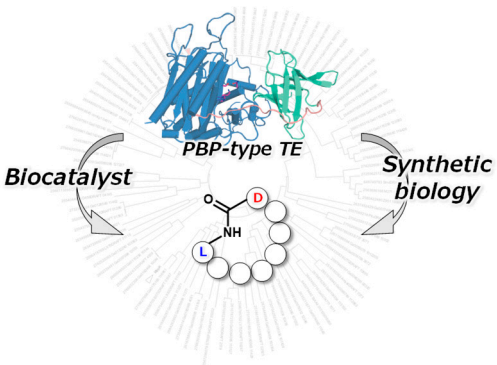
121　PBP type-TEによる環状ペプチドの化学・生物生産	松田　研一

【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



121. PBP-type TE による環状ペプチドの化学・生物生産

松田　研一

北海道大学 大学院薬学研究院 天然物化学研究室

Key words：環状ペプチド，生体触媒，酵素，環化反応，放線菌

緒　言

免疫抑制剤シクロスポリンや抗 MRSA 抗菌薬ダプトマイシンに代表される天然由来の環状ペプチドは、多くの生物活性物質を含む重要な医薬資源である。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、本ステップは比較的難易度の高い反応であり、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。リボソームに由来するペプチドに作用する環化酵素はこれまでに微細藻類や植物などから endopeptidase 型の環化酵素がいくつか報告されており、14 残基以上の比較的大型のペプチドに対して幅広い基質特異性を有することが示されている。一方、リボソーム由来ペプチドに比べ複雑な異常アミノ酸を多く含む非リボソーム経路に由来するペプチドの環化酵素の例は乏しく、非リボソーム型ペプチド合成酵素 NRPS の C 末端に融合した末端ドメインが知られるのみであった。

そのような中、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［1，2］の生合成に関わる新規ペプチド環化酵素 SurE を同定した［3］。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、我々の見出した SurE は NRPS から独立して存在する。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（図 1a、b）［3］。続く詳細な解析により、SurE が基質ペプチドの配列・鎖長に対して寛容なペプチド環化酵素であること、その認識には基質両末端のアミノ酸残基が重要であることを明らかにしてきた［4，5］。データベース検索の結果、類似の *PBP-type TE* 遺伝子は、三つの抗菌活性環状ペプチド mannopeptimycin や desotamide、ulleungmycin の生合成遺伝子クラスター中にも見出されたほか、放線菌ゲノム情報中に 200 個以上見出された（図 1c）このことから PBP-type TE は、多くの環状ペプチドの生合成に関与する普遍的なペプチド環化の仕組みといえる。興味深いことに周辺の遺伝子情報から、多様な配列・鎖長のペプチド鎖が生合成されることが容易に予想された。このことはそれぞれの環化酵素の基質選択性が大きく異なっていることを示唆している（図 1c）。

そこで本研究では、放線菌に眠る機能未知の *PBP-type TE* ファミリーを一挙にクローニングし、化学合成した基質類縁体を用いて、その基質スペクトルの全容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ル構造により PBP-type TE の基質選択性発現のメカニズムを明らかにし、各酵素の選択性発現に重要な「モチーフ構造」の同定を試みた。さらにはモチーフ残基に変異を導入し基質スペクトルを拡張した改変酵素の創成を目指した。

非リボソームペプチド合成酵素（NRPS）のエンジニアリングは様々な修飾ペプチドの醗酵生産を可能にする技術であるが、現状成功例は極めて少なく、汎用性の高い改変技術の確立には至っていない。これを困難にする主要因の一つとして従来の末端ドメインの厳密な基質選択性が挙げられる。一方、我々の見出した PBP-type TE は寛容な基質選択性を有することから、従来型の環化ドメインを PBP-type TE に換装することで、この問題は解決されうる。本研究で

は、上述の PBP-type TE の触媒利用を目指すことに加え、*PBP-type TE* 遺伝子を基軸とした NRPS エンジニアリングによって非天然型環状ペプチドの生物生産技術の確立を目指す。

