



非リボソームペプチドの多様性を構築する アデニル化酵素のエンジニアリング

1. はじめに

近畿大学薬学部の石川文洋と申します。このたびは、本ペプチドニュースレターに寄稿する機会をいただきありがとうございます。お声がけいただいた東京大学理学系研究科の後藤佑樹先生に心より御礼申し上げます。

筆者は大阪府立大学理学系研究科の藤井郁雄教授（現大阪公立大学研究推進機構特任教授）の指導のもと、触媒抗体の高機能化に関する研究に取り組み 2009 年に学位を取得しました。その後カリフォルニア大学サンディエゴ校へ留学する機会を得た際、Michael D. Burkart 教授の研究室で、脂肪酸、ポリケチド、非リボソームペプチドの生合成に関わる酵素のタンパク質間相互作用を解明する研究に従事しました。京都大学大学院薬学研究科掛谷秀昭教授のもとで特定助教（2012.12–2017.3）を務めた後に、近畿大学薬学部田邊元三教授のもとで講師（2017.4–2023.3）および准教授（2023.4–）として研究する機会をいただき、非リボソームペプチドを生合成する非リボソームペプチド合成酵素（NRPS）の機能解析、エンジニアリング、ケミカルバイオロジー研究を行っています。本稿では、筆者が取り組んでいる NRPS のエンジニアリングに関する研究について紹介します。



石川 文洋

2. 非リボソームペプチドの多様性を構築するアデニル化酵素

有用な天然物である非リボソームペプチドは NRPS により生合成されています¹。免疫抑制剤であるシクロスポリン、抗菌剤であるバンコマイシン、鉄キレート剤であるエンテロバクチンに代表されるように、その多くは非常に重要な生物活性をもっています¹。そのため、非リボソームペプチドは将来にわたる医薬品資源として認識されています。しかし、天然物資源は枯渇しつつあると言われています。近年、天然物をより有効活用するため、その生合成系を改変し、誘導体を創製する手法がいくつか報告されています^{2,3,4}。また、このような手法が成熟することにより、複雑な天然物の迅速かつ簡便な誘導体化が可能になるだけでなく、思い描いた化合物を創ることが可能になると期待されています。さらに、地球環境を守りつつ持続的に医薬品資源を供給することは、グリーンケミストリーの観点からも重要な課題であります。

NRPS による非リボソームペプチドの生合成には、20 種類のタンパク質性アミノ酸以外に、500 種類以上の非タンパク質性アミノ酸も使える利点があり、創薬への応用が期待ができます⁵。NRPS 生合成系においてアデニル化酵素は、アミノ酸基質を選択する“gatekeeper”としての役割を担っています（図 1）。すなわち、アデニル化酵素のアミノ酸選択性を自在に制御できれば、非リボソームペプチドの酵素的な誘導体化が可能になります。そこで我々の研究室では NRPS の多様性を構築するアデニル化酵素に着目し、その機能制御に取り組んでいます。

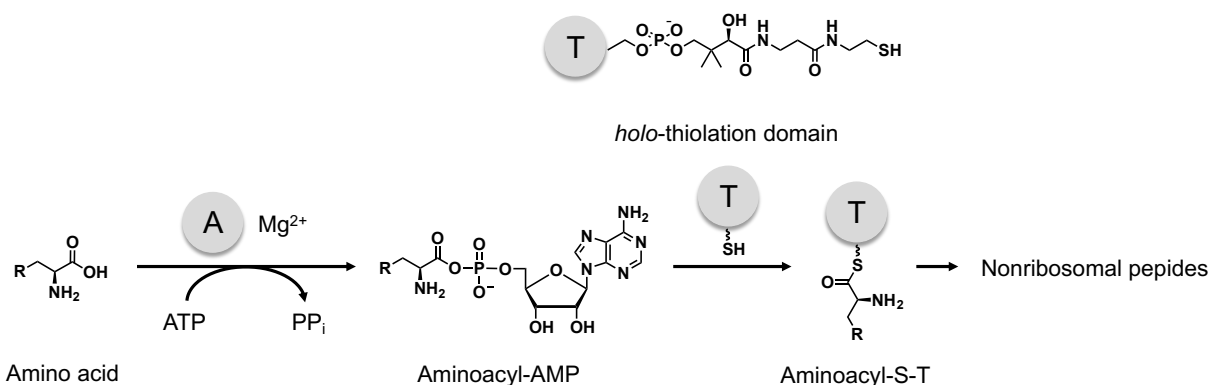


図1 非リボソームペプチド生合成におけるアデニル化酵素による触媒反応（A：アデニル化酵素；T：チオレーションドメイン）

3. 立体構造を基盤とするアデニル化酵素のエンジニアリング

500 種類以上のアミノ酸がアデニル化酵素の基質として利用され、多様な化学構造をもつ非リボソームペプチドが生成されています⁵。また、様々な安息香酸誘導体を基質とすることで非リボソームペプチドの構造多様性が拡張されています。アミノ酸を基質とするアデニル化酵素のエンジニアリングは数多く報告されていますが、その基質選択の厳密さゆえ汎用性の高い方法はありません。また、安息香酸誘導体を基質とするアデニル化酵素のエンジニアリングは、わずか 2 例報告されているだけです^{6,7}。そこで、我々は、エン

テロバクチン生合成に関与する 2,3-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB) あるいはサリチル酸 (Sal) を基質とするアデニル化酵素 (EntE) をモデルとして、厳密な基質特異性を緩和し、多様な安息香酸誘導体を許容するアデニル化酵素の創製を検討しました⁸ (図 2A)。

EntE による DHB の認識機構は、1) 基質結合部位のアミノ酸 Asn235 および Ser240 と DHB の水酸基との水素結合形成、2) Tyr236 と DHB のベンゼン環との π - π スタッキング相互作用に基づいています (図 2B)。すなわち、安息香酸誘導体選択的アデニル化酵素は、ベンゼン環部の認識に加えて、水素結合などによる置換基との相互作用により、基

