

「短鎖環状ペプチドの酵素・生物合成」

研究期間：2020年11月～2023年3月

研究者：松田 研一

1. 研究のねらい

環状ペプチドは、直鎖状ペプチドに比べ標的特異性、膜透過性、分解酵素への耐性に優れる。実際、抗生物質 daptomycin や免疫抑制剤 cyclosporine 等の臨床応用された天然物や合成ペプチド医薬品が環状骨格を有する。中でも 10 残基以下のアミノ酸から構成される短鎖環状ペプチドは優れた代謝安定性・組織移行性を示す。実際、哺乳類で経口吸収性が報告されている環状ペプチドのうち 9 割以上を 10 残基以下の短鎖環状ペプチドが占める。このため、短鎖環状ペプチドの効率的な合成法の開発は、医薬品開発から製造プロセスまで、広い範囲に波及効果を与えうる。現状、ペプチドの環化反応は、煩雑な保護基の着脱工程や、高価な縮合剤、大量の有機溶媒を要する点で課題を抱えている。また縮合剤の使用は分離困難な異性体の副生成物を生じる。ペプチド結合はトランス配座が優先するため反応点を近づけることが難しく、鎖長が短くなるほど環化反応は特に困難である。一方で環状ペプチドは天然からも数多く単離されており、これらの生合成を担う環化酵素を触媒として用いることで、環状ペプチドの効率生産が可能になると考えられてきた。実際、微生物や植物由来のペプチド環化酵素は研究試薬として市販されている。しかしこれらはいずれも 10 残基以上の比較的大きな環状ペプチドの環化反応に限定的である。結果として、10 残基以下の短鎖環状ペプチドの合成は、化学的にも酵素的にも困難である。

一方、我々はこれまで放線菌の非リボソーム性環状ペプチド生合成経路において、新規なペプチド環化酵素ファミリー「ペニシリン結合タンパク質型チオエステラーゼ (PBP-type TE)」を見出してきた。代表的な PBP-type TE である SurE は、構造の全く異なる 2 種の短鎖環状ペプチドの生合成に関与し、非常に寛容な基質選択性を有する。本酵素は短鎖環状ペプチド合成のための生体触媒ツールとして高いポテンシャルを有する一方、これまでの解析から、環化点となる残基に対して一定の選択性を示すことが判明している。

そこで本研究では、SurE の基質選択性の分子基盤を解明する。得られた知見に基づき、酵素工学的的手法により選択性を拡張した改良生体触媒を創成する。これにより、これまで効率的な合成法が存在しなかった短鎖環状ペプチドを精度高くかつ安定して供給する、汎用性・環境調和性に優れる合成技術の開発を目指す。加えて、本酵素を活用した合成生物学により、短鎖環状ペプチドの生物合成法の確立を試みる。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、我々が独自に見出した新規酵素ファミリー PBP-type TE を活用した短鎖環状ペプチドの効率合成法の確立を目指す。これにあたり、PBP-type TE の基質選択性の分子基盤を解明することを第一目標とした。また得られた知見に基づく酵素工学により、現状

でSurEが抱える基質選択性の課題を克服することを目指した。まず、異なる基質選択性を有するホモログ酵素を比較し、①基質鎖長、②環化点の立体化学、③C末端側鎖残基の3つのポイントに焦点を絞って選択性の分子基盤の解明を目指した(詳細 I)。

期間内の研究により、①②についてはそれぞれ PenA, DsaJ との比較解析により、選択性に関わるタンパク質部分構造を同定した。

また本研究では、SurE を活用して非天然型環状ペプチドを生物合成するための、合成生物学的手法の確立を目指した(詳細 II)。しかし、計画を進める過程で人工非リボソームペプチド合成酵素の創成が技術的に困難であることが判明したため、生物合成法の確立には至らなかった。

