

藤森科学技術振興財団
研究実施概要報告書

(西暦) 2026年 5月 21日

公益財団法人藤森科学技術振興財団
理事長 藤森 行彦 殿

藤森科学技術振興財団の助成金による研究が終了しましたので、下記のとおり報告をいたします。

所属機関 京都大学 大学院理学研究科

職 名 講師

氏 名 白石 太郎



【提出書類】

- (1) 研究実施概要報告書 (本紙)
添付書類 (A4 版 3 枚以内) : 研究状況を示す写真等の資料
- (2) 収支報告書
添付書類 : 助成金を充当した経費の領収書
領収書を添付しない場合 : 支払一覧表と支払部門担当者記名捺印

(1) テーマ

※スペースが足りない場合は、枠を追加いただいて構いません。

革新的ヌクレオシド系抗生物質生産手法の開発研究

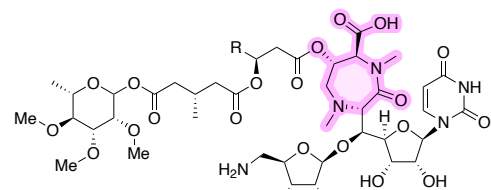
(2) 本研究の期間

(西暦) 2025年4月 ~ 2026年3月

(3) 本研究の目的

本研究では、微生物による発酵生産を利用した天然には存在しない新規な抗生物質の開発を目指し、ウリジン-ペプチド融合化合物の酵素による創出基盤の確立を目的とした。これまで我々の研究グループでは抗結核菌活性を示すウリジン含有ヌクレオシド系抗生物質カプラザマイシンの生合成機構の解明に取り組んできた。カプラザマイシン類(CPZs)は放線菌 *Streptomyces* sp. MK730-62F2 の培養液より単離されたリポウリジン

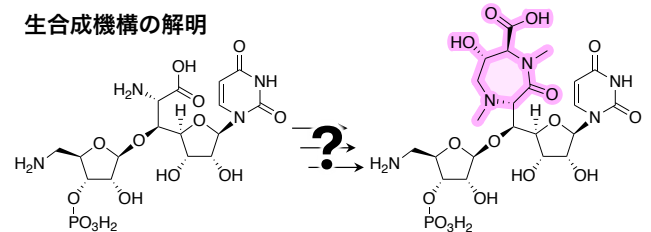
ジメチルジアゼパノン環



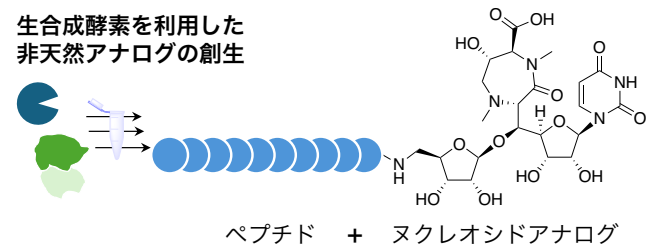
カプラザマイシン類 (CPZs)

本研究の目的

生合成機構の解明



生合成酵素を利用した 非天然アナログの創生



ペプチド + ヌクレオシドアナログ

は有望なファーマコフォアであると言える。このような背景から我々は、さらなる高生産菌の育種を目的に、微生物がどのようにしてこのカプラザマイシンを生合成するのかを解明する研究を行ってきた。本研究ではまず、CPZsに特有のジアゼパノン環の形成機構を明らかにすることを目指した。ジアゼパノン環は3つの不斉炭素七員環ラクタムであり、その形成機構には未知の生体触媒の関与が期待される。したがって本形成機構の解明によりさらなる誘導體展開や新たな生体触媒の発見を期待し研究に着手した。