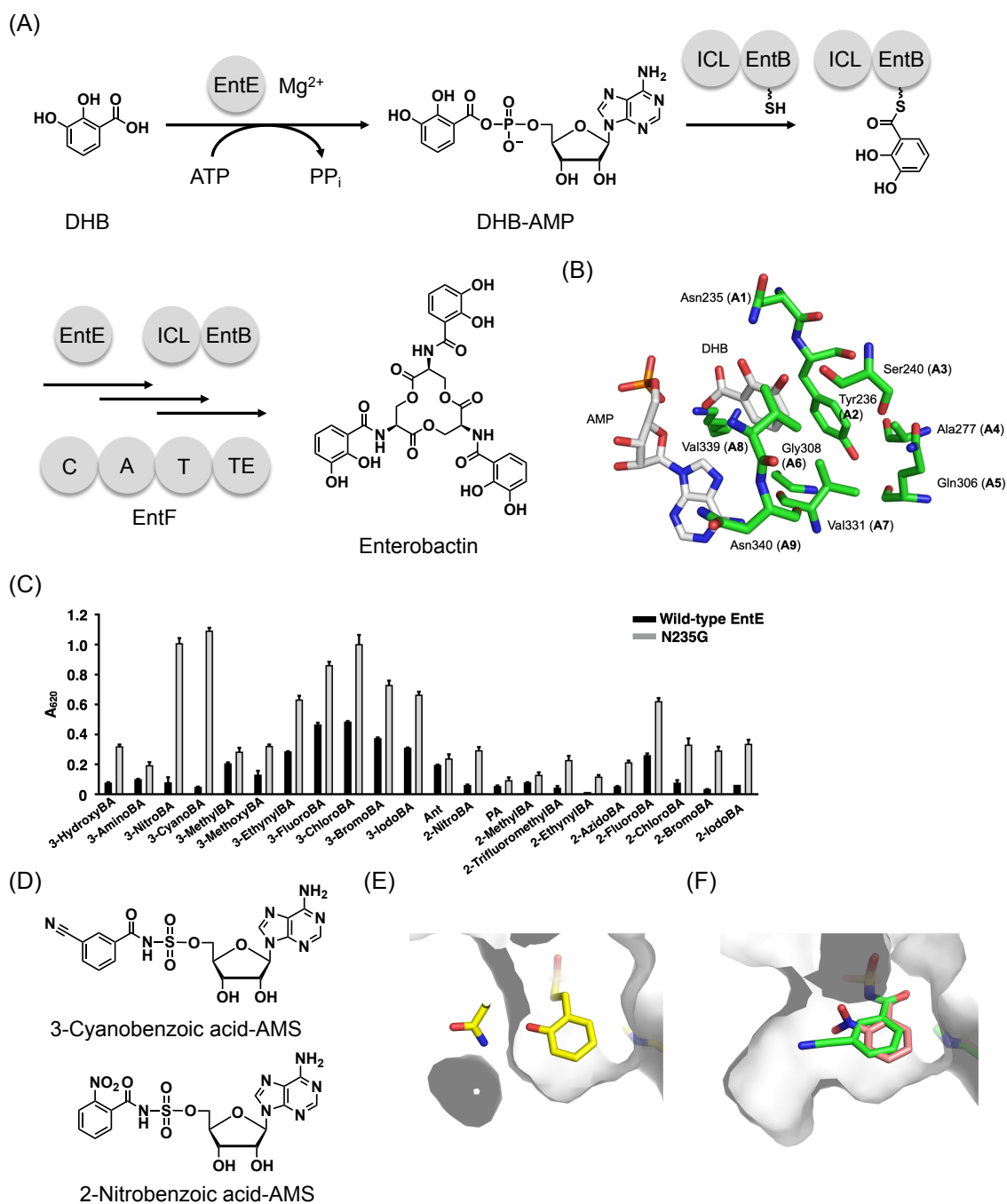


図 2 (A) エンテロバクチン生合成経路 (C: 縮合酵素; TE: チオエステラーゼ; ICL: イソコリスメートリアーゼ), (B) 野生型 EntE 活性部位のモデリング, (C) 基質特異性プロファイル, (D) アデニル化酵素中間体アナログの化学構造, (E) 野生型 EntE の X 線結晶構造解析⁹, (F) EntE Asn235Gly 変異体の X 線結晶構造解析

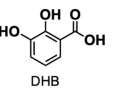
質を認識すると推察されます。EntE のベンゼン環認識部位を維持し、置換基認識部位を拡張できれば、様々な置換基をもつ安息香酸誘導体を基質として許容すると期待しました。そこで、EntE の構造情報に基づき Asn235 をより小さいアミノ酸残基 (Gly, Ala, Ser, Thr) へ置換した変異体を調製しました。続いて、22 種類の安息香酸誘導体を基質とし、酵素活性を測定しました (図 2C)。その結果、EntE Asn235Gly 変異体は 16 種類におよぶ多様な置換様式の安息香酸誘導体を基質として許容することが判明しました。また、野生型 EntE および EntE Asn235Gly 変異体の酵素反応速度論解析を行いました。その結果、EntE Asn235Gly 変異体は、野生型 EntE と比較して、3-ethynylBA (BA: benzoic acid), 3-fluoroBA, 3-chloroBA, 3-bromoBA, 3-iodoBA, 2-fluoroBA, 2-chloroBA に対する基質特異性がそれぞれ 30 倍, 10 倍, 3.8 倍, 14 倍, 72 倍, 8.3 倍, 203 倍上昇しました。さらに、野生型 EntE は 5 種類の安息香酸誘導体 (3-nitroBA, 3-cyanoBA, 2-nitroBA, 2-bromoBA, 2-iodoBA) を基質として許容できないが、EntE Asn235Gly 変異体はこれら基質を許容しました。また、MALDI-TOFMS 解析により EntE Asn235Gly 変異体は、酵素反応速度論解析を行ったすべての安息香酸誘導体を下流のキャリアータンパク質へ受け渡すことが示されました。このことから、様々な置換基をもつ安息香酸誘導体をエンテロパクチン骨格に導入できることが示唆されました。最後に、EntE Asn235Gly 変異体の構造的基盤を明らかにするため、EntE Asn235Gly 変異体と 2 種類のアデニル化反応中間体アナログとの複合体の X 線結晶構造解析を行いました (図 2D, E⁹, F)。その結果、EntE Asn235Gly 変異体の基質結合部位は、ベンゼン環を共通の認識部位とし、嵩高い官能基を許容する非常に大きな空間を有していることを明らかにしました。

4. NRPS Code を利用したアデニル化酵素のエンジニアリング

NRPS 生合成系において、アデニル化酵素が非リボソームペプチドへ導入するアミノ酸を規定しています。そのため、アデニル化酵素のアミノ酸選択性を制御できれば、天然物誘導体を生合成することが可能になります。しかし、長い進化や淘汰の過程において生き残ったアデニル化酵素のエンジニアリングは困難であるのが現状です。実際、EntE Asn235Gly 変

