

非リボソームペプチドの環化機構を解明

～ペプチド環化生体触媒の開発に期待～

ポイント

- ・ X線結晶構造解析によって新規ペプチド環化酵素 SurE の構造を解明。
- ・ SurE の基質選択性と一般的な非リボソームペプチド環化機構を解明。
- ・ 多様な環状ペプチドを効率的に合成する生体触媒の開発に期待。

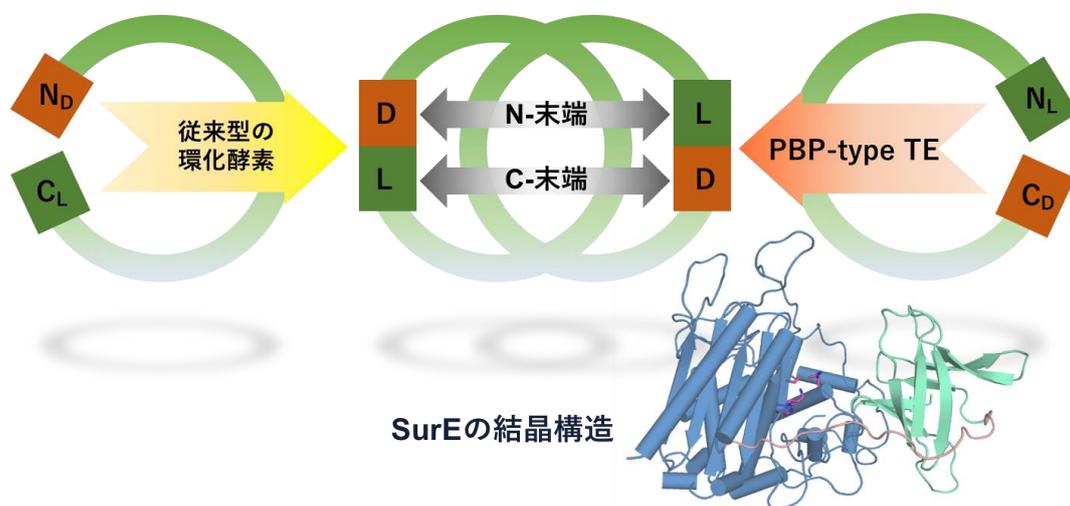
概要

北海道大学大学院薬学研究院の松田研一助教，脇本敏幸教授及び東京大学大学院薬学系研究科の森 貴裕助教，阿部郁朗教授らの研究グループは，放線菌^{*1}から発見した新規ペプチド環化酵素 SurE の触媒機構の解明に成功しました。ペニシリン結合タンパク質（PBP-type TE^{*2}）に分類される SurE は，直鎖状のペプチド鎖の両端を認識し，N 末端と C 末端のアミノ酸残基間でアミド結合を形成して環状ペプチドを効率的に合成することがわかりました。

SurE は，C 末端残基に D-アミノ酸，N 末端残基に L-アミノ酸を有する基質を選択的に受け入れ，中央部のアミノ酸残基に対しては寛容な選択性を示します。この知見は X 線結晶構造解析によって得られた SurE の構造情報からも支持されました。さらに D-アミノ酸と L-アミノ酸との間のヘテロキラルな環化反応は，自然界のほぼ全ての環状非リボソームペプチド^{*3}においても共通の機構であることがわかりました。さらに，本研究では SurE の寛容な基質特異性と放線菌細胞内で改変した非リボソームペプチド合成酵素^{*4}を組み合わせることで，非天然型環状ペプチドの合成にも成功しました。PBP-type TE ファミリー酵素の機能をさらに開拓し，生体触媒や合成生物学的手法へ展開することによって，環状ペプチドの新しい供給法の確立につながることを期待されます。

本研究成果は，2020 年 5 月 5 日（火）公開の *Nature Catalysis* 誌にオンライン掲載されました。

非リボソーム依存性環状ペプチド



本研究成果の概要

【背景】

環状ペプチドは薬理活性が期待できる重要な化合物グループですが、化学反応によるペプチド環化反応は制御の難しい反応です。一方、温和な条件下において高い選択性でペプチドを環化する「ペプチド環化酵素」は、副産物の少ないクリーンな触媒としての応用が期待されます。

今回、研究グループは新たなペプチド環化酵素（PBP-type TE）を詳細に解析し、ペプチドの N 末端と C 末端のアミノ酸残基を位置選択的に結合し環化する反応機構の解明に成功しました。PBP-type TE は 2018 年に海洋由来の放線菌から見出された全く新しい非リボソームペプチド環化酵素ファミリーです。従来のペプチド環化酵素は、巨大な非リボソームペプチド合成酵素に融合したドメイン*⁵として存在しますが、PBP-type TE は単独で存在するコンパクトな酵素であるため、触媒として扱いやすい性質をもちます。さらに、本研究では放線菌の遺伝子操作により環状ペプチドを人為的に改変することにも成功し、PBP-type TE を基軸とした新しい代謝エンジニアリングの方法を提唱しました。

