Iwai, Takeo Usui, Tadashi Eguchi*	4. 巻 16
2. 論文標題 Mutational biosynthesis of hitachimycin analogs controlled by the α -amino acid-selective adenylation enzyme HitB	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Chem. Biol.	6. 最初と最後の頁 539-547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fumihito Ishikawa,* Hinano Kitayama, Shinya Nakamura, Katsuki Takashima, Isao Nakanishi, Genzoh Tanabe*	4. 巻 69
2. 論文標題 Activity, binding, and modeling studies of a reprogrammed aryl acid adenylation domain with an enlarged substrate binding site	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chem. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 222-225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ryosuke Sato, Naoya Hamada, Ami Yamada, Fumihiro Ishikawa, Teruaki Takasaki, Genzoh Tanabe,* Reiko Sugiura*	4. 巻 103
2. 論文標題 Discovery of new benzhydrol biscarbonate esters as potent and selective apoptosis inducers of human melanoma cells: SAR studies on an ERK MAPK signaling modulator, ACA-28	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorg. Chem.	6. 最初と最後の頁 104137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fumihiro Ishikawa,* Maya Nohara, Katsuki Takashima, Genzoh Tanabe*	4. 巻 21
2. 論文標題 Probing the compatibility of an enzyme-linked immunosorbent assay toward the reprogramming of nonribosomal peptide synthetase adenylation domains	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 3056-3061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Genzoh Tanabe,* Satoshi Ueda, Kazuho Kurimoto, Naoki Sonoda, Shinsuke Marumoto, Fumihiro Ishikawa, Weijia Xie, Osamu Muraoka	4. 巻 4
2. 論文標題 1.Facile synthesis of neokotalanol, a potent -glycosidase inhibitor isolated from the Ayurvedic traditional medicine "Salacia"	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 7533-7542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fumihiro Ishikawa,* Genzoh Tanabe*	4. 巻 20
2. 論文標題 5.Chemical strategies for visualizing and analyzing endogenous nonribosomal peptide synthetase (NRPS) megasynthetases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 2032-2040
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fumihiko Ishikawa,* Akimasa Miyahara, Hinano Kitayama, Shinya Nakamura, Isao Nakanishi, Fumitaka Kudo, Tadashi Eguchi, Genzoh Tanabe*	4. 巻 58
2. 論文標題 6. An engineered aryl acid adenylation domain with an enlarged substrate binding pocket	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Angew. Chem. Int. Ed.	6. 最初と最後の頁 6906-6910
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fumihiko Ishikawa,* Genzoh Tanabe, Hideaki Kakeya*	4. 巻 420
2. 論文標題 7. Activity-based protein profiling of non-ribosomal peptide synthetases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr. Top. Microbiol. Immunol.	6. 最初と最後の頁 321-349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 今野 翔, 石川 文洋,* 掛谷 秀昭*	4. 巻 12
2. 論文標題 8. 化学標識法を用いた非リボソームペプチド合成酵素の活性検出と機能解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本ケミカルバイオロジー学会機関誌「ケミカルバイオロジー (Chemical Biology)」	6. 最初と最後の頁 3-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 田邊 元三, 塩谷 友梨, 高島 克輝, 森川 敏生, 二宮 清文, 石川 文洋
2. 発表標題 タイ天然物 “Melodorum” 由来ブテノリド類の網羅的合成およびメラニン産生抑制作用の検討
3. 学会等名 日本薬学会第 141 年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高島 克輝, 小林 祐喜, 石川 文洋, 丸本 真輔, 田邊 元三
2. 発表標題 スルフィドのジアステレオ選択的分子内環化反応を利用したアーユルベータ天然薬物“サラシア”由来 β -グルコシダーゼ阻害剤 neokotalanolの全合成
3. 学会等名 日本薬学会第 141 年会 (広島)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野原 麻耶, 石川 文洋, 高島 克輝, 田邊 元三
2. 発表標題 拡張型基質結合部位をもつアデニル化酵素の二置換安息香酸誘導体への基質許容性
3. 学会等名 日本薬学会第 141 年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川 文洋, 野原 麻耶, 中村 真也, 高島 克輝, 仲西 功, 田邊 元三
2. 発表標題 安息香酸誘導体選択的アデニル化酵素の基質特異性を制御するNRPSコードの生化学的解析
