

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15439

研究課題名(和文)触媒として機能する天然化合物の役割

研究課題名(英文)The role of natural compounds acting as catalysts

研究代表者

西山 辰也(NISHIYAMA, Tatsuya)

日本大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：10759541

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)：生物由来の有機触媒の普遍性の実証、生理・生態学的役割解明を目的とし、(1)未知の有機触媒の探索、(2)触媒が他の微生物に及ぼす影響の調査、(3)有機触媒-結合タンパク質複合体の結晶構造解析を実施した。結果は以下である。(1)希少放線菌や海洋放線菌から有機触媒合成遺伝子群を発見した。また、強い触媒活性を有する菌を自然界から複数株単離した。(2)触媒添加、無添加条件で菌の生育を比較した。その結果、複数株で表現型に違いが見られた。(3)その構造には有機触媒結合部位と思われるポケットが確認された。また、結合に関わると推測されるアミノ酸の変異タンパク質の発現にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酵素、リボザイムは生体触媒として知られるが、有機触媒もまた生体触媒であることが明らかとなった。しかし、生体触媒としての有機触媒の生理的な意義については不明なままである。本研究を実施し得られた成果は、生物が広く有機触媒を生産していること、またそれを感じ取る生物がいることを示唆するものである。また、自己の生産するタンパク質と有機触媒とは結合することが明らかとなり、これは低分子有機化合物-タンパク質の新規な相互作用を想起させる。

研究成果の概要(英文)：We had researched that demonstrating the universality of organocatalysts derived from organisms and elucidating their physiological roles. We carried out, (1) searching for unknown organocatalysts, (2) investigating the effects of catalyst on other microorganisms, (3) the crystal structure analysis for organocatalyst-binding protein complex. The result is as follows. (1) Organocatalytic genes were discovered from rare actinomycetes and marine actinomycetes. In addition, a plurality of strains of bacteria having strong catalytic activity were isolated from nature. (2) The growth of bacteria was compared with and without catalyst addition. As a result, there was a difference in phenotype among some bacteria strains. (3) The three-dimensional structure was solved by X-ray crystal structure analysis. A pocket that seems to be a binding site was confirmed in the structure. We also succeeded in expressing mutant proteins of amino acids that are presumed to be involved in binding.

研究分野：応用微生物

キーワード：有機触媒 グラナチシン アクチノロージン

1. 研究開始当初の背景

<触媒活性を持つ低分子化合物とは>

生体中で触媒として機能する分子には、アミノ酸からなる酵素とRNA(核酸)からなるリボザイムの2種類があることは常識である。しかし申請者は、低分子代謝産物にも触媒活性を持つものがあることを発見した。放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)が生産する抗生物質として知られるアクチノロージン(ACT)(図1)が、それ単独でL-アスコルビン酸およびL-システインの酸化を触媒したのである。定量分析法を用いた検証の結果、さらにACTは、それ自体は消費されず、少量(触媒量)で多量の基質を酸化し、金属分子を含まないことが確認された。こうした条件を満たす低分子有機化合物は、2000年に有機触媒(organocatalyst)と定義され、合成化学者の間で注目をされてきたが、人工の化合物が知られるに留まり、その自然界における存在は認知されていなかった。申請者による発見は、生物がもつ触媒に関する常識を塗り替えると同時に、低分子の触媒は高分子に比較して安定性や拡散性が高いと考えられることから、それが広く生態系において未知の役割を果たしている可能性を想起させる。

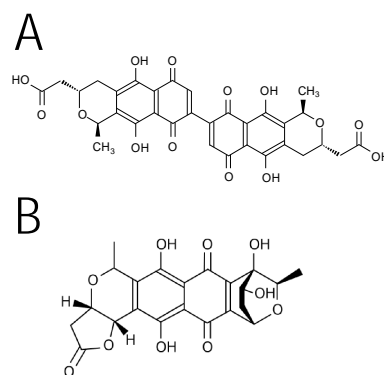


図1 アクチノロージン(A)およびグラナチシン(B)の化学構造

<類似する活性分子の発見>

上記の発見にもとづき、申請者はこれまでに、複数の植物由来のキノン化合物にもACTと同様の触媒活性が認められること、さらに *Streptomyces vietnamensis* が生産する抗生物質グラナチシン(GRA)にACTより強力な触媒活性が存在することを明らかにした。これらの事実は、触媒作用を持つ低分子化合物が生体内で機能する触媒として広く生物界に存在していることを支持している。また、放線菌が生産する抗生物質の一つとして知られてきたACTとGRAに、それとは全く異なる機能が認められることは、放線菌代謝産物の生理活性に関する理解を広げる重要な知見になると考えられる。