(2) 詳細

I. 「PBP-type TE の基質選択性の分子基盤の解明」

PBP-type TE の基質は、C末端にチオール性の脱離基を有する5~10残基程度のペプチドであり、分子量1000弱の中分子である。本研究ではPBP-type TE の基質選択性を検証するにあたり、①基質鎖長、②環化点の立体化学、③C末端側鎖残基の3つのポイントに焦点を絞って選択性の発現メカニズムを解明し、選択性の分子基盤の包括的な理解を目指した。そのうえで、これら3点が明確に異なるホモログ酵素を比較した。

① 鎖長選択性について(引用文献1として発表済)

PenA は5残基の環状ペプチド pentaminomycin 類、BE-18257 類の生合成を担うPBP-type TE である。8-10残基のペプチドを環化する SurE とは基質サイズに対する選択性が異なる可能性を考え、PenA 組換え酵素を用いてその鎖長選択性を SurE と比較した。その結果、これらの酵素は基質の基質サイズに対して異なる選択性を示した。テトラペプチドを基質とした反応において、SurE は単量環化体及び二量環化体を与えたのに対し、PenA は二量環化体を与えず、単量環化体を選択的に与えた(図1)。このことから PenA は SurE と比較して、より短鎖のペプチド基質の環化に特化した環化酵素であることが明らかとなった(引用文献1)。また PenA のモデル構造を SurE のアポ体の構造と比較したところ、C末端側のリポカリンドメインのターンループが10残基ほど伸長しており、基質ポケットの入り口に覆いかぶさるように位置することが示唆された。このことから本ループ構造が PenA に短鎖ペプチド選択性を付与する重要な構造モチーフである可能性が示唆された(引用文献1)。

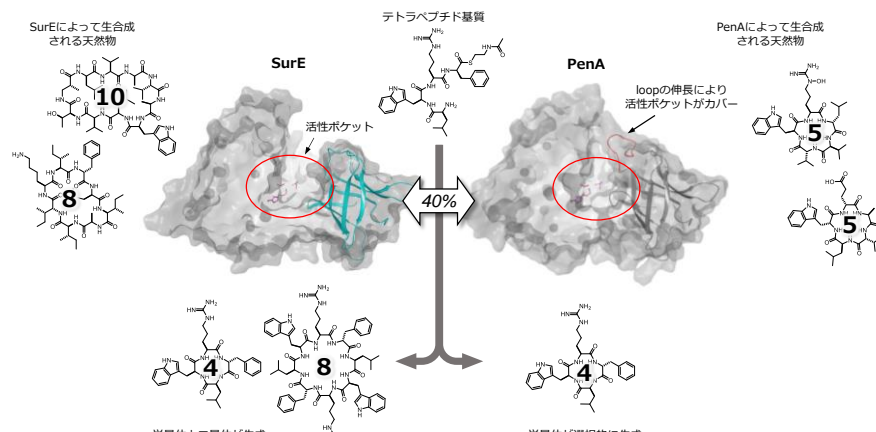


図 1. SurE (左) と PenA (右、モデル構造) の基質選択性と構造の比較

II. 「PBP-type TE を活用した合成生物学による非天然短鎖環状ペプチドの生物合成」

SurE は試験管内だけでなく細胞内でも寛容な選択性を示す。実際、SurE は構造の全く異なる 2 種の環状ペプチドの生合成を担うことに加え、人工的なペプチド合成酵素にも作用し、非天然型環状ペプチドの生物合成も可能であった (Matsuda, K. *et al. Nat. Catal.* 2020)。そこで本研究では、天然型のペプチド合成酵素を改変し、これと SurE 遺伝子を組み合わせることで人工的な環状ペプチド合成経路を細胞内で構築し、非天然短鎖環状ペプチドの生物合成の方法論を確立することを目指した。

