学術研究助成金〔独創的・先駆的研究〕実績報告書

令和 7 年 5 月 13 日　提出

関連する持続可能な開発目標（SDGs）

	1 貧困		2 飢餓		3 保健		4 教育
	5 ジェンダー		6 水・衛生		7 エネルギー		8 経済成長と雇用
●	9 インフラ，産業化，イノベーション				10 不平等		11 持続可能な都市
	12 持続可能な消費と生産				13 気候変動		14 海洋資源
	15 陸上資源		16 平和		17 実施手段		

1　課題番号:　23 独先 16

2　研究者（研究代表者）

①所属部科校：　生物資源科学部・(生命科学研究所)

②資格・氏名：　教授・上田賢志

3　研究課題

①和文表記：　微生物有機触媒の作用が拓く革新的生物学

②英文表記：　Provoking a revolution in biology from the action of microbial organocatalysts

4　研究期間：令和　5 年度～令和　6 年度

5　現在までの達成度

※当初の研究目的に対する達成度について，自己評価を行ってください
①区　分　Ａ：当初の計画以上に進展している，Ｂ：概ね順調に進展している，Ｃ：やや遅れている
②達成度　研究期間全体（２年間）を 100%とした場合に，現在の進捗状況を〇〇%で評価してください

①区　分：　B

②達成度：　70　%

当初達成目標として掲げた課題のうち、触媒分子に結合するタンパク質の立体構造決定ならびに新規の反応を触媒する分子の同定については２年の期間中には達成できなかった（現在も鋭意推進中)。一方、酸化反応を触媒する新規構造の触媒分子の同定や、触媒分子の産業利用の課題においては予定を上回る成果を挙げることができた。それらを総合的に判定して実施期間中での達成度を 70%とした。

６　研究組織

①研究代表者

資　格・氏　名 （研究者番号）	所属部科校 実施研究所	役 割 分 担
教授・上田賢志 （00277401）	生物資源科学部 生命科学研究所	研究総括 有機触媒の生態学解析と進化学考察

②研究分担者

専任講師・西山辰也 （10759541）	生物資源科学部 生命科学研究所	有機触媒の生化学解析と応用法の検討

7　研究目的

有機化合物の中に触媒活性を示すものが存在すること自体は古くから認識されていた。また、本格的な導入は今世紀に入ってからではあるものの、有機触媒を化学合成の手段として活用する試みは、特にその環境負荷の低さと立体選択的な反応特性におけるメリットに基づいて広く取り組まれて現在に至っている。一方で、これまでに知られている有機触媒活性を示す化合物の種類は、プロリン（アミノ酸の一種）など少数に限られており、またそれらは化学合成法への応用という視点に特化して扱われ、その反応条件も有機溶媒を使用するなど、自然界では起こりえないものが研究対象となっている。

このような、主として化学分野において進展してきた有機触媒研究のこれまでの動向に対し、筆者らは全く異なる視点に立っている。有機分子が自然条件で示す触媒活性は、生態系と生命活動に様々な形で関与している可能性が高い。さらに、それによって促進される化学反応が分子の非対称性を生み出すことは、それがかつての地球で生命誕生を引き起こした化学的なイベントを担った可能性も想起させる。

ここでは、筆者らが第三の生体触媒として見いだした微生物が生産する有機触媒について、その多様性と役割、ならびに利用性を開拓し、新たな学問領域の基盤を築くことを目的とする。触媒活性をもつ微生物代謝産物の探索と特性の解明を通じて、有機触媒が細胞の生命システムから生態系の構築に至るまでに広く介在している可能性について洞察を深める。生物学・進化学・生態学の広範な学問分野にわたりこれまでにない本質的な概念を創出することで、パラダイムシフトを引き起こすことが期待される。