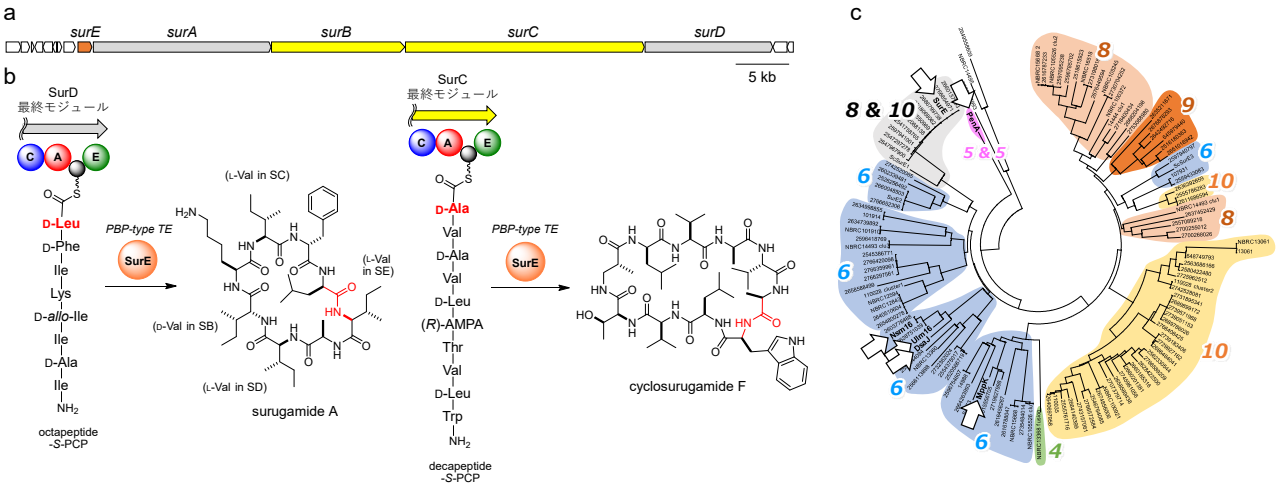


図 1. 非リボソーム型マクロラクタム surugamide 類の生合成

a) surugamide類生合成遺伝子クラスター。

b) ペプチド環化酵素SurEによるsurugamide類の環化反応。SurEはSurC/Dの両方にtransで作用し、鎖長・配列の異なる基質を環化する。

c) PBP-type TEのアミノ酸配列系統樹。機能が明らかなものを矢印で示した。また各酵素の基質鎖長を数字で示した。

方法および結果

1. SurE の基質選択性の検証

環状オクタペプチド surugamide B の環化前駆体を模倣したペプチドチオエステル体（SNAC 体）をモデルに、基質類縁体をペプチド固相合成法により調製した（図 2a）。両末端を除く配列内部のアミノ酸残基を、立体化学を保持したままそれぞれ Ala へと置換した基質類縁体を合成し、組換え SurE と 2 時間反応した。その結果、反応速度の低下が見られたものの、ほとんどの基質が定量的に環化産物へと変換された。また、いずれの基質を用いた場合でも、加水分解や多量体化といった副反応の進行は認められなかった。このことから SurE は配列内部のアミノ酸残基に対して寛容な選択性を示すことが明らかになった。また、SurE の基質末端残基に対する選択性を検証したところ、両末端の脂肪族アミノ酸残基を親水性アミノ酸や側鎖の小さい D-Ala や Gly へと置換した基質では環化反応が進行しなかった。一方で、芳香族アミノ酸へと置換した基質は野生型の基質よりも高い効率で環化産物へと変換された。また基質末端アミノ酸残基の立体化学に対する選択性を検証するため、*N* 末端の L-Ile を D-*allo*Ile に置換した基質、及び *C* 末端の D-Leu を L-Leu に置換した基質をそれぞれ合成し酵素反応に供した。その結果、*N* 末端の立体置換体は徐々に加水分解されるのみであり、環化反応の進行は認められなかった。また C 末端置換体の場合は、基質の消費は認められなかった。このことから SurE は基質両末端残基の立体化学を厳密に認識し、両末端のヘテロキラルな残基（*N*末端の L-アミノ酸と *C* 末端の D-アミノ酸）間のマクロラクタム化を選択的に触媒することが明らかとなった［6］。