一方でこれまでのCPZsの生合成機構解析の過程で、我々はこれまでに類を見ない、ヌクレオシドとペプチドの縮合反応を触媒する酵素を見出した。そこで本研究においては上記研究と合わせて、このヌクレオシドとペプチドの縮合反応機構に関連する酵素の機構解明に取り組むとともに、これを理論的に改変・応用することで、非天然型ウリジン-ペプチド融合化合物を酵素合成する戦略の確立を目指した。特に本研究課題は天然物の生合成系の論理改変により本来の生産物とは大きく異なる化合物の創生を試みるものであり、天然物化学研究に新たな潮流を生み出すものである。

(4) 本研究の概要

本研究では、新規抗生物質の開発に向けたウリジン-ペプチド融合化合物の酵素による創出基盤の確立を目指し、抗結核菌活性を示すカプラザマイシン (CPZs) の生合成機構の解明と、その応用展開に取り組んだ。具体的には、CPZs 特有のジアゼパノン環形成機構の解明、およびウリジン-ペプチド縮合酵素の機能解析と理論的改変による非天然型化合物の酵素合成戦略の構築を行った。

1. ジアゼパノン環形成機構の解析

本研究では、CPZs の生合成におけるジアゼパノン環形成機構の全容解明に取り組んだ。これまでの遺伝子破壊実験等から、CPZs 中の 5'-O-(5"-amino-5"-deoxy- α -D-ribose)-5'-C-glycylyridine 形成経路は予測されていたが、本研究では遺伝子破壊、生合成中間体の単離・構造決定、および組換え酵素による *in vitro* 解析により、詳細なジアゼパノン環形成機構を以下の通り解明した (図1)。すなわち、Cpz26 による基質 (化合物 1) のアミノ基のメチル化反応に始まり、続く Cpz13 による SAM 由来の 3-アミノ-3-カルボキシプロピル基導入反応が触媒される。その後、メチル基転移酵素ホモログである Cpz11 により SAM 依存的なラクタム環形成反応が進行し、最後に Cpz26 が再びラクタム環アミドの窒素原子へのメチル化を触媒することを見出した。本生合成機構は、補因子 SAM が通常のメチル基ドナーとしてだけでなく、基質ドナーおよびラクタム環形成のためのカルボニル活性化因子としても機能する点で、極めて特異的かつ新奇な反応系であると言える。

なお、これら Cpz11 および Cpz26 の反応基盤を分子レベルで明らかにするため、X 線結晶構造解析を試みた。Cpz11 については結晶を得ることに成功し、回折データを用いた分子置換による構造決定を試みた。

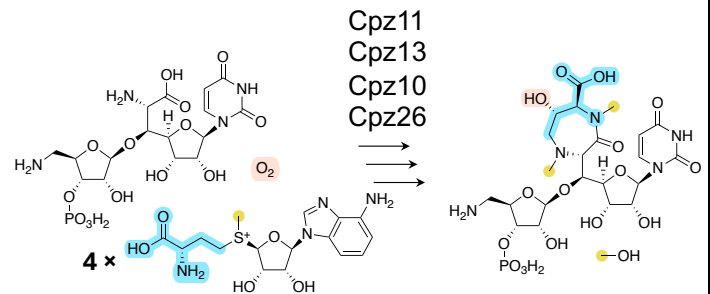


図2 CPZs生合成におけるジアゼパノン環形成機構

2. ウリジン-ペプチド融合化合物の創生と応用

ウリジン-ペプチド縮合酵素のアシル化反応機構の詳細解析、およびそれを応用した新規な融合分子の創生を目的とし、試験管内 (*in vitro*) 翻訳反応を組み合わせたハイスループットな多様化システムを構築した。

従来は大腸菌発現系由来の組換えタンパク質を精製して利用していたペプチド基質について、新たに *in vitro* 翻訳系を適用することで、ペプチド調製から縮合までをワンポットで行うタンデムな反応系を確立した。本反応系を用いて種々の鋳型 DNA から多様なペプチドを供給し、基質特異性を詳細に解析した結果、反応に必須となるペプチドの残基や配列特性の知見を得た。