8　研究概要

触媒とは、それ自体は変化することなく特定の化学反応の進行を促進する物質の総称である。金属などの無機触媒と、生物がもつ生体触媒に分けられ、生体触媒にはアミノ酸が重合してできる酵素（タンパク質の一つ）と、リボ核酸が重合してできるリボザイム（RNA の一つ）の２つが広く知られてきた。筆者らは、そこに有機触媒と定義される、触媒活性をもつ低分子の有機化合物の一群が含まれるとする新たな学説を提唱しようとしている。

本研究では、有機触媒を第三の生体触媒として位置づけるための知見を深化させる。特に、すでに触媒活性を持つことが確定している放線菌の代謝産物２種（アクチノロージンとグラナチシン）がもつ生理的役割の解明、微生物によって生産される新しい有機触媒の同定、ならびに有機触媒の活用法の探索に注力する。

有機分子に触媒活性をもつものが存在することは古くから知られ、現在では化学合成の新しいツールとして注目されている。しかし、そうした化合物が微生物の代謝物に見つかり、かつ自然環境下で機能を発揮していること示したのは筆者らが初めてである。得られる成果は、生命の進化と生態学を包含する生物学全体に新しい概念を創出し、持続可能な技術基盤を構築すると期待される。

生体触媒（生物が作る触媒）

・酵素（タンパク質）
・リボザイム（RNA）
・**有機触媒NEW**
（金属を含まない低分子有機化合物）

９　研究結果

１．　既知の微生物有機触媒の反応が生体と環境に及ぼす影響の調査

（i）細胞内の酸化反応基質の探索

アクチノロージン（ACT）およびグラナチシン（GRA）の生体内における基質探索研究では、グラム陽性菌である *Lactobacillus delbrueckii* を用いて実験を行なった。嫌気性である本菌は、酸素を消費する呼吸活性がないことから、目的の基質の酸化による酸素の検証を観察する材料として適していると考えた。本菌の無細胞抽出液と GRA とを混合したところ、酸化反応で見られる酸素濃度の減少活性が見られた。そこで、サイズ排除カラムクロマトグラフィーを用いて、無細胞抽出液の分子量ごとの篩い分けをしたところ、分子量 10,000 程度の画分に活性が見られた。この画分に含まれるタンパク質を質量分析装置による網羅的解析をしたところ、その中にチオレドキシンが存在していることが判明した。チオレドキシンは、低分子タンパク質で、自身の持つチオール基が生体内分子を還元する抗酸化作用があるとして知られる。GRA や ACT はチオール化合物のいくつかを基質とする。さらに、ヒトにおいては、チオレドキシン遺伝子欠損は致死であることからも生体にとってチオレドキシンは非常に重要な分子であることが伺えるため、本タンパク質が GRA や ACT の標的物質の可能性が考えられた。また、同時にそれの還元酵素であるチオレドキシンレダクターゼも検出された。*Lactobacillus delbrueckii* 全ゲノムが解読されているため 2 つのチオレドキシン遺伝子ならびに 1 つのチオレドキシンレダクターゼ遺伝子をそれぞれ発現用大腸菌にクローニングした。得られた組換え大腸菌はチオレドキシンを高発現することが SDS-PAGE 上で確認できたため、この無細胞抽出液を調製し、GRA と混合することで酸素減少を測定した。しかし、チオレドキシン高発現大腸菌の無細胞抽出液と、対照とした遺伝子未挿入大腸菌の無細胞抽出液とで有意な差は見られなかった。これの原因として考えられることとして、チオレドキシンは酸化されやすい物質であり、無細胞抽出液調製中にチオール基が酸化したことが挙げられた。そこで、チオレドキシンレダクターゼ高発現大腸菌からチオレドキシンレダクターゼを精製し、この酵素によってチオレドキシンを還元状態に保ちながら（すなわち、チオール基を保護しながら）GRA との反応を行う予定である。そのための準備として、チオレドキシンレダクターゼの精製は各種カラムクロマトグラフィーを用いて完了している。

