

研究終了報告書

「タンパク質多量化技術による生合成制御」

研究期間：2020年12月～2023年3月

研究者：吉村 柁彦

加速フェーズ期間：2023年4月～2024年3月

1. 研究のねらい

この地球上に存在する植物は30万種を超え、それら植物種全体が生み出す小分子は20万種類を超えるといわれている。植物が生産する二次代謝産物はまさに機能の宝庫であり、今日に至るまで、我々人類はこれら植物由来の小分子を医薬や化学合成の原料として活用してきた。しかし、化学合成および合成生物学的生産による供給が困難な植物二次代謝産物は多く、我々人類は膨大にある植物二次代謝産物の中のごく一部しか利用できていない。本研究では、複雑骨格を有する有用分子を効率よく生産するための新たな物質生産の基盤技術を開発する。

生物は細胞内にて 1)複数酵素の複合化もしくは 2)酵素による液-液相分離空間の形成を駆使することで生合成を最適化している。本 ACT-X 研究では生物の巧みな生合成システムを人工的に再現することで効率的な物質生産を目指す。すなわち、タンパク質を精密に多量化させる技術を独自に開発し、これを生合成酵素で実装することにより細胞の生合成を模した連続酵素反応を実現する。

本研究で目指す有用分子の効率的生産技術は、食品や医薬のみならず、合成繊維や合成化学品などの物質生産に革新をもたらし、我々の持続可能な生産社会を支える画期的な技術になりうる。

加速フェーズ期間では、ACT-X 研究期間で開発した「ナノ空間へのタンパク質包摂によるタンパク質多量化・局所高濃度化技術」の技術基盤を整え、ナノ空間内におけるタンパク質局所濃度の精密制御およびタンパク質複合体機能の自在制御技術を実現する。モデル酵素を活用して局所高濃度化効果を実証するのに加えて、本システムが物質生産ナノリアクターとして活用できることを実証する。さらに、実用酵素を用いた効率的な連続酵素反応の実現を目指し、多量化・局所高濃度化のためのタグを導入した組み換え酵素の設計及び開発を実施する。

2. 研究成果

(1) 概要

本 ACT-X 研究では生物の巧みな生合成システムを人工的な分子システムにより再現することで生合成を自在制御することを目的に取り組んだ。生物は細胞内にて 1)複数酵素の複合化もしくは 2)酵素による液-液相分離空間の形成を駆使することで生合成を最適化している。研究初期構想では 2)を人工的に再現することを目的に、タンパク質にタグペプチドを導入し合成小分子を利用してつなぎあわせることで生合成を加速するマイクロサイズ空間を創生することを目指し研究に取り組んだ。ACT-X 研究を進める中で、ただただ酵素を乱雑に密集させるだけでなく、酵素の配置を制御しながら多量化することができれば、より高度なタン



タンパク質多量化を実現できるとともに生物の生合成システムをより模倣するような分子システムを作り上げることができると考えるようになった。

このような経緯を経て、申請者はタンパク質をナノメートルスケールの精度で精密に配置することができる筒型のナノ構造体を作り、この筒型ナノ構造体を高次元に集積化する構想に至った。本 ACT-X 研究では、上述した要件を満たすような筒型ナノ構造体の開発に成功し、タンパク質の精密配置を実現した。さらに、筒型ナノ構造体内部へのタンパク質精密配置技術と並列して、このナノ構造体を高次元に集積化する技術の開発にも成功した。本多量化システムを用いてモデル酵素反応を実施したところ、酵素反応の飛躍的な効率化を確認することができた。この結果を受けて今後は、有用小分子を生産する酵素を本多量化システムに適用し、新たな物質生産技術の確立を目指す。

加速フェーズ期間では、これまでの ACT-X 研究にて開発した基礎・基盤技術「筒型ナノ構造体へのタンパク質内包技術」を拡張・改良し、ナノ空間内におけるタンパク質濃度の精密制御を実現した。具体的には 1) 筒型ナノ構造体の自在な設計および合成法の確立、2) 異なる長さのタンパク質連結リンカーライブラリーの構築、3) タンパク質とリンカーとを接続する化学連結手法の拡張を行い、自在にナノ空間内でのタンパク質稼働領域をデザインすることができるようになった。デザインしたナノ空間におけるタンパク質局所濃度を評価するため、モデル発光酵素を活用した定量分析を行なった。本実験では上述の自在設計によりナノ空間内でのタンパク質濃度を精密にコントロールできることを実証した。加えて、本実験により酵素内包ナノ構造体を物質生産ナノリアクターとして利用できることを検証した。現在、実用酵素内包による効率物質生産に向けてタグ付きタンパク質の設計および合成に着手している。