当初、人工非リボソームペプチド合成酵素は天然型遺伝子の相同組換えにて創出することを想定していたが、実験を進めるにつれ、同手法により、細胞内で機能する人工酵素を創出することは非常に困難であることが判明した。その理由として、非リボソームペプチド合成酵素が非常に巨大であること (数 MDa)、また繰り返し配列を多く含み狙い通りの組換えが起きづらいことが考えられる。また、狙い通りの配列の酵素が創出できた場合も、生合成中間体を受け渡す酵素ドメインのペアは人工的であるため、触媒機能の担保は困難である。結果として、本研究期間内に同研究テーマに関する成果は得られなかった。今後、非リボソームペプチド合成酵素の人工改変についての知見が集積すれば、当初計画が実現可能になると考えられる。また、人工酵素創出においても、相同組換えではなく、より精度の高い CRISPR-Cas9 システムを使用する等の工夫が必要であった。

3. 今後の展開

本研究では、当初目標とした環化酵素の基質選択性の分子基盤を包括的に理解するには至らなかったものの、基質鎖長に対する選択性・末端残基に対する立体選択性を明らかにできた。今後は残る末端残基側鎖に対する選択性の構造基盤解明に挑む。

4. 自己評価

本研究課題は概ね順調に遂行できたと考えている。得られた成果を 1 報の論文として発表し、また本報告書作成時点で、もう 1 報が submit 直前の段階、さらにもう 1 報を執筆中という状況であり、論文発表という点から一定の成果につながったと考えている。2018 年に我々が同酵素ファミリーを報告して以来、少なくとも 3 つの異なる海外の研究グループが同酵素ファミリーの研究に参入

してきており、競争が激化している状況であるが、本研究で得られた成果によって国際的なイニシアチブを維持できたと考えている。

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:8件

1. Matsuda, K., Fujita, K., Wakimoto, T. PenA, a penicillin-binding protein-type thioesterase specialized for small peptide cyclization. <i>J. Ind. Microbiol. Biotechnol.</i> 2021 , <i>48</i> , kuab023. 抗菌性環状ペプチド pentaminomycin 類、BE-18257 類の生合成遺伝子クラスターにコードされた機能未知の SurE ホモログ酵素 PenA の機能解析を行った。本酵素は <i>in vitro</i> で pentaminomycin C 類縁体ペプチド配列を定量的に環化したことから、ペプチド環化酵素として機能することが明らかになった。本酵素は SurE とは明確に異なる鎖長選択性を有しており、4 残基の非常に短いペプチド鎖に対しても選択的に単量環化体を与えた。PenA モデル構造の解析から、短鎖ペプチドの環化に関与すると考えられる伸長したループ構造を見出した。
2. Phan, C.-S. [#] , Matsuda, K. [#] , Balloo, N., Fujita, K., Wakimoto, T.* [*] , Okino, T.* [*] Argicyclamides A-C unveil enzymatic basis for guanidine bis-prenylation. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> 2021 , <i>143</i> , 10083-10087. ([#] equal contribution) 淡水生シアノバクテリアより特異なビスプレニルグアニジン構造を有する環状ペプチド argicyclamide 類を発見した。グアニジンのビスプレニル化は抗 MRSA 活性の発現に重要であった。またグアニジンビスプレニル化酵素 AgcF を発見し、その基質選択性を詳細に解析した。プレニル化グアニジンは植物や微生物由来の天然物にしばしばみられる特異な官能基であるが、その生合成酵素が明らかになったのは今回が初めてである。
3. Matsuda, K.* [*] , Arima, K., Akiyama, S., Yamada, Y., Abe, Y., Suenaga, H., Hashimoto, J., Shinya, K., Nishiyama, M., Wakimoto, T.* [*] A natural dihydropyridazinone scaffold generated from a unique substrate for a hydrazine forming-enzyme. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> 2022 , <i>144</i> , 28, 12954-12960. (*co-corresponding authors) ゲノム情報を指標にした天然物探索を行い、医薬品母核として盛んに研究されてきたジヒドロピリダジノン環を有する初めての天然物 actinopyridazinone 類を放線菌より発見した。またその特異な環構造を全合成によって実証した。またその生合成における鍵中間体であるヒドラジンを同定し、微生物のもつヒドラジン生合成経路の多様性を明らかにした。actinopyridazinone 類の生合成酵素の利用することで、本複素環の効率的な合成や構造展開が可能になる。
4. Kobayashi, M., Fujita, K., Matsuda, K.* [*] , Wakimoto, T.* [*] Streamlined chemoenzymatic synthesis of cyclic peptides by non-ribosomal peptide cyclases. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> 2023 , <i>145</i> , 3270-3275. ペプチドの環化反応は多量体化反応と競合する難度の高い反応である。一方、これまで研究グループは新しいタンパク質ファミリーの非リボソームペプチド環化酵素を世界に先駆けて発見し、その詳細な機能解析を行ってきました。本研究では、これまでボトルネックとなっていた煩雑な基質合成法を改良し、ペプチド固相合成と酵素による環化反応をシームレスに