異体は 16 種類におよぶ多様な置換様式の安息香酸誘導体を基質としますが、その酵素活性は野生型 EntE の DHB に対する酵素活性に遠く及びません⁸。アデニル化酵素の構造と機能の体系的な研究により、アミノ酸選択性を決定する活性部位の 10 アミノ酸残基 (NRPS Code) が明らかになりました^{10,11,12}。すなわち、あるアデニル化酵素の NRPS Code を目的のアミノ酸選択性の NRPS Code に丸ごと入れ替えることでアデニル化酵素のアミノ酸選択性を制御できると期待しました¹³。そこで、DHB を基質とするアデニル化酵素 EntE の NRPS Code を Sal を基質とするアデニル化酵素の NRPS Code に入れ替えた 9 種類の変異体 (Tyr236Phe, Ser240Cys, Val339Ile, Val339Leu, Asn340Cys, Tyr236Phe/Ser240Cys, Tyr236Phe/Ser240Cys/Asn340Cys, Tyr236Phe/Ser240Cys/Val339Ile/Asn340Cys, Tyr236Phe/Ser240Cys/Val339Leu/Asn340Cys) を調製しました¹² (図 2B および図 3A)。特に EntE Tyr236Phe/Ser240Cys/Val339Ile/Asn340Cys 変異体および EntE Tyr236Phe/Ser240Cys/Val339Leu/Asn340Cys 変異体は、Sal を基質とするアデニル化酵素の NRPS Code を丸ごと入れ替えた変異体になります。続いて、DHB および Sal を基質とし、酵素反応速度論解析を行いました。その結果、EntE Tyr236Phe/Ser240Cys/Val339Ile/Asn340Cys 変異体 (DHB: $k_{cat}/K_m = 21 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$; Sal: $k_{cat}/K_m = 293 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$) は、野生型 EntE (DHB: $k_{cat}/K_m = 1,311 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$; Sal: $k_{cat}/K_m = 412 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$) と比較して、Sal に対する基質特異性が 45 倍上昇しました (図 3B)。また、EntE Tyr236Phe/Ser240Cys/Val339Ile/Asn340Cys 変異体の Sal に対する酵素活性 (k_{cat}/K_m) は、野生型 EntE と比較して同程度であることがわかりました (図 3B)。一方、マイコパクチンの生合成に関与する Sal を基質とするアデニル化酵素 MbtA の酵素活性 (Sal: $k_{cat}/K_m = 913 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$) と比較可能な酵素活性をもつことが判明しました¹⁴ (図 3B)。このことから、長い進化や淘汰の過程において生き残った NRPS Code を利用することで、効率的にアデニル化酵素をエンジニアリングできることが示唆されました。

(A)

Protein	Substrate	EntE numbering									
		235	236	240	271	306	308	331	339	340	
EntE		N	Y	S	A	Q	G	V	V	N	
DhbE		N	Y	S	A	Q	G	V	V	N	
BasE		N	F	S	S	Q	G	V	V	N	
VibE		N	F	S	A	Q	G	V	V	N	
YbtE		N	F	C	A	Q	G	V	L	C	
MbtA		N	F	C	A	Q	G	V	L	N	
PchD		N	F	C	A	Q	G	V	I	N	

(B)

variant	substrates	k_{cat} [min^{-1}]	k_{cat}/K_m [$\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$]	specificity ^a	specificity switch ^b
wt	DHB	2.6	1311	0.31	1
	Sal	11	412		
Y236F/S240C/V339I/N340C	DHB	8.8	21	14	45
	Sal	7.0	293		
MbtA	Sal	0.28	910	-	-

^a Specificity refers to the relative specificity for the indicated substrate with respect to DHB: $(k_{cat}(\text{Sal})/K_m(\text{Sal})) / (k_{cat}(\text{DHB})/K_m(\text{DHB}))$.

^b The specificity switch shows specificity (Y236F/S240C/V339I/N340C) / specificity(wt) for the indicated substrate.

図 3 (A) DHB および Sal を基質とするアデニル化酵素の NRPS Code, (B) 野生型 EntE および EntE Tyr236Phe/Ser240Cys/Val339Leu/Asn340Cys 変異体の酵素反応速度論解析

5. おわりに

本研究では、非リボソームペプチドの多様性を構築するアデニル化酵素のエンジニアリングに関する検討を紹介しました。立体構造に基づく合理的な部位特異的変異導入によって、基質結合部位を改変し、アデニル化酵素の基質許容能を拡張することに成功しました。天然にはない 16 種類におよぶ多様な置換様式の安息香酸誘導体に酵素活性を示しますが、その酵素活性は天然酵素と比較すると非常に低いという問題点を抱えています。また、NRPS Code を利用することで、アデニル化酵素をエンジニアリングするとともに、天然酵素に匹敵する酵素活性を実現しました。しかし、NRPS Code の利用できない基質（天然にはない基質）に対する効率的な酵素活性を創出することはできないなどの問題点を抱えています。NRPS をエンジニアリングするための汎用性の高い方法を開発することは、難しいのが現状ですが、計算化学をはじめとする多様な技術を融合して NRPS エンジニアリング研究に挑戦していきたいと考えています。そして、思い描いた化合物を創ることを実現していきたいです。

最後になりましたが、本研究を行うにあたり、近畿大学薬学部医療薬学科有機薬化学研究室田邊元三教授、東京工業大学理学院化学系江口正教授、工藤史貴准教授、宮永顕正助教（現東京大学農学生命科学研究科准教授）に多大なご助力を賜りました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

参考文献

- Süssmuth, R. D.; Mainz, A. *Angew Chem Int Ed* 2017, 56, 3770–3821.
- Bozhüyük, K. A. J.; Fleischhacker, F.; Linck, A.; Wesche, F.; Tietze, A.; Niesert, C.-P.; Bode, H. B. *Nat Chem* 2018, 10, 275–281.
- Niquille, D. L.; Hansen, D. A.; Mori, T.; Fercher, D.; Kries, H.; Hilvert, D. *Nat Chem* 2018, 10, 282–287.
- Thong, W. L.; Zhang, Y.; Zhuo, Y.; Robins, K. J.; Fyans, J. K.; Herbert, A. J.; Law, B. J. C.; Mickelfield, J. *Nat Commun* 2021, 12, 6872.
- Walsh, C. T.; O'Brien, R. V.; Khosla, C. *Angew Chem Int Ed* 2013, 52, 7098–7124.
- Zhang, K.; Nelson, K. M.; Bhuripanyo, K.; Grimes, K. D.; Zhao, B.; Aldrich, C. C.; Yin J. *Chem Biol* 2013, 20, 92–10.
- Wang, M.; Zhao, H. *ACS Catal* 2014, 4, 1219–1225.
- Ishikawa, F.; Miyanaga, A.; Kitayama, H.; Nakamura, S.; Nakanishi, I.; Kudo, F.; Eguchi, T.; Tanabe, G. *Angew Chem Int Ed* 2019, 58, 6906–6910.
- Sundlov, J. A.; Shi, C.; Wilson, D. J.; Aldrich, C. C.; Gulick, A. M. *Chem Biol* 2012, 19, 188–198.
- Stachelhus, T.; Mootz, H. D.; Marahiel, M. A. *Chem Biol* 1999, 6, 493–505.
- Challis, G. L.; Ravel, J.; Townsend, C. A. *Chem Biol* 2000, 7, 211–224.
- Kudo, F.; Miyanaga, A.; Eguchi, T. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2019, 46, 515–536.
- Ishikawa, F.; Nohara, M.; Nakamura, S.; Nakanishi, I.; Tanabe, G. *Biochemistry* 2020, 59, 351–363.
- Wilson, D. J.; Aldrich, C. C. *Anal Biochem* 2010, 404, 56–63.