2. SurE の X 線結晶構造解析

SurE の立体選択性の発現メカニズムを明らかにするため、SurE の X 線結晶構造解析を行った。SAD 法により SeMet 置換体の構造を分解能 2.7 Å で取得し、分子置換法により野生型 SurE の *apo* 体構造を 2.2 Å で取得した。非対称単位には 2 分子のモノマーが含まれており、*N* 末端の PBP に類似したドメインと、C 末端の β-バレル構造の

リポカリンドメインはフレキシブルなリンカーにより結合していた（図 2b）。リポカリンドメインは PBP ドメインの活性中心に覆いかぶさるように位置しており、二つのドメインの間に基質結合ポケットが形成されていた。SurE の基質 *C* 末端残基に対する立体選択性について検証するため、*apo* 体構造と、基質ペプチド鎖の *C* 末端を模倣した *N*-formyl- D-Leu を基にペプチド-酵素複合体のモデル構造を生成した（図 2c）。ペプチド鎖の最安定配座を計算したところ、*N*-formyl- D -Leu を結合したモデルは、*N*-formyl- L-Leu を結合したモデルと比較して安定であった。*C* 末端 D-Leu の側鎖は活性中心付近の Leu231 や Val309 によって形成される疎水性ポケットに格納されており、このポケットが *C* 末端 D-アミノ酸の認識に重要な役割を果たす可能性が示唆された（図 2c）。基質のソーキングによりペプチド-酵素複合体の構造決定を試みた結果、ペプチド鎖に相当する電子密度は観察されなかったものの、触媒 Ser 残基に結合した D-Leu 残基の電子密度が確認された。またこの時、187～228 のループが大きく構造変化し、ループ中の H225/M226 画活性中心に向かって接近する様子が観察された（図 2d、e）。H225 残基の変異体 H225A では野生型に比べて同等の K_m を示す一方で k_{cat} が約 3 倍低下したことから、このループはペプチド鎖の環化の段階に関与することが示唆された。このループの長さとアミノ酸配列はホモログ間で大きな差異があるため、基質選択性を左右する重要なモチーフ構造である可能性が考えられる［6］。