(2) 詳細

1) 独自のタンパク質多量化システムの構築「筒型ナノ構造体へのタンパク質包摂技術」

研究初期構想で計画していたタンパク質多量化技術はタンパク質にタグペプチドを導入し、合成小分子を用いてタンパク質同士をつなぎ合わせるというものであった。これにより、複数の酵素で構成されるマイクロメートルサイズのナノ空間を作り出し、生物の生合成システムのひとつである液-液相分離を模倣することを構想していた。しかし、ACT-X 研究を進める中で、ただ酵素を乱雑に密集させるだけでなく、酵素の配置を制御しながら多量化することができれば、より高度なタンパク質多量化を実現できるとともに生物の生合成システムをより模倣するような分子システムを構築できると考えるようになった。

この発想に基づき、申請者は、1)タンパク質をナノメートルスケールの精度で精密に配置することができるナノ構造体の開発と 2)ナノ構造体そのものを集積化する技術を開発し、独自のタンパク質多量化システムを構築した。

1) タンパク質の精密配置を実現する筒型ナノ構造体の開発

全長 33 nm サイズの筒型ナノ構造体を開発し、このナノ構造体内部にナノメートルスケールの精度で精密にタンパク質を設置する技術を開発した。これにより、酵素反応の微細なチュ

ーニングが可能であると期待している。(特許・論文公開前につき、開発した技術の詳細は割愛)

加速フェーズでは自在なナノ空間設計を可能にするため、1) 筒型ナノ構造体の自在な設計および合成法の確立、2) 異なる長さのタンパク質連結リンカーライブラリーの構築、3) タンパク質とリンカーとを接続する化学連結手法の拡張を行った。これにより、ナノ空間内に包摂するタンパク質(酵素)のサイズに合わせてナノメートルスケールで精密に設計することが可能になった。

2)ナノ構造体の集積化技術

開発したナノ構造体の集積化に取り組んだ。透過型電子顕微鏡を用いた測定によりマイクロメートルサイズを超える大きさの多量化体を確認し、細胞内液-液相分離を人工再現するような物質空間を作り上げることに成功した。

2) モデル酵素反応を用いた概念実証

開発した多量化システムを用いてモデル酵素反応を実施した。モデル酵素反応では反応の是非を定量的に評価することを目的に、発光酵素を用いた。モデル酵素の空間的配置を変更することで酵素反応が劇的に変化することを見出した。(特許・論文公開前につき、開発した技術の詳細は割愛)この結果を受けて今後は、有用小分子を生産する酵素を本多量化システムに適用し、新たな物質生産技術の確立を目指す。

加速フェーズでは、研究成果 1)-1)で実現した自在な空間設計を利用して、発光酵素の精密な空間配置および、定量分析に取り組んだ。これにより、ナノ空間内のタンパク質局所濃度に対する理解が深まり、自在に設計制御できるようになった。

その他 (ACT-X 内での共同研究)

9/28、29に開催されたオンサイト領域会議を契機に、1期生メンバーの神保晴彦助教との共同研究を開始した。単なる受注合成的な希薄な共同研究ではなく、神保晴彦助教のこれまでの成果から天然には存在しない全く新規の脂質酸様分子を2人でデザインし、化学合成に取り組んでいる。

3. 今後の展開

本 ACT-X 研究期間では、独自のタンパク質多量化技術の開発を達成した。さらに独自の多量化によりモデル酵素反応の効率を飛躍的に向上させることにも成功した。“(加速フェーズ実施後追記)加速フェーズでは、ACT-X 期間に開発したタンパク質多量化技術(ナノ空間へのタンパク質包摂技術)を拡張・改良し、モデル酵素を利用して定量的に分析することができた。加速フェーズ期間を通して、ナノ空間に内包するタンパク質サイズに合わせた精密設計が可能になったため、今後は有用小分子の生合成酵素を用いることで価値ある分子の効率生産に展開していく。

4. 自己評価

本 ACT-X 研究を進める中で、より高度なタンパク質多量化技術を目指した結果、初期構想とは異なる形式の多量化・集積様式に至り、独自のタンパク質多量化技術を構築することができた。そのため、多量化技術の開発に予定よりも多く時間を費やしてしまったが、研究終了期間までに独自のタンパク質多量化技術のもと、モデル酵素の反応効率化まで到達できたことから、研究の達成度は高いものと自負する。