いしかわ ふみひろ
近畿大学 薬学部 有機薬化学研究室
ishikawa@phar.kindai.ac.jp
<https://www.phar.kindai.ac.jp/orgchem/>

ペニシリン結合タンパク質型 チオエステラーゼを用いた環状ペプチドの 効率的な化学 – 酵素合成

はじめに

温和な条件下、位置・化学・立体選択的な反応を効率よく触媒する生体触媒は、様々な官能基が共存するペプチドの修飾に適している。我々は天然物の生合成機構を解明する過程で、ペプチド主鎖を選択的にマクロラクタム化する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)」を発見し、その触媒利用を目指して研究を展開してきた。本稿ではその発見から最新の研究成果までを概説する。



松田 研一



脇本 敏幸

新規なペプチド環化酵素 PBP-type TE ファミリーの 発見と機能解析

ペプチド骨格の環状化によるコンフォメーション制限は、代謝安定性や生体膜透過性、作用標的特異性を向上する重要な構造修飾であるが、競合する分子間反応を抑制しつつ効率良く分子内で結合を形成することは困難である。一方で、天然に豊富に存在する多様な環状ペプチドの生合成過程では、ペプチド環化酵素が位置選択的な環化反応を効率良く触媒する。これまで様々なタイプのペプチド環化酵素がバクテリアや植物から発見されてきたが、研究試薬として実用化されたものはいずれも長鎖ペプチドに限定的であり、10 残基以下の短鎖ペプチドは環化できない。長鎖と比べて高い組織移行性が期待できる短鎖ペプチドを簡便かつ

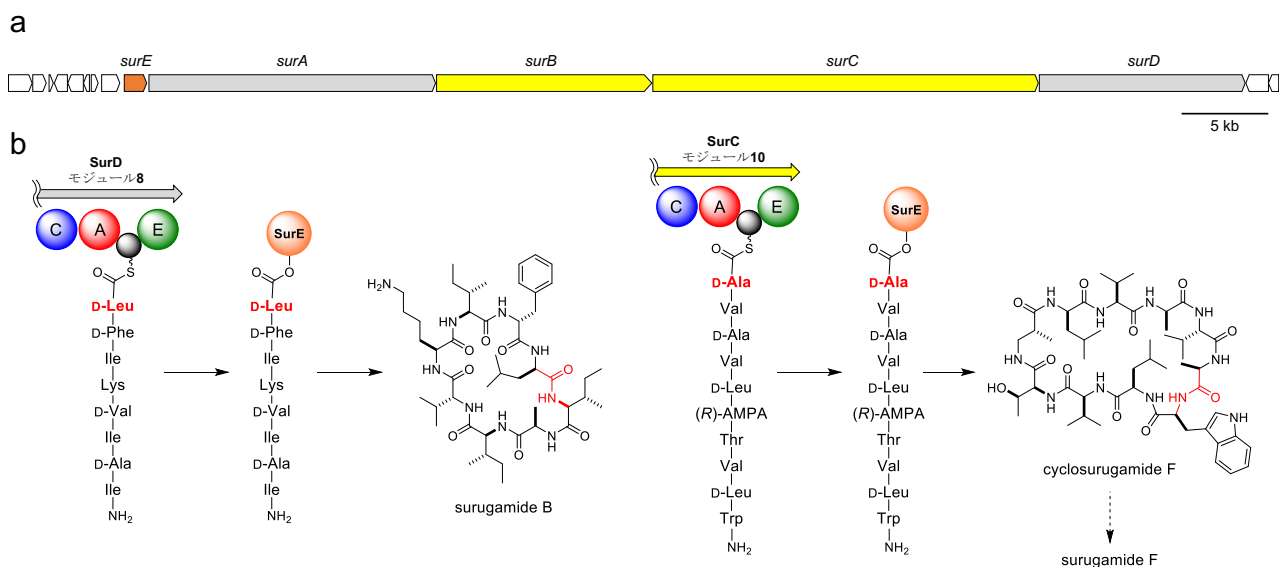


図1 PBP-type TE を介する非リボソーム環状ペプチド *surugamide* 類の生合成。a) *Surugamide* 類の生合成遺伝子クラスター、b) *SurE* が触媒するペプチド環化反応。NRPS の最終モジュールに担持された直鎖中間体が *SurE* の触媒セリン残基に転移した後、N 末端アミンからの攻撃により環状骨格が形成される。*SurE* は 2 つの異なる NRPS, *SurD*, *SurC* に作用し、それぞれ環状オクタペプチドと環状デカペプチドを与える。

正確に合成する方法論の確立は、ペプチド創薬や周辺領域に新たな展開をもたらす可能性を秘めている。

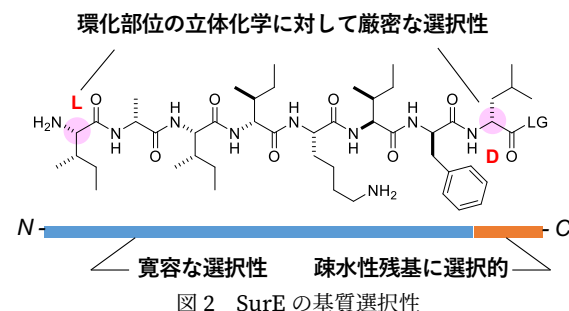
一方で我々は、非リボソーム型環状ペプチドの生合成に興味を抱き研究を行ってきた。*Surugamide* 類は海洋放線菌から単離された head-to-tail 型の環状ペプチドであり、カテプシン B の阻害活性を示す。本化合物はいくつかの D-アミノ酸残基を含む典型的な非リボソーム型環状ペプチドであり、その化学構造を一見しても生合成過程の新規性は見当たらない。ところがその生合成遺伝子クラスター (図 1a) を精査すると、環状骨格の形成を担うはずの一般的なチオエステルゼドメイン (TE) が存在しないことが判明した¹。このため通常とは異なる機構によってその環状骨格が形成される可能性を考え検証を進めた結果、その環状骨格は新規なペプチド環化酵素 *SurE* によって形成されることが明らかになった² (図 1b)。長大なペプチド合成酵素に融合して存在する一般的な TE ドメインとは異なり、*SurE* は 350 残基程度の独立したタンパク質であった。また *SurE* は、従来のペプチド環化酵素類とは配列相同性を示さない一方で、バクテリアのペプチドグリカン生合成においてペプチド架橋反応を担う PBP に相同性を示した。このことから我々は、これを新たなペプチド環化酵素ファミリーとして PBP-type TE と命名した^{2,3}。*Surugamide* 類はアミノ酸配列や鎖長の異なる 2 種類の非リボソームペプチドから構成されるが、*SurE* はその両方の生合成に等しく関与し環化を触媒する⁴ (図 1b)。このことから *SurE* は非常に寛容な選択性を備えていると考えられた。

複数の基質アナログを合成し、その選択性を検証したところ、*SurE* は基質の内部配列や鎖長に対して非常に寛容な選択性を示した。特に既存の生体触媒では環化できない 10 残基以下のペプチドを効率よく環化した。また配列内部を 5~23 アミノ酸残基相当のサイズの PEG 鎖で置き換えた基質に対しても、加水分