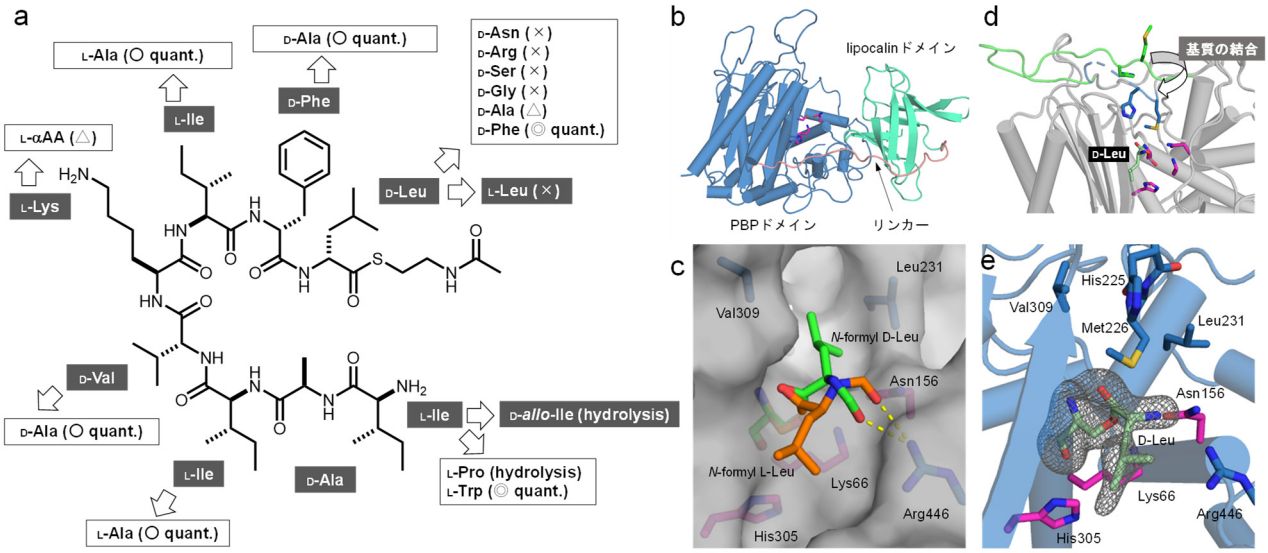


図 2. SurE の基質選択性の検証および X 線結晶構造解析

a） SurEの基質選択性の検証。

b） SurEのX線結晶構造解析。

c） 基質酵素複合体モデルの最安定配座計算結果。

d） 基質結合に伴うループ領域の動き。

e） holo体の基質結合サイト（ループ中のH225/M22が活性中心に接近している）。

3. 短鎖ペプチドの環化に特化した PEP-type TE, PenA の機能解析

データベース中に存在する PBP-type TE の基質選択性の多様性を明らかにすることを目的に、*PBP-type TE* 遺伝子を有する放線菌株を購入し、*PBP-type TE* 遺伝子のクローニングを行った。このうち、放線菌由来環状ペンタペプチド pentaminomycin 類および BE-18257 類の生合成におけるペプチド環状化反応を担う PenA の組換えタンパク質を可溶性画分に取得できたため、*in vitro* にてその基質選択性を詳細に検討した。その結果、PenA は SurE と同様に、1. *N*, *C* 末端残基に対する厳密な立体選択性（*N* 末端は L-アミノ酸、*C* 末端は D-アミノ酸）及び 2. 基質配列内部のアミノ酸に対する寛容な選択性、を示した。一方、これらの酵素は基質の鎖長に対しては異なる選択性を示した。特筆すべきことに、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 3）。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。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［7］。

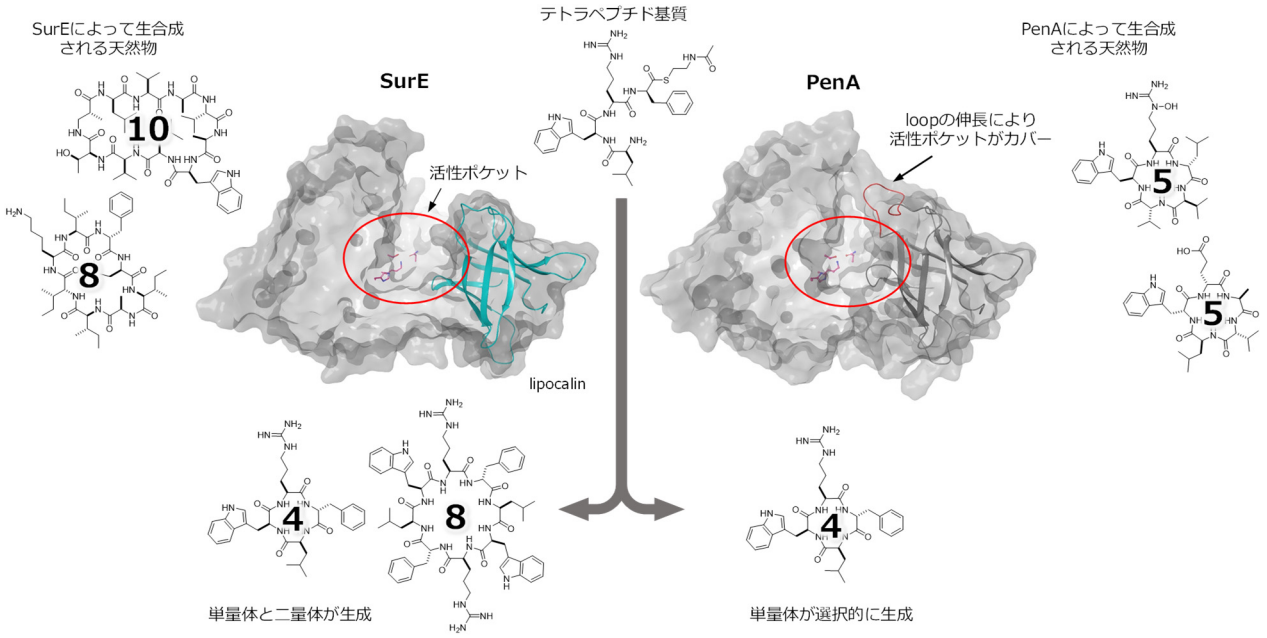


図 3. SurE と PenA の基質選択性の差異とタンパク質モデル構造の比較

図左半分にはSurEの立体構造とSurEによって生合成される天然物の構造を示した。またSurEの構造の下には、テトラペプチドを基質としてSurEが与える酵素生成物の構造を示した。また、図右半分にはPenAのモデル構造とPenAによって生合成される天然物の構造を示した。PenAのモデル構造の下にはテトラペプチドを基質としてPenAが与える酵素生成物の構造を示した。