<低分子触媒に結合する分泌タンパク質>

ACTの触媒としての機能を証明する過程において、ACTが培養上清中に存在する細胞外タンパク質と相互作用することを示唆する結果が得られた。そこで、ACTの持つ可視光域の吸光とSDS-PAGE、カラムクロマトグラフィーによりACT結合タンパク質を精製し、そのアミノ酸配列情報をもとにしてタンパク質の同定を行った結果、ACT結合タンパク質はACT生合成クラスター内にコードされるSCO5074タンパク質であることが判明した(図2)。SCO5074タンパク質のN末端アミノ酸配列にはタンパク質が細胞外に分泌されるためのシグナル配列も確認された。本タンパク質とACTとの結合は、表面プラズモン共鳴法を用いた試験によって定量的に観察できた。これと同じ現象はGRAにも確認され、やはり生合成クラスター中にコードされる分泌タンパク質と同物質が特異的に結合することが確認された。

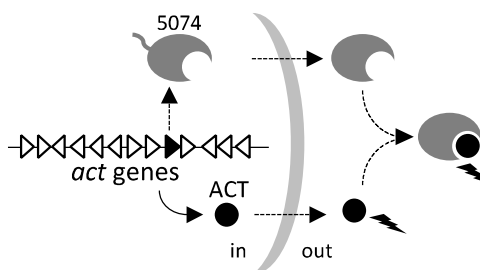


図2 低分子触媒ACTと、その生合成クラスター中の細胞外タンパク質SCO5074との複合体の生理的意義とは？

以上から、放線菌が生産し酸化反応を触媒する二つの二次代謝産物は、自身の生合成クラスターにコードされるタンパク質と特異的に結合した状態で細胞外に存在していることが明らかになった。

2. 研究の目的

これまでに、低分子化合物とタンパク質の相互作用に関する知見は数多くあるが、二次代謝産物とその生合成クラスター中にコードされたタンパク質とが細胞外で相互作用しているという例は他にない。さらに、ACTとGRAは低分子化合物でありながら触媒活性を有する生体物質であることが、本研究によって初めて明らかとなった。この複合体の機能と役割は何であろうか？そもそも、触媒活性を有する二次代謝産物にはどのような生理的意義があり、それはどれほど普遍的に生物界に存在しているのだろうか？

そこで本研究では、未だ一般に認識されるに至っていない、触媒活性をもつ低分子化合物が普

遍的に存在することを実証し、その生理・生態学的な役割に関する知見を収集する。すでに存在が明らかになっている複数の低分子触媒ならびにその細胞外タンパク質複合体は、いかなる生理的ならびに生態学的な役割を持っているのか。そして、低分子触媒 ACT、GRA の触媒としての活性が本結合タンパク質の機能にいかに関与しているか、複合体を形成することでどのように変化するのか、を明らかにすることで、これまでに全く知られてこなかった生物が有する触媒の実態を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、低分子触媒と特異的結合タンパク質との相互作用に焦点を当て、2 年間の研究において以下の 3 点を計画した。

・**低分子触媒の普遍性を実証するための探索**: ACT や GRA 以外の低分子化合物の触媒を天然から探索する。探索方法としては、(1)触媒活性を指標とする方法と、(2)結合タンパク質の遺伝子情報を元にした方法を用いる。(1)では、ACT や GRA が酸化反応を触媒することから、これらの触媒や、また逆反応である還元反応を触媒する有機化合物の存在を期待し、過酸化水素を基質とするスクリーニング系を構築する。過酸化水素を基質とした場合、還元反応が触媒されることにより酸素分子が生成され、酸素濃度を測定できる液相酸素測定システム(酸素電極)での活性測定が可能となるため、効率的な探索が行える。(2)では、ACT や GRA がそうであるように、触媒活性を示す二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターには、分泌シグナルをもつタンパクがコードされている可能性があることから、ゲノム情報をもとに同様のクラスターを検索しその代謝産物を特定するアプローチも計画する。

・**他の菌の増殖や群集構造に及ぼす影響の調査**: 生物が生産する触媒で、細胞外に放出されるものといえは分泌型の酵素がそれにあたる。基本的に、分泌酵素の作用領域は生産菌の比較的近傍と考えられる。一方、低分子性の触媒は拡散性・安定性が高分子のそれに比較して高いことから、その作用領域は広範囲に及ぶ可能性が考えられる。そこで、ACT および GRA をはじめとするこれまでに同定されている低分子触媒が、他の菌の増殖や形質ならびにその群集構造に対して及ぼす影響を調査することで、その生理・生態学的役割に関する知見を取得する。

・**低分子触媒-結合タンパク質複合体の構造解析**: これまでに、ACT を含まない組換え SCO5074 については様々な条件検討を行うことで、その結晶化に成功している。しかし、ACT との複合体を形成した状態の SCO5074 については成功していない。そこで、複合体での結晶化を目指し、その条件検討を行う。さらに結晶が得られた後には X 線構造解析により複合体の立体構造を明らかにする。これら構造の詳細を解析することで、ACT-タンパク質相互作用のメカニズムを明示する。また、表面プラズモン共鳴分析装置(Biacore)などを用いた相互作用の定量解析を進め、その特性を明確にする。GRA についても、同様に存在が予想される特異的結合タンパクとの複合体について同等の試験を推進する。