本研究で開発する科学技術の波及効果は絶大であり、有機合成化学や合成生物学とも異なる第 3 の物質生産技術として、従来の技術では生産困難であった分子群の合成を可能にする。本技術の確立により、我々人類がいまだ活用できていない有用小分子の産業的利用を実現する糸口になると考えている。

(加速フェーズ実施後追記)

加速フェーズでは、ACT-X 期間に作り上げた基盤技術をさらに拡張・改良し、ナノ空間内でのタンパク質局所濃度の徹底的な定量分析および精密なコントロールを達成することができた。加速フェーズ開始時に想定していた技術到達度と比較して、ナノ空間の設計自由度は遥かに向上し、ナノ空間内のタンパク質局所濃度に関する理解が深まったとともに、精密な制御が可能になったと考えている。これまではモデル酵素を用いた定量分析に注力していたが、今後は実用酵素で実施し、効率的な物質生産を実現する。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 1件

研究期間累積件数: 3件 (加速フェーズ実施後更新)

1. “Maize resistance to witchweed through changes in strigolactone biosynthesis”

Changsheng Li, Lemeng Dong*, Janani Durairaj, Jiahn-Chou Guan, Masahiko Yoshimura, Pierre Quinodoz, Robin Horber, Katharina Gaus, Jing Li, Yohannes Besufekad Setotaw, Jinfeng Qi, Hugo De Groote, Yanting Wang, Benjamin Thiombiano, Kristýna Floková, Aimee Walmsley, Tatsiana V. Charnikhova, Aleksandra Chojnacka, Samara M Correia de Lemos, Yezhang Ding, David Skibbe, Katrin Hermann, Claudio Screpanti, Alain De Mesmaeker, Eric A Schmelz, Abebe Menkir, Marnix H Medema, Aalt DJ Van Dijk, Jianqiang Wu, Karen E Koch, Harro J Bouwmeester*

Science. **2023**, 379, 94-99.

植物ホルモンのひとつである「ストリゴラクトン」は植物の成長制御において重要な天然小分子である。本研究ではトウモロコシが生合成するストリゴラクトン「ゼアラクトン」の生合成酵素を明らかにした。ゼアラクトン生合成酵素は本 ACT-X 研究における標的酵素のひとつである。

2. “Novel Synthetic Approach towards Amino-Substituted Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

through Electrocyclization of Keteniminium Salts”

Masahiko Yoshimura, Pierre Quinodoz, Lucía Reyes Méndez, Amandine Kolleth, Sarah Sulzer-Mossé, Thomas Vent-Schmidt, Ulfet Karadeniz Yezer, Saron Catak, Alain De Mesmaeker
Helv. Chim. Act. **2023**, e202300085.

アミノ基を有する化合物を効率よく合成する新規合成手法を開発した。

3. “Design, Synthesis and Biological Evaluation of Simplified Analogues of the Major Corn Strigolactones, Zealactone and Zeapyranolactone”

Masahiko Yoshimura, Michael Dieckmann, Alexandre Lumbroso, Raymonde Fonné-Pfister, Claudio Screpanti, Katrin Hermann, Stefano Rendine, Pierre Quinodoz, Alain De Mesmaeker
Helv. Chim. Act. **2023**, e202300111.

トウモロコシが生合成するストリゴラクトン「ゼアラクトン」の類縁化合物の合成およびその機能を明らかにした。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 1 件 (特許公開前のものも含む)

研究期間全出願件数: 4 件 (特許公開前のものも含む、加速フェーズ実施後更新)

1	発明者	<u>M. Yoshimura</u> , A. De Mesmaeker, P. Quinodoz, J. Leipner, C. Screpanti, R. Fonne-Pfister, A. Bergna, B. O. Oyserman
	発明の名称	METHODS FOR INCREASING THE NUTRIENT USE EFFICIENCY OF PLANTS
	出願人	SYNGENTA CROP PROTECTION AG
	出願日	25.08.2022
	出願番号	PCT/EP2022/053237
	概要	トウモロコシが生合成するストリゴラクトン「ゼアラクトン」の農業利用に関する特許

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- 第 14 回スクリーニング学研究会年会、2023/11/30、ポスター発表
「弱いタンパク質相互作用の安定化技術と創薬スクリーニング」
吉村 柁彦
※加速フェーズ実施の成果
- 静岡県立大学 月例セミナー、2023/12/19、口頭発表
「タンパク質内包ケージを活用したタンパク質機能制御」
吉村 柁彦
※加速フェーズ実施の成果
- 第 144 回日本薬学会、2024/3/29、シンポジウム講演
「弱いタンパク質相互作用の安定化技術と創薬開発」
吉村 柁彦
※加速フェーズ実施の成果