加えて、FIT システム (Flexible In-vitro Translation ; Goto, Y., Katoh, T. & Suga, H. Flexizymes for genetic code reprogramming. Nat Protoc 6, 779–790, 2011)) を利用することで、非天然アミノ酸を導入したペプチドを基質とする融合化合物の構築にも成功した。これらの検証の過程において、本来の最終生産物である CPZs とは骨格が全く異なる、新規なウリジン-ペプチド融合化合物を 30 種類以上構築することに成功した。

さらに、AlphaFold3 を用いた基質ペプチド-酵素複合体の構造予測により、その結合様式に関する理論的知見も獲得した。

(5) 本研究の内容及び成果

1. ジアゼパノン環形成機構解析

<方法>

CPZs 類の生合成遺伝子クラスター中にコードされた各遺伝子破壊株の培養液解析から、2 つの S-adenosyl-L-methionine (SAM) 依存型メチル基転移酵素ホモログである Cpz11 および Cpz26 が、それぞれジアゼパノン環の窒素原子のメチル化反応を担うことが示唆されていた。そこで本研究では、この仮説を検証すべく組換え酵素を調製し、試験管内 (*in vitro*) での各種反応の再構成を試みた。

また、その反応基盤を分子レベルで明らかにするため、Cpz11 と Cpz26 の結晶構造解析を展開した。各酵素の N 末端または C 末端に His タグを付加した組換え体として発現ベクターを構築し、大腸菌および放線菌をそれぞれ宿主として異種発現を行った。細胞破碎上清を Ni-NTA カラムによるアフィニティ精製に供した後、サイズ除去クロマトグラフィー (SEC) によりさらに高純度へと精製し、結晶化スクリーニングを行った。得られた結晶に対して大型放射光施設等での X 線回折実験を実施し、位相決定には重原子同型置換法、または AlphaFold により予測した立体構造モデルを用いた分子置換法を試みた。

<結果>

Cpz11 組換え酵素を用いた反応液を解析した結果、当初予想していたメチル化産物は検出されなかったが、予想外の現象としてラクタム環形成反応の進行が検出された。これにより、Cpz11 はメチル基転移酵素ではなく、新奇なラクタム環形成反応を触媒する酵素であることが明らかとなった。

一方で、Cpz11 の機能が判明したことで、もう片方の窒素原子へのメチル基導入を担う酵素が不明となった。そこで、このメチル化反応ももう 1 つのホモログである Cpz26 が二段階で担っている (二機能性をもつ) と仮説を立てて検証を行った。その結果、目的に合う 2 つ目のメチル基転移反応の進行を明確に検出することに成功した。以上の結果とこれまでの知見を合わせることで、CPZs のジアゼパノン環形成機構の全容解明を達成した。

なお、構造解析においては Cpz11 の結晶を得ることに成功し X 線回折実験に供したものの、分子置換法による構造決定に至る十分な分解能の回折データを得ることはできなかった。

2. ヌクレオシド-ペプチド融合化合物創生

<方法>

基質となるペプチド CpzX を *in vitro* (試験管内) 翻訳反応により調製し、引き続いて縮合反応を触媒する酵素および CPZs 生合成中間体を用いたワンポットでの縮合反応へと供した。各種基質濃度や反応温度などのパラメータを精査し、最適な反応条件を算出した。

次に、構築した反応系を用いて CpzX の種々の変異体を調製し、同様に反応へと供した。また、*in vitro* 翻訳反応に FIT (Flexible *In-vitro* Translation) システムを適用することで、CpzX へ非天然アミノ酸を導入した変異体ライブラリーの構築と反応性評価を試みた。

<結果>

CpzX の N 末端アミノ酸残基の検討を行った結果、1~44 番目の残基を欠失させた場合でも縮合反応が進行し、ペプチド-ヌクレオシド融合化合物の形成が可能であることが判明した (基質の短縮に成功)。