（ii）抗菌活性の本体が過酸化水素であることの検証

ACT や GRA の酸化反応では産物に過酸化水素が生じる。過酸化水素は細胞に酸化ダメージを引き起こすことが知られていることから、これら触媒活性を有する抗生物質は、その酸化反応触媒活性によって抗菌活性を示しているのではないかと推測した。そこで、まず過酸化水素分解酵素であるカタラーゼを用いたペーパーディスクアッセイを行った。寒天培地にあらかじめ GRA 感受性菌を植菌し、片方には GRA のみを、もう一方には GRA とカタラーゼを染み込ませたペーパーディスクを置き、菌を培養し、その阻止円を観察した。その結果、カタラーゼ添加条件の方が無添加条件に比べ、直径が縮小した。さらに、カタラーゼ遺伝子欠損大腸菌や、カタラーゼ遺伝子を強発現した大腸菌での抗菌活性測定においてもカタラーゼと抗菌活性の強弱に相関が見られた。

上記に加えて、GRA の添加により、形質の違いが得られるものを新たに探索し、それらの菌の応答メカニズムを解明することで有機触媒の生理的意義に関する新たな知見を得ることを目的とした試験も行った。

GRA 無添加、10 nM、10 μM の濃度で塗布した培地を用意し、GRA により形質に変化が生じた菌の探索を行った。形質の変化が見られた菌を再度同じ条件で培養することで再現性の確認を行い、再現の得られた株について 16S rRNA 遺伝子系統解析を行い菌の同定を行った。形質の違いの再現の得られた菌が、胞子を形成する菌である場合は胞子液を用い GRA 添加条件と無添加条件でのコロニー数の確認、胞子の飛散の確認を行った。色の違いが見られた菌においては GRA の有機触媒作用により生成された過酸化水素を打ち消すため、固体培地にカタラーゼと GRA の添加条件と GRA のみ添加した条件で培養し比較した。

土壌から獲得した 1136 株について、GRA に対する応答性を調べた。その結果、GRA 添加濃度に応じて色や生育に違いの見られる菌を 63 株が得られた。そのうちの再現性が明確に認められた株には、GRA により最も黄色くなる株、最も紫色になる株、コロニー数に違いが見られる株などが含まれていた。16SrRNA 遺伝子解析の結果、GRA により濃い黄色になる菌株は *Lysobacter* 属、*Variovorax* 属、*Curutobacterium* 属、*Dyella* 属に近縁な菌であり、GRA 添加により濃い紫色になる菌は、*Streptomyces* 属に近縁な菌であった。

得られた株が生産する黄色の色素は、その抽出物の吸収スペクトルからいずれもカロテノイドであることが明らかになった。カロテノイドは、活性酸素分子種から細胞を保護するためにその生産が誘導されることが一部の菌において知られている。すなわち、上記の株における GRA による色素生産の誘導は、本研究で予想した GRA の作用に触媒活性によって生じる過酸化水素が関与する可能性を支持した。胞子液を用いた発芽実験では GRA による影響が認められる株はなかった。これらの結果より、GRA の持つ触媒活性によって生じる過酸化水素が抗菌活性を示した可能性が強く示唆された。

２，結合タンパク質の構造決定

（i）ACT 結合タンパク質

予備的な観察において、有機触媒 ACT が自身の生合成クラスター中に存在するタンパク質(以下 ABP)と相互作用することが判明した。ACT の存在様式と機能に関する知見は、本化合物ならびに関連の有機触媒分子がもつ生物学的ならびに生理学的役割に関する洞察を深める上で鍵となる情報になると考えている。そこで、組換え ABP(以下 rABP)と ACT の共結晶化条件を見いだすスクリーニングを行うとともに、すでに取得されている rABP の結晶データから推測されている結合に重要と考えられた 6 つのアミノ酸について、それらのアラニン置換変異体を作出し、ACT 結合への関与を検証した。