【研究手法】

研究グループは、PBP-type TE ファミリーのうち、カテプシン B 阻害物質スルガミドの生合成に関わる SurE を対象に研究を行いました。SurE の基質選択性を検証するため、基質ペプチドを模倣した基質類縁体を多数設計・化学合成し、酵素動力学解析を行いました。また、タンパク質の X 線結晶構造解析を行い SurE の反応機構に対する詳細な知見を得ました。さらに、スルガミド生産菌の遺伝子改変を行い細胞内における SurE の基質許容性を検証しました。

【研究成果】

多数の合成基質類縁体を用いて SurE の基質許容性を調べたところ、SurE は基質ペプチド配列内部のアミノ酸残基に対する選択性をほとんど示さず、対応する環状ペプチドへと効率的に変換することがわかりました。また、SurE は N 末端の D-アミノ酸と C 末端の L-アミノ酸間のペプチド結合形成を選択的に触媒しました。この知見がきっかけとなり、ヘテロキラルなアミノ酸残基間での環化は head-to-tail 型の非リボソーム環状ペプチドの生合成一般に共通した事象であること、さらには従来の非リボソームペプチド環化酵素と PBP-type TE の環化点の立体化学が鏡像関係にあることを見出しました。

以上に加え、SurE の反応機構に対する詳細な知見を得るため X 線結晶構造解析を行い、本酵素ファミリーの立体構造についても初めて明らかにしました。解析にあたっては、タンパク質構造情報を基に変異体を作製し、環化反応に関わるアミノ酸残基を同定しました。また、反応中間体の安定配座計算から SurE の立体選択性を裏付ける結果を得ました。

試験管内で明らかになった SurE の寛容な基質許容性を微生物細胞内においても検証するため、ペプチド合成酵素遺伝子を改変したところ、遺伝子改変微生物細胞は新しい環状ペプチドを生産するようになりました。このことから、SurE は細胞内においても非天然型の基質を受け入れてフレキシブルに機能することがわかりました。

【今後への期待】

本研究では PBP-type TE の反応機構のほか、PBP-type TE が試験管内と細胞内の両方で寛容な基質許容性を示すことを明らかにしました。今後、PBP-type TE をベースとした生体触媒や合成生物学的手法の開発により、環状ペプチドの新しい供給法の確立につながることを期待されます。

【謝辞】

本研究は、文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「生合成リデザイン」、基盤 B、若手研究及び国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）「革新的中分子創薬技術の開発」、旭硝子財団、内藤記念科学振興財団、上原記念生命科学財団の支援を受けて行われました。

論文情報

論文名 Heterochiral Coupling in Non-ribosomal Peptide Macrolactamization (非リボソームペプチドの環化反応はヘテロキラルなアミノ酸残基間で進行する)
著者名 松田研一¹, 翟睿², 森貴裕², 小林雅和¹, 佐野文映¹, 阿部郁朗², 脇本敏幸¹
(¹北海道大学大学院薬学研究院, ²東京大学大学院薬学系研究科)
雑誌名 *Nature Catalysis* (触媒分野の専門誌)
DOI 10.1038/s41929-020-0456-7
公表日 2020年5月5日(火)(オンライン公開)

お問い合わせ先

北海道大学大学院薬学研究院 教授 脇本敏幸 (わきもととしゆき)
TEL 011-706-3239 FAX 011-706-3922 メール wakimoto@pharm.hokudai.ac.jp
URL <http://www.pharm.hokudai.ac.jp/tennen/index.html>
東京大学大学院薬学系研究科 教授 阿部郁朗 (あべいくろう)
TEL 03-5841-4740 FAX 03-5841-4744 メール abei@mol.f.u-tokyo.ac.jp
URL <http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~tennen/head.htm>

配信元

北海道大学総務企画部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目)
TEL 011-706-2610 FAX 011-706-2092 メール kouhou@jimuhokudai.ac.jp
東京大学大学院薬学系研究科庶務チーム (〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1)
TEL 03-5841-4719 メール shomu@mol.f.u-tokyo.ac.jp

【用語解説】

- *1 放線菌 … 様々な環境に生息するグラム陽性細菌の一種。生物活性物質を産生する能力が高く、これまでに数多くの有用化合物が放線菌から発見されてきた。
- *2 PBP-type TE … ペニシリン結合タンパク質 (Penicillin Binding Protein) に類似したチオエステル加水分解酵素の略。
- *3 非リボソームペプチド … リボソームを介さずに生合成されるペプチドの総称。タンパク質にはみられない様々な種類のアミノ酸が含まれるため、非常に大きな構造多様性をもつ。
- *4 非リボソームペプチド合成酵素 … ペプチドの材料となるアミノ酸を取り込む酵素ドメインやアミノ酸同士を縮合する酵素ドメイン等が多数連結した巨大なモジュール型合成酵素。
- *5 ドメイン … タンパク質の構造中で特定の機能を有する一部分。