4. 非天然型 surugamide 類縁体の *in vivo* 生産

SurE の寛容な基質選択性は試験管内だけでなく生体内でも発揮されることから、SurE を利用した非天然型の環状ペプチドの生物合成を試みた。環状デカペプチド cyclosurugamide F の環化前駆体の *C* 末端 2 残基 L-Val-D-Ala の伸長を担う NRPS、SurC のモジュール 5、6 の機能を終始コドンの挿入により破壊し、アッセンブリーラインを短縮した（図 4a）。形質転換体の代謝物の LC-MS 分析の結果、本形質転換体は cyclosurugamide F の生産能を失った一方で、非天然型の環状ペプチド **1** とその直鎖類縁体 **2** を生産した（図 4b、c）。このことから SurE は NRPS 末端モジュールだけでなく、本来相互作用しない内部モジュールの PCP ドメインに担持された非天然の基質にも作用し、環化できることが示された［6］。

考　察

非リボソーム型環状ペプチドの環化機構における PBP-type TE の位置付け

PBP-type TE と協働する NRPS はいずれも末尾の terminal module にアミノ酸残基の異性化を担う epimerization（E）ドメインを有しており、なおかつ先頭の loading module には E ドメインが存在しない。このことから、いずれの環化前駆体の *N* 末端も L-アミノ酸であり、*C* 末端は D-アミノ酸であると考えられ、本研究で SurE が示した基質末端残基の立体化学に対するヘテロキラルな選択性は PBP-type TE 全体に共通する特徴であると考えられる。一方で、

従来型の非リボソームペプチド環化ドメインによる環化点の立体化学を調べてみると、やはりほぼすべての環化点がヘテロキラルな残基間に位置していた。さらに興味深いことにその立体化学は PBP-type TE の基質とは逆であった（*N* 末端に D-アミノ酸、*C* 末端に L-アミノ酸）。したがって PBP-type TE は、従来型の環化ドメインに対して相補的なヘテロキラリティーを有する残基間のマクロラクタム化を触媒することで、環化過程の立体化学的制約を補完し、非リボソーム型環状ペプチドの多様化を実現する機構であると考えられる。

以上、本研究では SurE の基質選択性を検証し、その寛容な基質選択性を明らかにした。また、PBP-type TE の特異な立体選択性を明らかにし、PBP-type TE が非リボソームペプチドマクロラクタム化における環化点の立体化学を多様化するシステムであることを見出した。また、X 線結晶構造解析により PBP-type TE の立体構造を解明した。さらに SurE の寛容な基質選択性を利用して非天然型の環状ペプチドの生物合成に成功した。またホモログ酵素 PenA の機能解析により、基質選択性に影響をすると考えられるモチーフ構造を見出した。本研究により、PBP-type TE を利用した環状ペプチドの化学ー酵素・生物合成法の確立に向けた基盤となる知見が得られた。

