

【目的】 ペプチドは環状化することで剛直な構造をとり、作用標的特異性、膜透過性、分解酵素への耐性が向上する。このため、ペプチドの大環状形成反応は生物活性を示すペプチドの化学合成において非常に重要なステップである。しかし、本ステップは、煩雑な保護・脱保護、異性化や分子間反応の抑制といった克服すべき問題を抱えている。一方、天然物の生合成では、各ペプチドに特化したペプチド環化酵素が、保護基を用いることなく位置選択的な環化を効率よく触媒する。このため、基質特異性の寛容なペプチド環化酵素は、ペプチド環化触媒としての応用が期待される。一方で我々は最近、海洋放線菌に由来する非リボソームペプチド *surugamide* 類の生合成に関わる新規ペプチド環化酵素 *SurE* を同定した。一般的な非リボソームペプチドの生合成では、ペプチドの環化を触媒する末端ドメインは NRPS の C 末端に融合しているのに対し、*SurE* は NRPS から独立した単独タンパク質である。*SurE* は従来の末端ドメインとは配列相同性を示さず、細胞壁合成を担うペニシリン結合タンパク質 PBP に類似することから、これを新しいタイプの末端ドメイン「PBP-type TE」として提唱している。データベース検索の結果、PBP-type TE は放線菌ゲノム情報中に 200 個以上見出され、普遍的な環状ペプチド生合成の仕組みであることが判明した。しかしこれらの基質選択性は全く明らかではなかった。そこで本研究では、化学合成した多数のペプチド基質を用いて、PBP-type TE ファミリーの選択性を明らかにすることを目指した。同時に、タンパク質 X 線結晶構造解析およびモデリングにより、基質選択性発現のメカニズムを明らかにし、その発現に重要な「モチーフ残基」を同定することを試みた。これにより得られる知見は、合理的な酵素改変による改良型ペプチド環化触媒の創成のための基盤となる。加えて本研究では、PBP-type TE の *in vivo* における利用可能性についても検証した。具体的には、基質選択性の寛容な PBP-type TE 遺伝子を、微生物細胞内で人工 NRPS と協働させることにより、非天然型環状ペプチドの生物生産技術の確立を目指した。

【方法】 PBP-type TE 遺伝子をデータベースから選定し、大腸菌を宿主として組換え酵素を調製した。ペプチド固相合成法によりモデル基質類を合成し、各組換え酵素と反応させることで基質選択性を検証した。また、X 線結晶構造解析により *SurE* の立体構造情報を取得した。得られた構造情報を基にホモログ酵素のモデル構造を作製し比較することで、基質選択性の違いが生じる構造的要因について考察した。

【結果】 組換え酵素を用いた *in vitro* 試験の結果、*SurE* は 1. 基質内部のアミノ酸配列に対しては寛容な選択性を示すこと、および 2. 基質末端のアミノ酸残基に対して厳密な選択性を示すことが判明した。末端残基の立体化学に対する選択性は酵素ファミリー全体に共通した性質であることがデータベースの配列解析から示唆された。またタンパク質 X 線結晶構造解析に成功し、PBP-type TE のタンパク質構造を初めて明らかにした。さらにホモログ酵素 PenA の機能解析により本酵素の短鎖ペプチドに特化した選択性を明らかにするとともに、選択性の要因となると考えられる特徴的なタンパク質構造モチーフを明らかにした。また、改変型 NRPS 遺伝子と *SurE* 遺伝子を有する放線菌による非天然型環状ペプチドの生物合成に成功し、*SurE* の基質寛容性は *in vivo* においても発揮されることを示した。

生体触媒ツールおよび合成生物学ツールとしての PBP-type TE の応用可能性