まず、野生型を含む 7 種の ABP 遺伝子を大腸菌株に導入し、タンパク質の発現を確認した。得られた菌株を用いて、種々のカラムクロマトグラフィーによる精製操作の検討を行い、変異 rABP の精製を行った。次に、rABP または 6 種の変異 rABP と ACT との結合を調べるため、表面プラズモン共鳴装置（Biacore）を用いて実験を行った。その結果、作出した 6 種の変異 rABP-ACT の解離定数は rABP-ACT のそれと同じ値を示したことから、これらアミノ酸の部位特異的変異導入はタンパク質の立体構造に影響を与えず、ACT との結合にも影響を与えないことが示された。このことは、アミノ酸配列から立体構造を予測する AlphaHold 3 でのシミュレーション結果と同じ結果を示した。

上記実験と並行して rABP-ACT 混合液を用いてハンギングドロップ法で、共結晶化条件のスクリーニングを行った。ABP と ACT の共結晶については、沈殿剤に硫酸アンモニウムを含む条件

を適用することによって、目的とする結晶と考えられる結晶を得ることに成功した。これら結晶は連携研究者によってつくば市にある高エネルギー加速器研究機構でその X 線構造解析が実施された。その結果、rABP の推定 ACT 結合サイトに ACT の結合は確認できず、ACT より低分子化合物の結合が観察された。電子密度からの化合物特定は不可能であったが、ACT の中間体である可能性が高いと推測された。また、立体構造から ACT 結合サイトには ACT だけではなく、FAD が結合する可能性が示唆された。AlphaHold 3 での立体予測と、それをもとにした Rosetta による結合自由エネルギーの推定結果ではわずかに FAD の方が rABP に結合しやすいという結果であった。

（ii）GRA 結合タンパク質

上述の ACT に特異的に結合する分泌タンパク質と同様に、GRA もまた同様にそのホモログタンパク質 SVTN_18850 と結合することが確認されている。このように微生物の二次代謝産物が細胞外でタンパク質と結合して存在する例はこれまで全く知られていないことから、本タンパク質についても複合体の結合の詳細や性質を解明することで有機触媒の生理的意義に関する理解を深めることとした。

まず、予備試験において作出済みの組換え SVTN_18850(以下 rSVTN_18850)発現大腸菌から培養温度や硫安分画、カラムクロマトグラフィーに着目し、精製方法の再検討を行った。次に、GRA 生産放線菌から、酢酸エチル抽出や高速液体クロマトグラフィー等により GRA の精製を行った。そして、精製 rSVTN_18850 と GRA を用いて結晶化スクリーニングを行った。また、粗精製 rSVTN_18850 と GRA を用い、触媒活性試験や吸収スペクトルの測定、抗菌活性試験によって、GRA 単体とタンパク質複合体の活性などを比較し性質を調べた。

再検討によって確立した精製方法によって rSVTN_18850 の高純度精製標品を得ることに成功した。次に、精製した rSVTN_18850 と GRA を用いて結晶化スクリーニングを行った結果、硫酸アンモニウムとポリエチレングリコールメチルエーテルを含む条件において複数結晶が確認され、その類似条件においても形状の異なる結晶が確認された。また、触媒活性試験と吸収スペクトルの測定、抗菌活性試験を行った結果、GRA はタンパク質と複合体を形成することで触媒活性と抗菌活性ともに著しく低下したが、複合体として存在することで触媒活性や構造は安定することが確認された。しかし、抗菌活性において複合体の安定性は触媒活性との相関は確認されなかった。

〔９　研究結果（つづき）〕

3．未知の有機触媒分子の探索

微生物由来の有機触媒（触媒作用を有する金属非含有低分子有機化合物）は、当研究室で明らかにした ACT と GRA のみが知られているが、それ以外にも多くの微生物由来有機触媒が存在すると考えられる。そこで、土壌から酸化反応の触媒活性を指標として菌の探索を実施した。その結果、培養上清中に高い触媒活性を有する菌（TK-41 株）を獲得した。本菌の 16S rRNA 遺伝子配列を解読したところ *Streptomyces* 属であることが明らかとなった。