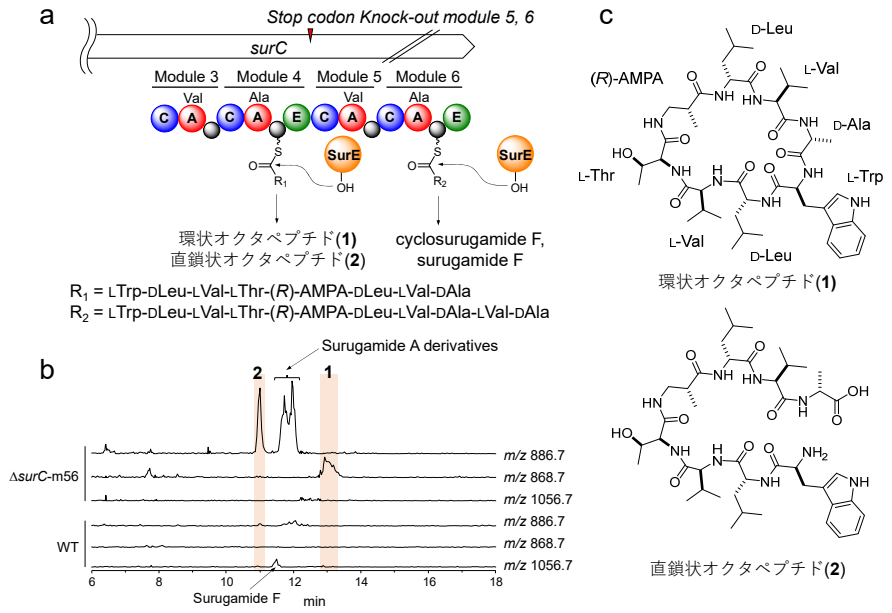


図 4. PBP-type TE を介した非天然環状ペプチドの生物合成

a) SurC の末尾 2 モジュールの遺伝子破壊。

b) 野生株と Δ*surC*-m56 の代謝物の LC-MS 分析。

c) 形質転換体（Δ*surC*-m56）が新たに産生した非天然ペプチド **1**、**2** の化学構造。

共同研究者・謝辞

本研究は北海道大学大学院薬学研究院の脇本敏幸教授の研究室で行われたものです。また X 線結晶構造解析は東京大学大学院薬学系研究科の阿部郁朗教授、森貴裕助教との共同研究により行われました。本研究の遂行にご助力賜りました先生方に厚く御礼申し上げます。また、研究資金を援助いただいた上原記念生命科学財団に厚く御礼申し上げます。

文　献

1) Takada K, Ninomiya A, Naruse M, Sun Y, Miyazaki M, Nogi Y, Okada S, Matsunaga S. Surugamides A-E, cyclic octapeptides with four D-amino acid residues, from a marine Streptomyces sp.: LC-MS-aided inspection of partial hydrolysates for the distinction of D- and L-amino acid residues in the sequence. J Org Chem. 2013 Jul 5;78(13):6746-50. doi: 10.1021/jo400708u. Epub 2013 Jun 20. PMID: 23745669.

2) Ninomiya A, Katsuyama Y, Kuranaga T, Miyazaki M, Nogi Y, Okada S, Wakimoto T, Ohnishi Y, Matsunaga S, Takada K. Biosynthetic Gene Cluster for Surugamide A Encompasses an Unrelated Decapeptide, Surugamide F. Chembiochem. 2016 Sep 15;17(18):1709-12. doi: 10.1002/cbic.201600350. Epub 2016 Jul 22. Erratum in: Chembiochem. 2017 Sep 5;18(17):1770. PMID: 27443244.

3) Kuranaga T, Matsuda K, Sano A, Kobayashi M, Ninomiya A, Takada K, Matsunaga S, Wakimoto T. Total Synthesis of the Nonribosomal Peptide Surugamide B and Identification of a New Offloading Cyclase Family. Angew Chem Int Ed Engl. 2018 Jul 20;57(30):9447-9451. doi: 10.1002/anie.201805541. Epub 2018 Jun 25. PMID: 29808953.

4) Matsuda K, Kobayashi M, Kuranaga T, Takada K, Ikeda H, Matsunaga S, Wakimoto T. SurE is a trans-acting thioesterase cyclizing two distinct non-ribosomal peptides. Org Biomol Chem. 2019 Jan 31;17(5):1058-1061. doi: 10.1039/c8ob02867b. PMID: 30637418.

5) Matsuda, K., Kuranaga, T., Wakimoto, T. A New Cyclase Family Catalyzing Head-to-Tail Macrolactamization of Non-ribosomal Peptides. J. Synth. Org. Chem., Jpn. 2019, 77, 1106-1115. https://doi.org/10.5059/yukigoseikyokaishi.77.1106

6) Matsuda, K., Zhai, R., Mori, T., Kobayashi, M., Sano, A., Abe, I., Wakimoto, T. Heterochiral coupling in non-ribosomal peptide macrolactamization. Nat Catal. 2020, 3, 507–515. https://doi.org/10.1038/s41929-020-0456-7

7) Matsuda, K., Fujita, K., Wakimoto, T. PenA, a penicillin-binding protein-type thioesterase specialized for small peptide cyclization, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2021;, kuab023, https://doi.org/10.1093/jimb/kuab023