

非リボソーム依存性環状ペプチドの生物合成

脇本 敏幸

北海道大学大学院 薬学研究院

研究の目的

中分子の環化反応は有機合成反応の中でも難しい反応の一つである。反応点となる両末端を反応溶媒中で近づけることが難しく、さらにペプチドの場合は C 末端アミノ酸の異性化により副生成物が生じる。また、反応点が分子内に複数存在する場合は、目的の位置選択性を得るために保護基が必要になる。さらに、反応溶液中では望む分子内反応と、望まない分子間反応が競合するために、高希釈条件が必須となる。特にこの点は大スケールの製造工程において重大な問題となる。一方で、天然物には大環状骨格を有する化合物が多数存在し、それらは生合成酵素によって極めて効率的に合成されている。自然界に備わった環化酵素を発掘し、酵素工学、指向性進化を駆使して、機能改変を試み、基質特異性の広い環化酵素を開発することで、汎用性の高い大環状中分子製造技術への応用が可能となる。そこで本研究では放線菌より我々が独自に見出した新規環化酵素 PBP-type TE を改良し、大環状骨格を容易に構築できる生体触媒の開発を進めるとともに、多様な非リボソーム環状ペプチドの生物合成プラットフォームの実現を目指した。ペプチドやポリケタイドの大環状化は活性配座の固定や消化酵素に対する抵抗性など、鎖状構造に比較して有利な物性を付与することができるため、本研究成果は中分子医薬品リードの修飾戦略の基盤技術を提供する。

方法

我々はこれまでに放線菌の産生する非リボソーム型環状ペプチド surugamide の生合成に関わる全く新しいペプチド環化酵素 SurE を発見し、その基質選択性とタンパク質構造を解明してきた。一般的な NRPS 経路の環化酵素は数 MDa におよぶ巨大酵素の C 末端に融合して存在するのに対し、SurE は 50 kDa 程度であり NRPS から独立して存在する「単独酵素」である。SurE は一般的な NRPS 環化酵素と相同性を示さない一方、ペニシリン結合タンパク質(PBP)に相同性を示すことから、申請者らはこれを新規ペプチド環化酵素ファミリー PBP-type TE として位置づけてきた。SurE は組換え技術により容易に調製でき、また基質選択性の寛容な上に、実用化されているペプチド環化生体触媒と比較して遜色ない触媒効率を示すことから、生体触媒として高いポテンシャルを有する。また、PBP-type TE を介する非リボソームペプチド生合成は、10%以上の放線菌に分布する普遍的な生合成の仕組みであり、様々な構造の環状ペプチドの生合成を担う。データベース上に無数に存在するこれら PBP-type TE ホモログは、互いに高いアミノ酸配列相同性を示しつつも、SurE とは全く異

なる基質選択性を有する。そこで本研究では、高い配列相同性を示すにも関わらず選択性の異なる複数の PBP-type TE を生化学的・構造生物学的に比較することで、選択性発現メカニズムの分子基盤を明らかにする。これにより、選択性を自在にコントロールするための基礎的知見を獲得する。基質選択性・反応選択性を拡張した改良型生体触媒を設計し、環状ペプチドの新しい効率合成法を開発する。

結果

公共のゲノムデータベースを探索したところ、PBP-type TE の候補遺伝子が 700 個以上見出された。これらをアミノ酸配列の類似性に基づくネットワーク解析に供したところ、基質選択性に依りて 40 種類程度のクラスターに分類されることが分かった。本解析により、新規性の高いホモログ酵素を効率的に開拓することが可能になった。そこで、各クレードを代表するホモログ酵素を 10 種選び、それらのクローニングと異種発現を試みた。組換えタンパク質発現用プラスミドを作製し、大腸菌を宿主とした発現と Ni レジンによるアフィニティクロマトグラフィーによってリコンビナント酵素を精製した。その結果、10 個のホモログ酵素のうち 8 個が不溶性酵素として得られた。可溶化タンパク質として 2 つ得られた (Nsm16 と SurE14988)。さらに、環状ペンタペプチド pentaminomycin 類の環化を担う PenA を *Streptomyces cacaoi* NBRC 12748 よりクローニングし、大腸菌にて異種発現を試みた。その結果、可溶性タンパク質として得ることに成功した。PenA は、これまで詳細な機能解析がなされた SurE よりも環サイズの小さな環状ペプチドを与えるため、その詳細な基質特異性の検討を行なった。その結果、PenA は surugamide B の環化を触媒することができない一方で、短鎖基質に特化した酵素であることが明らかになった (図 1)。具体的には、SurE は 5~11 アミノ酸残基のペプチドを環化できる一方で、4 残基の基質に対しては、環化の他に基質の二量体化が進行した。それに対し PenA は、4~5 残基のペプチドの環化し、4 残基の基質に対しても二量体を生成することなく環化反応を選択的に触媒した (図 1)。また PenA のタンパク質モデル構造から、その特異な選択性に関与すると推測されるループ構造を見出した。PenA が SurE よりもより短いペプチド基質を環状化出来る事を確認した。¹ その特徴的な鎖長選択性の要因をタンパク質構造の観点から明らかにするため、SurE の構造 (PDB: 6KSU) を鋳型として PenA のモデル構造を作成し、両者を比較した。その結果、PenA では C 末端のリポカリンドメインを構成するループの一部が大きく伸長しており、基質結合ポケットに向かって大きくせり出している様子が観察された (図 1)。このループが基質ポケットの容積を狭め、短いペプチドにより適したポケットが形成されることが示唆された。