さらに、各種残基を順次アラニンに置換する「アラニンスキニング (Ala スキニング)」を実施した。その結果、わずか 2 箇所の残基を除くすべての変異体において、野生型と同様にペプチド-ヌクレオシド融合化合物の形成が検出された。この反応の進行が消失した 2 箇所の残基に対し、さらに他の 18 種類の天然アミノ酸へと置換した変異体を調製して検証したところ、His や Phe などの芳香族アミノ酸へと置換した場合に反応性が回復 (進行) することが明らかとなった。以上の基質許容性の検証を通じて、本研究では合計 30 種類を超える非天然型誘導体の酵素合成を達成した。

並行して、詳細な反応機構を理論的に解明するため、本酵素、基質ペプチド、および CPZ 生合成中間体の三者複合体構造モデルを AlphaFold3 により予測した。その結果、酵素による基質ペプチドの認識には、酵素側の複数の Arg (アルギニン) 残基と、ペプチド側の酸性アミノ酸残基との間の水素結合形成が密接に関与していることが強く示唆された。

(6) 本研究の考察

本研究では、ウリジン含有ヌクレオシド系抗生物質カプザマイシン (CPZs) の生合成におけるジアゼパノン環形成機構の全容解明、および *in vitro* 翻訳系を応用した非天然型ウリジン-ペプチド融合化合物の酵素的創成において、学術的に極めて重要な知見を得た。

第一に、ジアゼパノン環形成において、SAM 依存型メチル基転移酵素ホモログである Cpz11 が新奇なラクタム環形成反応を触媒し、Cpz26 が二段階のメチル化を担うという、当初の予想を覆す生合成経路を明らかにした。特に補因子 SAM が、通常メチル基ドナーに留まらず、3-アミノ-3-カルボキシプロピル基のドナー、およびカルボニル活性化因子としても機能する多機能性は、天然物生合成において前例のない極めてユニークな触媒機構である。この分子メカニズムの解明は、酵素化学における新たな触媒パラダイムの提示に繋がる。一方、Cpz11 の結晶構造解析において十分な回折分解能が得られなかった原因としては、結晶内におけるドメインの柔軟な運動性や、溶媒領域の乱れが影響した可能性が考えられる。今後は、補因子 SAM や基質アナログとの共結晶化による構造の安定化、あるいはクライオ電子顕微鏡による単粒子解析の適用を試みることで、高解像度での三次元構造の決定を目指したい。

第二に、融合化合物創生研究では、試験管内翻訳反応の導入により、基質ペプチドの最小化 (1-44 残基の欠失許容) と、30 種類以上の非天然型誘導体の迅速な構築を達成した。Ala スキャニングにより判明した必須残基が、His や Phe といった芳香族アミノ酸へ置換可能であった事実は、酵素の基質ポケットが特定の側鎖の「疎水性・芳香族性」や「嵩高さ」を厳密に認識していることを示唆している。これは、AlphaFold3 による構造予測から得られた相互作用モデルとも整合性が高く、本予測の妥当性を裏付けるものである。

今後は、本研究で得られた構造的・生化学的知見を基盤とし、酵素側の合理的変異 (プロテインエンジニアリング) を進め、さらなる基質許容性の拡張とライブラリーの多様化を展開する。これにより、超多剤耐性結核菌をはじめとする病原菌に対する新規活性化化合物のスクリーニングへと繋げ、天然物化学研究の新たな潮流を創出したい。

(7) 共同研究者 (所属機関名、役職、氏名)

該当なし

(8) 本研究の成果の公表先

【学会発表】

1. Taro Shiraishi, "Functional Analyses and Applications in Nucleoside Antibiotic Biosynthesis", 2025 The 3rd Taiwan-Japan Bilateral Symposium on Natural Products Biosynthesis, Kaoshung, 2025/11/12-16
2. Taro Shiraishi, "Functional Analyses and Applications in Nucleoside Antibiotic Biosynthesis", 第1回 A3 Foresight Program日韓ミニシンポジウム, Incheon, 2026/2/4
3. 内村 亮太、「カプラザマイシン生合成に関わるペプチド転移酵素の基質特異性に関する研究」、農芸化学会 2026 年度京都大会、京都、2026/3/11

[注] この報告書を当財団のホームページ等に掲載します。予めご了承ください。