解反応や多量体化を伴わずに効率よく環化反応を触媒した。一方で環化点となる残基に対しては選択性を示し、N 末端に L-アミノ酸、C 末端に疎水的な D-アミノ酸を厳密に要求することが判明した (図 2)。C 末端 D-アミノ酸残基に対する厳密な選択性は、本酵素ファミリーが D-Ala-D-Ala ジペプチドモチーフを認識する PBP と近縁であることと一致している。興味深いことに、従来型の TE ドメインが触媒する head-to-tail 環化における N 末端残基は必ず D-アミノ酸、C 末端残基は L-アミノ酸であり、PBP-type TE とは相補的な関係にある。その生物学的な意義は現在のところ不明であるが、PBP-type TE は、D-アミノ酸を C 末端残基としてペプチドを環化するために、従来型の環化酵素とは独立して進化したユニークな酵素ファミリーといえる⁵。

PBP-type TE を利用した環状ペプチドの効率的な化学 - 酵素合成

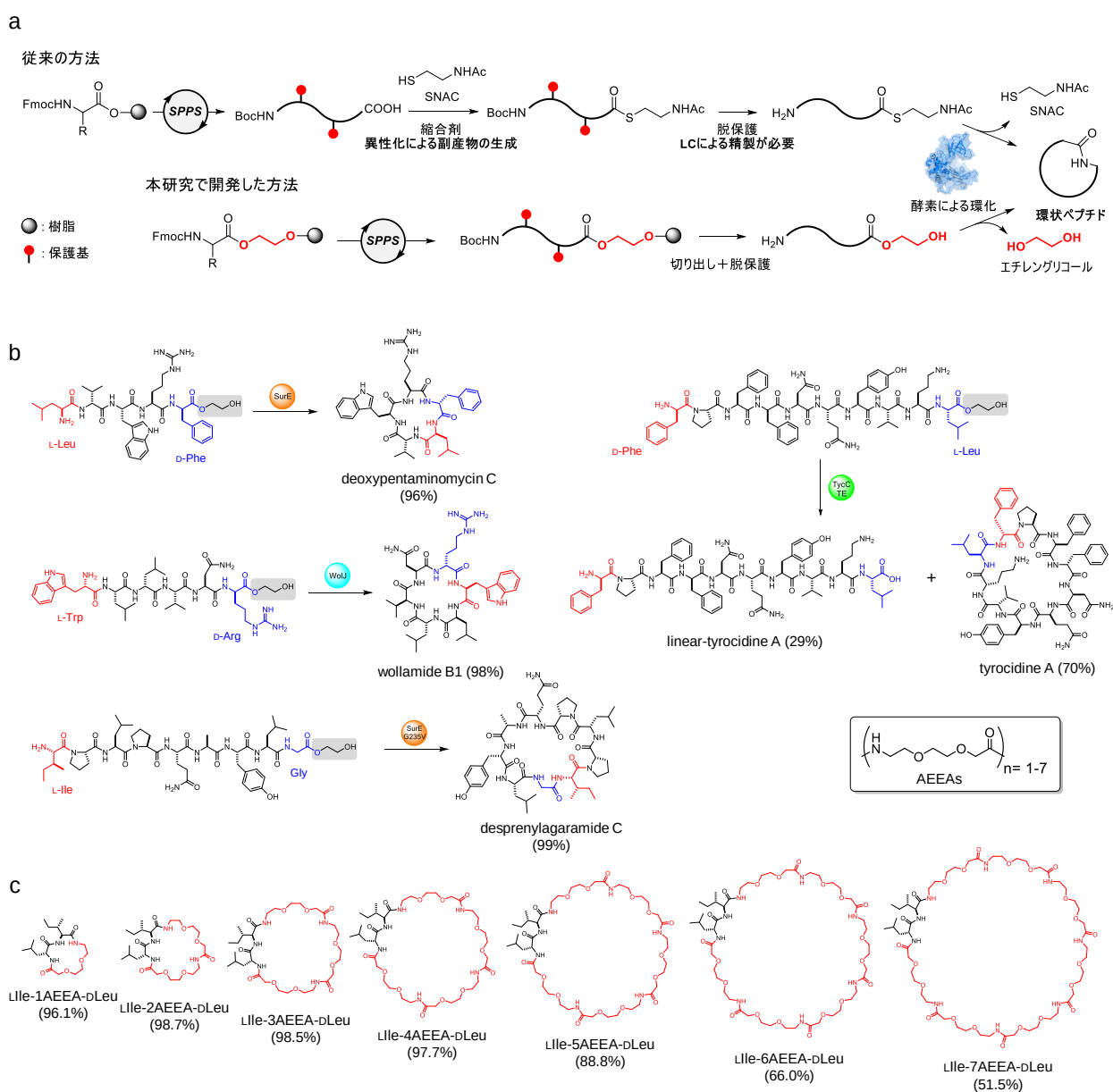
非リボソームペプチド環化酵素の生体内における本来の基質は、巨大な非リボソームペプチド合成酵素にホスホパンテテインを介して担持されたチオエステルである。2000 年にハーバード大学の C. Walsh らは、ホスホパンテテインを N-アセチルシステアミン (SNAC) で簡略化した疑似基質を用いて、TE ドメイ



ンの触媒する環化反応を試験管内で再現することに成功した⁶。それ以来、SNAC 基質は環化酵素の機能解析に広く用いられてきたが、縮合剤によってペプチド C 末端にチオエステルを導入する一般的な合成法は低収率であり、副生成物の除去にも多大な労力がかかる。このため、多様な基質配列の並列的な合成や、大量合成は現実的ではなかった (図 3a 上段)。このことが非リボソームペプチド環化酵素の触媒利用における大きな課題の一つであった。一方で、PBP-type TE は脱離基に対しても一定の許容性を有し、チオエステルに加えてエステル基質も受け入れる。我々はこの性質に着目し、簡便で高収率なエステル基質合成法を考案した (図 3a 下段)。具体的には、安価なエチレングリコールを脱離基に採用し、これをあらかじめ担持し

た樹脂上でペプチド固相合成を行うことで、これまでボトルネックだった脱離基を付加する合成ステップを回避した。これにより従来では 30% 程度だった合成収率を 80% 以上に改善した。基質ペプチドは樹脂から切り出した段階で純度が高く、HPLC での精製工程を経ずに酵素反応に直接供することができる。本法により surugamide B の環化前駆体を調製し、SurE と混合したところ、基質は定量的に環化された。これにより基質合成と酵素による環化反応を連続して実施できる効率的な化学 - 酵素合成法が確立できた⁷。

本法で合成できる環状ペプチドの多様性は、環化酵素の基質選択性によって制限される。特に SurE は基質 C 末端に疎水性 D-アミノ酸を要求するため、その適用範囲は限定的である。一方で、GenBank 等の公