3. 学会等名 日本薬学会第 141 年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川 文洋
2. 発表標題 矛を磨いた10年 於 大阪府大 UCSD 京都大 近畿大
3. 学会等名 第6回関西薬学シンポジウム: 化学系の若い力 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高島 克樹, 石川 文洋, 丸本 真輔, 田邊 元三
2. 発表標題 アールベーク天然薬物 “サラシア” 由来 β -グルコシダーゼ阻害剤 neokotalanolの簡便かつ効率的な合成
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川 文洋, 野原 摩耶, 高島 克樹, 田邊 元三
2. 発表標題 人工アデニル化酵素の設計、機能、構造解析
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高島 克輝, 小林 祐喜, 石川 文洋, 丸本 真輔, 田邊 元三
2. 発表標題 スルフィドのジアステレオ選択的分子内環化反応を利用したアールベーク天然薬物 “サラシア” 由来 β -グルコシダーゼ阻害剤 neokotalanolの全合成
3. 学会等名 第62回天然有機化合物討論
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fumihiro Ishikawa
2. 発表標題 An engineered aryl acid adenylyating enzyme with an enlarged substrate binding pocket
3. 学会等名 2nd German-Japanese Symposium on Natural Product Biosynthesis (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fumihiro Ishikawa
2. 発表標題 A reprogrammed aryl acid adenylation domain with an enlarged substrate binding pocket
3. 学会等名 日本薬学会第 140 年会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塩谷 友梨, 石川 文洋, 森川 敏生, 二宮 清文, 田邊 元三
2. 発表標題 タイ天然薬物 "Melodorum" 由来プテノリド類の合成およびそのメラニン産生抑制活性評価
3. 学会等名 日本薬学会第 140 年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野原 摩耶, 石川 文洋, 田邊 元三
2. 発表標題 拡張型基質結合部位を有するアデニル化酵素の基質許容性
3. 学会等名 日本薬学会第 140 年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川 文洋
2. 発表標題 大環状ペプチド人工合成系を基盤とした生理活性中分子ライブラリーの構築
3. 学会等名 新学術領域研究 (研究領域提案型) 生物合成系の再設計による複雑骨格機能分子の革新的創成科学, 第7回公開シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塩谷 友梨, 石川 文洋, 田邊 元三
2. 発表標題 タイ天然薬物 <i>Melodorum fruticosum</i> 由来, メラニン産生抑制活性ブテノリド類の合成およびその活性評価
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 紗也子, 石川 文洋, 田邊 元三
2. 発表標題 アーユルヴェーダ植物“サラシア”由来, β -グルコシダーゼ阻害剤, ネオコタラノールの合成
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野原 摩耶, 石川 文洋, 田邊 元三
2. 発表標題 拡張型基質結合部位を有するアデニル化酵素の機能解析
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川 文洋, 宮永 顕正, 北山 陽菜乃, 工藤 史貴, 江口 正, 田邊 元三
2. 発表標題 アデニル化酵素のエンジニアリングによる拡張型基質結合部位の設計, 機能, 構造解析
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川 文洋, 宮永 顕正, 北山 陽菜乃, 工藤 史貴, 江口 正, 田邊 元三
2. 発表標題 アデニル化酵素のエンジニアリングによる基質許容性の拡張および構造的基盤
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川 文洋, 宮永 顕正, 北山 陽菜乃, 工藤 史貴, 江口 正, 田邊 元三
2. 発表標題 アデニル化酵素の基質結合部位の拡張および構造的基盤
3. 学会等名 第61回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Genzoh Tanabe, Satoshi Ueda, Kazuho Kurimoto, Naoki Sonoda, Shinsuke Marumoto, Fumihiro Ishikawa, Osamu Muraoka
2. 発表標題 Facile synthesis of neokotalanol, a potent α -glycosidase inhibitor isolated from the Ayurvedic traditional medicine "Salacia"
3. 学会等名 27th International Society of Heterocyclic Chemistry Congress (27th ISHC)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumihiro Ishikawa
2. 発表標題 Visualizing, analyzing, and reprogramming nonribosomal peptide synthetases
3. 学会等名 University of California, San Diego (UCSD) (Host: Prof. Michael D. Burkart) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumihiro Ishikawa, Akimasa Miyanaga, Hinano Kitayama, Fumitaka Kudo, Tadashi Eguchi, Genzoh Tanabe
2. 発表標題 Reprogramming aryl acid adenylation domains for non-native building blocks
3. 学会等名 ACS Fall National Meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川 文洋, 宮永 顕正, 北山 陽菜乃, 工藤 史貴, 江口 正, 田邊 元三
2. 発表標題 アデニル化酵素の基質特異性の拡張および構造的基盤
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第14回年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

近畿大学薬学部有機薬化学研究室 https://www.phar.kindai.ac.jp/orgchem/ 近畿大学薬学部有機薬化学研究室 https://www.phar.kindai.ac.jp/orgchem/Researchmap https://researchmap.jp/f_ishikawa/

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

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
---------	---------