DsaJ は、環状ヘキサペプチド desotamide 類の生合成を担う PBP-type TE である。一般的な PBP-type TE が基質 C 末端に D-アミノ酸残基を有する基質を選択的に環化する一方、DsaJ は C 末端にアキラルな Gly 残基を有する基質を環化する。この特異

な選択性の構造的基盤について知見を得るため、AlphaFold 2 を用いて DsaJ のモデル構造を作成し、SurE と比較した。SurE の基質 C 末端の D-アミノ酸選択性は、触媒セリン残基周辺に存在する疎水性ポケットが重要である事が示唆されていた。DsaJ のモデル構造ではこの疎水性ポケットを構成する残基が嵩高い残基に置換しており、ポケットが埋没している様子が観察された。DsaJ の特異な基質選択性はポケットの構造に起因すると予想し、SurE にてポケットを構成する残基を嵩高いものに置換した。その結果、本変異酵素は、本来の基質（C 末端残基 D-Leu）に対する活性が消失した一方で、C 末端に Gly 残基を有する基質をあらたに環化できるようになった。以上の結果から、疎水性ポケットが基質 C 末端残基の認識に重要であることを示し、SurE と DsaJ の C 末端残基の選択性を完全に入れ替えることに成功した。

結論

天然に存在する PBP-type TE の基質特異性に着目し、詳細な機能解析と酵素工学による機能改変を試み、さまざまな基質に対応した環化酵素を開発することに成功した。現在、これらの環化酵素を利用して、より効率的に環状ペプチドを合成できる手法を開発している。

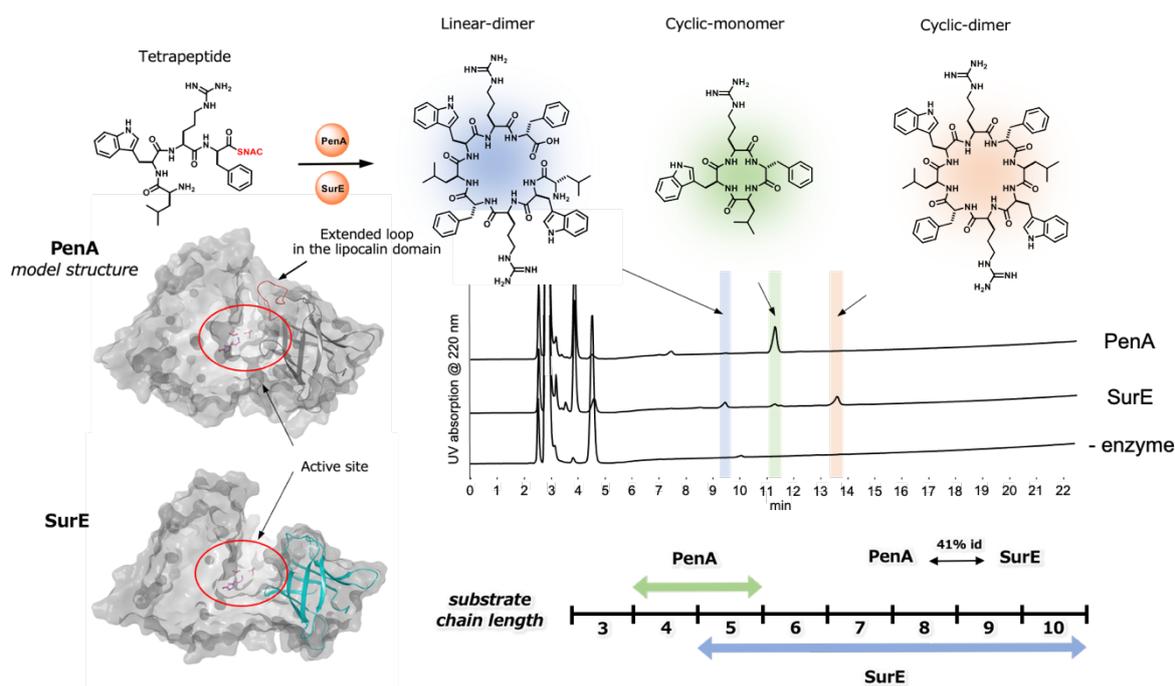


図 1 PenA の機能解析

文献

- 1) Matsuda, K., Fujita, K., and Wakimoto, T. (2021) PenA, a penicillin-binding protein-type thioesterase specialized for small peptide cyclization. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **48**: kuab023.