共のデータベースには、SurE と大きく異なる選択性を有すると考えられるホモログ酵素遺伝子が 600 以上登録されている。このうち、抗菌性環状ヘキサペプチド wollamide/desotamide の生合成遺伝子クラスター中にコードされる WolJ について、その酵素活性を検証したところ、その基質選択性は SurE と相補的であり、SurE が効率よく環化できない C 末端に親水性 D-アミノ酸やグリシンをもつペプチドを効率よく環化した。また、たった一残基の変異により SurE の基質選択性を大きく転換することも可能であった。SurE の X 線結晶構造解析⁵によって基質 C 末端 D-アミノ酸を認識することが示唆されていた触媒残基付近のポケットに変異を導入したところ、野生型が全く環化できない C 末端がグリシンのペプチドを定量的に環化できる改変酵素が得られた。これら野生型酵素や改変酵素を、前述の方法によって合成した基質ペプチドに対して作用させたところ、複数種類の環状ペプチドがいずれも 96%以上の非常に高い環化反応収率で得られた⁷ (図 3b)。また、エチレングリコールを付与したペプチドは従来型の TE によっても環化可能であり、tyrocidine 生合成に関わる TycC-TE を用いると 70%の反応収率で環化体 (tyrocidine A) が得られた⁷ (図 3b)。

おわりに

本稿では、ペプチド環化酵素 PBP-type TE ファミリーの発見からその触媒利用にむけた最近の取り組みまでを概説した。その基質選択性の寛容さには目を見張るものがあり、環化反応のための生体触媒として開発するには有望な酵素ファミリーといえる。特に、内部に様々な鎖長の PEG を許容した点は興味深く、非ペプチド性のオリゴマーを含む環状中分子の合成に広く適用できる可能性がある (図 3c)。今後、様々な基質選択性を有する野生型酵素や変異酵素を集積することで、確立した化学-酵素合成法の適用範囲をさらに拡張できると考えている。

参考文献

1. Ninomiya, A.; Katsuyama, Y.; Kuranaga, T.; Miyazaki, M.; Nogi, Y.; Okada, S.; Wakimoto, T.; Ohnishi, Y.; Matsunaga, S.; Takada, K. *ChemBioChem* 2016, 17, 1709–1712.
2. Kuranaga, T.; Matsuda, K.; Sano, A.; Kobayashi, M.; Ninomiya, A.; Takada, K.; Matsunaga, S.; Wakimoto, T. *Angew Chem Int Ed* 2018, 57, 9447–9451.
3. Matsuda, K.; Kuranaga, T.; Wakimoto, T. *J Synth Org Chem Jpn* 2019, 77, 1106–1115.
4. Matsuda, K.; Kobayashi, M.; Kuranaga, T.; Takada, K.; Ikeda, H.; Matsunaga, S.; Wakimoto, T. *Org Biomol Chem* 2019, 17, 1058–1061.
5. Matsuda, K.; Zhai, R.; Mori, T.; Kobayashi, M.; Sano, A.; Abe, I.; Wakimoto, T. *Nat Catal* 2020, 3, 507–515.

6. Trauger, J. W.; Kohli, R. M.; Mootz, H. D.; Marahiel, M. A.; Walsh, C. T. *Nature* 2000, 407, 215–218.
7. Kobayashi, M.; Fujita, K.; Matsuda, K.; Wakimoto, T. *J Am Chem Soc* 2023, 145, 3270–3275.

まつだ けんいち
北海道大学 大学院薬学研究院
天然物化学研究室
kematsuda@pharm.hokudai.ac.jp
<https://www.pharm.hokudai.ac.jp/tennen/>

wakimoto としゆき
北海道大学 大学院薬学研究院
天然物化学研究室
wakimoto@pharm.hokudai.ac.jp
<https://www.pharm.hokudai.ac.jp/tennen/>

非タンパク質性アミノ酸の生合成に関わる新規酵素

1. はじめに

天然からは様々な生理活性ペプチドが単離されていますが、ペプチド天然物はその生合成機構によって大きくリボソーム翻訳系翻訳後修飾ペプチド (ribosomally synthesized and posttranslationally modified peptide: RiPP) と非リボソームペプチド (nonribosomal peptide: NRP) に分けられます。いずれの場合も非タンパク質性アミノ酸を含むことが多く、それらが生理活性の発現や構造多様性の拡大に寄与しています。前者ではリボソームで生合成されるペプチドがペプチド修飾酵素によって翻訳後修飾を受けることで非タンパク質性アミノ酸が導入されます。これに対して後者では、非リボソームペプチド合成酵素 (nonribosomal peptide synthetase: NRPS) と呼ばれる複数ドメインからなる巨大酵素複合体により逐次的にペプチド鎖が合成されますが、伸長単位となるアミノ酸はタンパク質性のものに限らず様々な非タンパク質性アミノ酸も用いることができます。近年の創薬モダリティとして分子量 500~2,000 程度の中分子ペプチドが注目されていますが、ペプチド天然物の生合成における非タンパク質アミノ酸の新規導入酵素の解明は、学術的に興味深いだけでなく、生合成工学的手法を用いた新規生理活性物質の創製にも重要です。本項では、RiPP 生合成に関わるペプチド修飾酵素と NRP 生合



小笠原 泰志



大利 徹

成に関わる非タンパク質性アミノ酸の生合成酵素について、最近当研究室で見出したものを一つずつ紹介します。

2. NRPP 天然物のシクロプロパン含有アミノ酸生合成に関わる新規酵素

生理活性天然物の中には炭素三員環であるシクロプロピル構造がしばしば見られますが、シクロプロピル構造は剛性と環ひずみが大きく、生理活性発現に重要な役割を果たします。ホルマオマイシン^{1,2} (1) とベラクトシン³ (2) は、いずれも 3-シクロプロピルアラニンを含むペプチド天然物で、前者はストレプトミセス属放線菌の *Streptomyces griseoflavus* W-384 から単離されたコリネ細菌に対する狭域抗生物質であり、後者は *Streptomyces* sp. KY11780 から単離されたプロテアソーム阻害剤です。生合成について、ホルマオマイシン (*hrm*) とベラクトシン (*bel*) の生合成遺伝子クラスターは既に取得されており (図 1)、また、安定同位体を用いた標識実験で L-リジン (3) が 3-(2-ニトロシクロプロピル)-アラニン (4) に変換されてから NRPS に取り込まれることが示されていました⁴⁻⁷。しかし、4 の生合成に関する報告はなかったため解析を行いました。

3-シクロプロピルアラニン構造がホルマオマイシンとベラクトシンに共通であることから、遺伝子クラスターの比較を行ったところ、両クラスターで隣接する 2 つの機能未知遺伝子 (*hrmI/belK* および *hrmJ/belL*) が保存されていました。*HrmI/BelK* は二鉄酸化酵素 (HDO) と、*HrmJ/BelL* は鉄/ α -ケトグルタル酸 (α -KG) 依存酸化酵素と相同性を示し、これらが 3 から 4 への変換に関わることが予想されました。そこで、3 を基質に *hrmI*, *belK*, *hrmJ*, *belL* をそれぞれ発現した大腸菌の静止菌体を用いて *in vivo* 反応をおこなった結果、*hrmI* と *belK* の発現株で 3 の末端アミノ基の酸化で得られる L-ニトロノルロイシン (5) の生産が確認できました。また、組換え酵素を用いた *in vitro* 解析で *HrmI* と *BelK* が酸素分子を酸化剤に 3 から 5 への 6 電子酸化反応を触媒することが示されました。続いて、5 を基質に鉄/ α -KG 依存酸化酵素である *HrmJ* と *BelL* について *in vitro* で解析し