4. 研究成果

・低分子触媒の普遍性を実証するための探索:

(1)土壌から菌をおよそ 1000 株単離した。それぞれを液体培地で培養後、遠心分離によりその培養上清を得た。得られた培養上清が示すアスコルビン酸に対する酸化活性を測定したところ、多くの菌で活性がみられた。これらの菌から ACT と同様の活性を有する低分子有機化合物の取得を目指した。中でも最も活性の高かった 1 株を決定し、その培養上清中に存在する目的物質を吸着樹脂で回収し、種々のカラムクロマトグラフィーに供することで目的物質を単離、精製することに成功した。本化合物が有機触媒であることの証明実験を行い、構造決定を目指す。

(2)*S. coelicolor* A3(2)の有機触媒 ACT は自身の生合成クラスター中のタンパク質(SCO5074)と結合する。そこで、有機触媒には ACT 同様に自身の生合成クラスター中のタンパク質と結合するものも存在すると仮定し、SCO5074 と相同性を有するタンパク質を BLAST 検索により探索し、その遺伝子が低分子化合物生合成クラスター中に存在するかをクラスター検索ソフトで調べた。その結果、*Streptomyces cellulosae*、*Streptomyces galbus*、だけでなく *Nocardioopsis halotolerans*、*Salinispora pacifica* にもホモログ遺伝子が存在することが判明した。今後はこれらの株を取り寄せ、*S. coelicolor* と同様の活性を示すのかを調べる。

・**他の菌の増殖や群集構造に及ぼす影響の調査**: まず、土壌から形質の違いに着目し、およそ 2000 株の菌を単離した。また、グラナチシンを精製した。その後、Bennet's Maltose (BM)寒天培地と LB 寒天培地にグラナチシンを 10 nM、10 μ M となるように添加した。また対照として無添加の条件も用意した。それぞれの培地に菌を植え、培養後の形質の違いを観察した。その結果、50 株で形質の違いが見られた。違いとしては、グラナチシン添加時に色素生産、生育促進、コロニー表面の形状変化、などである。

今後はこれら形質の変化がどの遺伝子に起因するのか、UV 変異処理を行い、形質の変化が見

られなくなる株を獲得し、変異遺伝子の特定を実施する。

・低分子触媒-結合タンパク質複合体の構造解析：結晶化にあたり、*S. coelicolor* A3(2)から目的タンパク質である SCO5074 を大量取得する条件の確立に成功した。それを用いて 3,132 通りの条件で結晶化を試みたが現在までに結晶に至っていない。この原因としては、精製の過程で多くのカラムに供するので、SCO5074 が失活しているものが一部存在していることが考えられた。組換え SCO5074 は結晶化に成功しているために、この組換え SCO5074 と、ACT を別々に精製し結晶化直前に混合する手法で結晶化を目指す。また、組換え SCO5074 は結晶化に成功しているが、本研究中でその立体構造が解かれた(図3)。これによると、SCO5074 には ACT と結合するポケットが存在しているように見える。またそのアミノ酸残基を確認すると、N 末端から 25 番目と 150 番目にアルギニンが存在しているが、これが ACT の両端のカルボキシル基を捉えることが推測された。

さらに、本考察を立証するために、これら結合に深く関与すると思われるアミノ酸を 6 つ選別し、それらをそれぞれアラニンに置換した組換え遺伝子を作成し、大腸菌で発現させることに成功した。

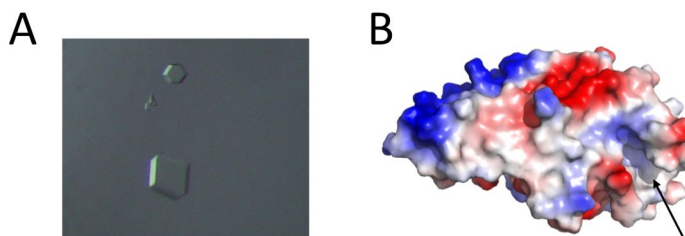


図3 組換えSCO5074の結晶(A)および、そのX線結晶構造解析結果(B) 矢印がACT結合部位と推定される

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishiyama Tatsuya, Enomoto Narumi, Nagayasu Reina, Ueda Kenji	4. 巻 12
2. 論文標題 Organocatalytic activity of granaticin and its involvement in bactericidal function	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-10877-7	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西山 辰也, 長安 伶奈, 榎本 成美, 上田 賢志
2. 発表標題 触媒活性をもつキノン系抗生物質の活性本体が過酸化水素である可能性
3. 学会等名 2021年度（第35回）日本放線菌学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長安 伶奈, 榎本 成美, 西山 辰也, 上田 賢志
2. 発表標題 有機触媒グラナチシンは特異的タンパク質と結合して細胞外に存在する
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度仙台大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西山 辰也, 上田 賢志
2. 発表標題 天然の有機触媒が示す抗菌活性のメカニズム
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度京都大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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