次に、本菌の培養上清中の触媒活性分子の単離を行った。まず効率的な生産条件を決定するため、TK41 株の培養条件の再検討を行った。本菌の培養上清を酢酸エチルで抽出し得られた有機層を乾固後、メタノールで溶解したものを活性画分とした。得られた活性画分を中圧液体クロマトグラフィー（purif-compact）を使用したオープンカラムの粗精製後、ODS カラムを用いた HPLC 分析を行い、グラジエント条件の基、分画・分取することで目的化合物の単離を行った。

一般的な放線菌の培養温度は 28℃が最適なことが多い。本菌も 28℃で盛んに増殖する一方で、本培養の温度を 37℃に設定し、液体振盪培養を行うことで 28℃での培養時と比較して、目的とする活性が 15 倍以上になることが判明した。本培養を 37℃、144 時間行い、TK41 株の培養上清を酢酸エチル抽出後、エバポレーターで乾固しメタノールで溶解した試料を HPLC に供したところ、254nm、280nm の波長で溶出時間 30 分に単一のピークが検出できた。さらにそのピークの画分に対して酸素電極を用いた活性測定を行ったところ活性が確認できた。そこで本化合物を AR30 と称し、その構造決定を試みた。高分解能質量分析装置および NMR を用いた実験の結果、本化合物は(2E,4E)-5-(3-hydroxyphenyl)penta-2,4-dienamide であると決定した。本化合物の構造はこれまで知られている ACT、GRA と異なりキノン構造を有していない。ACT、GRA ではキノン構造のキノンレドックスサイクルによる酸化還元の繰り返しによって酸化反応が触媒されると推測されていたため、本化合物の触媒機構に興味が持たれた。この触媒機構解明では協力研究者によって様々な類似化合物の有機合成をお願いしており、それらの活性を測定することにより重要な構造の特定と触媒機構の推定を実施する予定である。また、AR30 のグラム陽性菌に対する抗菌活性を調べたが、抗菌活性は示さなかった。この点からも、AR30 はこれまでの GRA や ACT とは異なる作用機序の化合物である可能性が高い。

（ii）脱炭酸反応を触媒する新規有機触媒

上記のように、天然由来の有機触媒は酸化反応を触媒する ACT と GRA の 2 つのみが知られるが、未発見の天然由来の有機触媒が存在すると考えられる。触媒する反応が酸化に限られるとは考えにくく、例えば、すでに人工の有機触媒が知られているアミノ酸の脱炭酸反応を触媒するものが存在することが推測される。そこで、脱炭酸反応を触媒する天然由来の有機触媒の探索を実施した。

現在発見されている天然由来の有機触媒は先行の研究から放線菌が生産しているため、探索の対象として放線菌を用いた。また、放線菌が生産する有機触媒が脱炭酸反応を触媒するかを調べる方法として、脱炭酸反応に伴う pH の変化を BTB 溶液の呈色反応を利用した活性測定を行った。具体的な反応液の組成は、BTB 溶液と基質である複数のアミノ酸溶液が入った混合液、カリウムリン酸バッファーとした。この反応液の組成の濃度を調整し、完成した反応液に放線菌の培養上清を加え、脱炭酸反応の有無を確認した。

上記の活性測定を放線菌 384 株分の培養上清を対象に行ったところ、6 株に脱炭酸反応と思われる呈色反応が確認できた。6 株のうち IS311 株と ST15 株の 2 株には強い呈色反応が確認できた。この 2 株について酢酸エチル抽出した画分を検定したところ、やはり活性を示した。IS 311 株はヒスチジン、スレオニン、α-ケトグルタル酸（αKG）の混合液に、ST15 株はスレオニンと αKG の混合液と αKG のみの溶液に対して反応を示すことが確認できた。2 株に共通して呈色反応が確認された αKG に脱炭酸が起これば、コハク酸が生成される。2 株と αKG の反応に HPLC 解析でコハク酸量の増加が確認できれば、天然由来の有機触媒が脱炭酸反応を触媒しているといえる。