た結果、いずれの酵素も 5 の 4 位と 6 位の間の炭素-炭素結合形成が起こり 4 を与えました。一方、3 を基質とした場合には反応が進行せず、シクロプロパン化反応にニトロ基が重要であることも分かりました。これは鉄/ α -KG 酸化酵素によるシクロプロパン生成の最初の例です。なお、興味深いことにホルマオマイシンとベラクトシンでは構造中に含まれる 3-シクロプロピルアラニンの立体化学が異なります (図 2)。両異性体は LC-MS での分離が困難でしたが、¹³C で同位体標識した 5 と *HrmJ* と *BelL* の反応産物を NMR で分析した結果、*HrmJ* と *BelL* 生成物が互いに立体異性体であることが分かり、最終産物のシクロプロパン環の立体化学は環化段階で決定されることが分かりました。*HrmJ* と *BelL* の活性部位の差異により 4 の 2 種類の立体異性体が生成すると考えられます。今回 2 種類の酸化酵素による新規シクロプロパン形成機構を見出しました。3-シクロプロピルアラニン構造を持つ天然物はこれまでホルマオマイシンとベラクトシンのみが知られていましたが、ゲノムデータベースには *hrmI/belK* と *hrmJ/belL* の相同遺伝子を共に含むクラスターが多数見出されたことから、未発見の新規シクロプロパン含有天然物の探索につながるものが期待されます。

3. RiPP 天然物 MS-271 の生合成に関わる新規ペプチド C 末エピメラーゼ

MS-271 (6) は、ストレプトミセス属放線菌の *Streptomyces* sp. M-271 から単離された 21 アミノ酸残基からなるラッソペプチド天然物です (図 3)。ラッソペプチドは特異な投げ縄構造を持つ天然物の一群で、N 末側の 8~10 アミノ酸残基で構成されるマクロラクタム環に C 末側のペプチド鎖が貫通した特殊な立体構造をしています。ラッソペプチドは一般にリボソームで生合成されることが知られていますが、MS-271 は C 末端に D-Trp 残基を有することから D-Trp 残基の導入機構に興味を持ち生合成解析を行いました。はじめに、生産菌のドラフトゲノム解析で生合成遺伝子クラスターを同定した結果、MS-271 の C 末端の Trp を含んだ全長 42 アミノ酸からなる前駆体

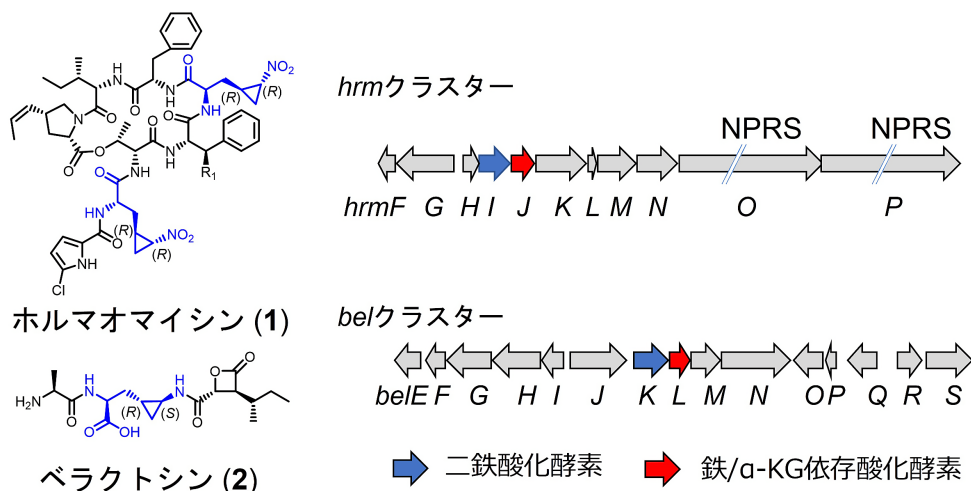


図1 ホルマオマイシンとベラクトシンの構造と生合成遺伝子クラスター

ペプチドの遺伝子 (*mshA*) が見いだされたことから、D-Trp が翻訳後のエピメリ化で導入されることが分かりました。また、*mshA* の周辺には投げ縄構造の構築に関わる遺伝子 (*mshC*, *mshB1*, *mshB2*) やジスルフィド形成酵素遺伝子 (*mshE*, *mshF*) に加えて機能未知遺伝子 (*mshH*) が見出されました。本クラスターには既知のラセマーゼやエピメラーゼと相同性を有する遺伝子はありませんでしたが、近縁の *Streptomyces lividans* を宿主に用いた *msh* クラスターの異種発現実験で MS-271 が生産されたことから、クラスター中の唯一の機能未知酵素である MshH が Trp のエピメリ化に関与すると推定し、解析を進めました。

生合成におけるエピメリ化がどの段階で起こるかが不明であったため、初めに前駆体ペプチド遺伝子 (*mshA*) を *mshH* や投げ縄構造構築に関わる *mshB1*, *mshB2*, *mshC* と大腸菌で共発現し、MshA に D-Trp が導入されるか *in vivo* で検証しました。各共発現株から精製した MshA を塩酸で加水分解後にキラル誘導体化して LC-MS で分析したところ、*mshA* を *mshH* と共発現した場合に D-Trp が検出されたことから、MshH

が新規エピメラーゼであり、リボソームで生合成された直後の MshA (7) を基質として epi-MshA (8) を生成することが分かりました (図 4)。また、前駆体ペプチド認識因子 (*mshB1*) を追加で共発現した場合には 8 の生成量が増えたことから、MshH は前駆体ペプチド認識因子を利用するペプチド修飾酵素であることが示唆されました。さらに、MshA, MshH, MshB1 の組換えタンパク質を用いた *in vitro* 実験でも、MshH によるエピメリ化と、MshB1 による反応促進が確認できました。また、リーダーペプチドが基質認識に必須であることと有機補欠分子を必要としないことも示されました。MshH は、補欠分子非依存的にペプチド C 末端アミノ酸残基のエピメリ化を行う初の酵素です¹²。これまでペプチドエピメラーゼとして、ラジカル反応でエピメリ化を触媒する PoyD¹³ や、当研究室で植物病原菌 *Xanthomonas* 属細菌の新規ペプチドグリカン生合成に見出した ATP 依存ペプチドエピメラーゼ MurL¹⁴ など少数しか報告されておりませんが、MshH はこれらとは全く異なる新規酵素として重要であり、現在エピメリ化の詳細な分子機構の解明を進め