実施できる環状ペプチドの化学-酵素合成法を確立した。さらに、野生型酵素の探索や論理的な酵素触媒の改変により、合成できる環状ペプチドの多様性を拡張した。

(2)特許出願

研究期間全出願件数: 5 件(特許公開前のもも含む)

1	発明者	脇本敏幸、松田研一、小林雅和
	発明の名称	環状ペプチドの効率的な化学-酵素合成方法
	出願人	北海道大学
	出願日	2021/10/18、2022/2/21、2022/10/17
	出願番号	特願 2021-170218、特願 2022-24966、PCT/JP2022/038513
	概要	エチレングリコールを脱離基として用いることで、環化基質を高純度で簡便に固相合成し、これを SurE などの PBP-type TE もしくは、TycC-TE を生体触媒とするペプチド環化反応に供することで、環状ペプチドを効率的に化学酵素合成する手法を開発した。
2	発明者	脇本敏幸、松田研一、小林雅和
	発明の名称	酵素を用いたペプチドライゲーション
	出願人	北海道大学
	出願日	2021/9/27
	出願番号	特願 2021-157054
	概要	SurE などの PBP-type TE を用いることで、脱離基を有するアシルドナー基質と脱離基を有さないアクセプター基質のライゲーション反応を行う手法を開発した。

(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)

- 2023 年 1 月、北海道大学プレスリリース「効率的な環状ペプチドの化学-酵素ハイブリッド合成法を開発～環境調和性の高い環状ペプチド製造法の発展に期待～」(薬学研究院 教授 脇本敏幸、講師 松田研一)
- 松田研一, Division Topics, 細菌のもつ多様なヒドラジン生合成経路の開拓, *化学と工業*, **2023**, 76.
- 2022 年 9 月、令和 4 年度日本生薬学会 学術奨励賞
- 2022 年 7 月、北海道大学プレスリリース「微生物ゲノム情報から天然物として新規の複素環を発見～これまでにない骨格を有する天然物の発見に期待～」(薬学研究院 講師 松田研一、教授 脇本敏幸)
- 松田研一, 脇本敏幸, 「研究者の広場」ペプチド環化反応を触媒する新しい酵素ファミリー「PBP-type TE」の発見と機能解析, *アグリバイオ*, **2022**, 8 月号.
- 松田研一, 「期待の若手」(研究教育の座右の銘)・趣味・(抱負), *ファルマシア*, **2022**, 58, 5, 465_2.
- 2021 年 10 月、第 63 回天然有機化合物討論会 奨励賞 口頭発表の部
- 2021 年 10 月、第 57 回ペプチド討論会 若手口頭発表優秀賞
- 2021 年 10 月、令和 3 年度 日本薬学会生薬天然物部会 奨励研究

松田研一, 脇本敏幸, 新規ペプチド環化酵素 PBP-type TE の発見と機能解析, *ファインケミカル*, 4 月号, 2021.