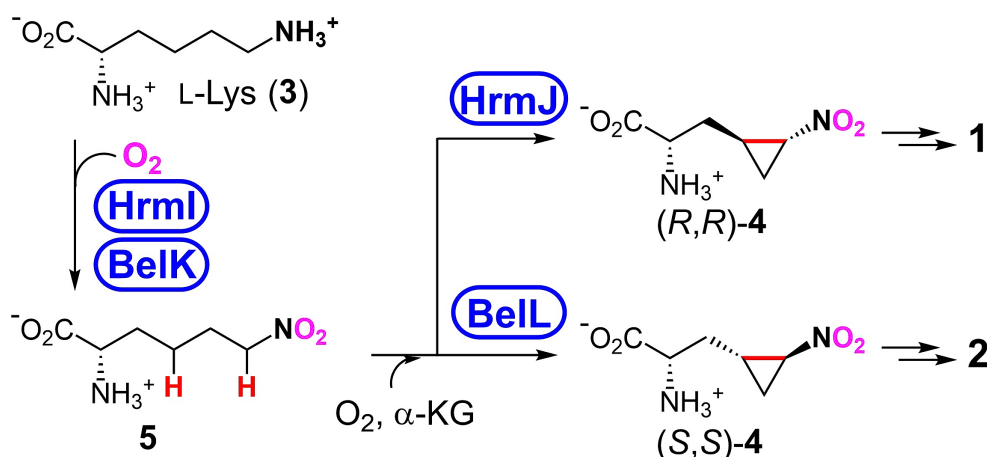


図2 ホルマオマイシンとベラクトシン生合成におけるシクロプロパン環形成機構

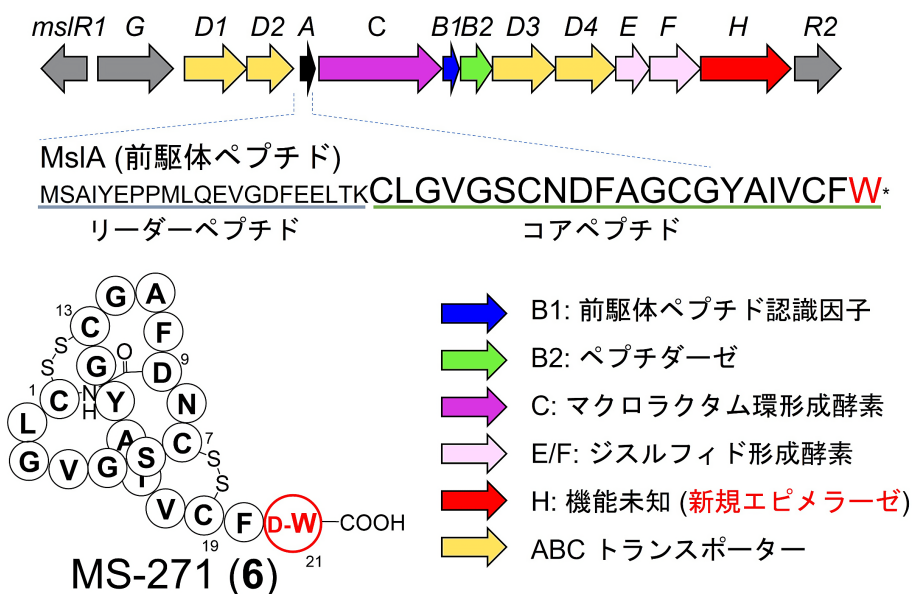


図3 MS-271 の構造と生合成遺伝子クラスター

ています。

4. おわりに

ペプチド天然物は構造の多様性が大きく、その生成には多くの新規酵素が関与していると考えられます。本項では、NRP と RiPP 天然物中の生合成に関わる新規非タンパク質性アミノ酸導入酵素に関する、当研究室で得られた最近の成果について紹介しました。これらの発見は、今後の生合成工学を利用した非タンパク質性アミノ酸含有ペプチド天然物創製への利用が期待できます。

最後になりますが、ペプチドニュースレターへの寄稿の機会を与えて頂きました東京大学の後藤佑樹先生に厚く御礼申し上げます。また本研究は、科研費 JP16H06452, JP18H03937, JP22H04976 (大利) および JP22H05130, JP23H02145 (小笠原) の支援により遂行されました。この場をお借りして感謝申し上げます。

参考文献

1. Rössner, E.; Zeeck, A.; König, W. A. *Angew Chem Int Ed* 1990, 29, 64–65.
2. Zlatopolskiy, B. D.; Loscha, K.; Alvermann, P.; Kozhushkov, S. I.; Nikolaev, S. V.; Zeeck, A.; Meijere, A. *Chem Eur J* 2004, 10, 4708–4717.
3. Asai, A.; Hasegawa, A.; Ochiai, K.; Yamashita, Y.; Mizukami, T.; *J Antibiot* 2000, 53, 81–83.
4. Höfer, I.; Crusemann, M.; Radzom, M.; Geers, B.; Flachshaar, D.; Cai, X.; Zeeck, A.; Piel, J. *Chem Biol* 2011, 18, 381–391.
5. Wolf, F.; Bauer, J. S.; Bendel, T. M.; Kulik, A.; Kalinowski, J.; Gross, H.; Kaysser, L. *Angew Chem Int Ed* 2017, 56, 6665–6668.
6. Brandl, M.; Kozhushkov, S. I.; Zlatopolskiy, B. D.; Alvermann, P.; Geers, B.; Zeeck, A.; Meijere, A. *Eur J Org Chem* 2005, 123–135.
7. Kozhushkov, S. I.; Zlatopolskiy, B. D.; Brandl, M.; Alvermann, P.; Radzom, M.; Geers, B.; Meijere, A.; Zeeck, A. *Eur J Org Chem* 2005,

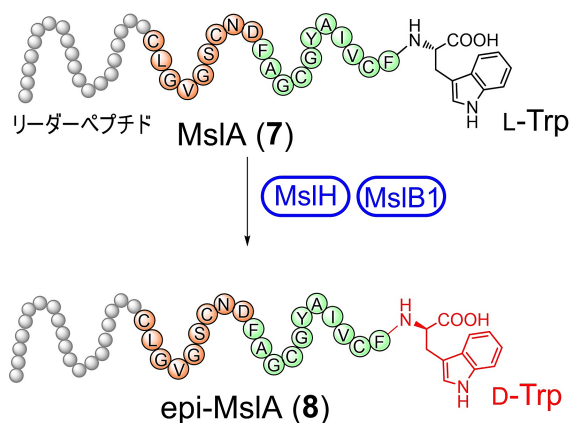


図4 MslH によるエピメリ化反応

- 854–863.
8. Li, X.; Shimaya, R.; Dai, T.; Chang, W.-C.; Ogasawara, Y. *Angew Chem Int Ed* 2022, 61, e202113189.
9. Yano, K.; Toki, S.; Nakanishi, S.; Ochiai, K.; Ando, K.; Yoshida, M.; Matsuda, Y.; Yamasaki, M. *Bioorg Med Chem* 1996, 4, 115–120.
10. Katahira, R.; Yamasaki, M.; Matsuda, Y.; Yoshida, M. *Bioorg Med Chem* 1996, 4, 121–129.
11. Feng, Z.; Ogasawara, Y.; Nomura, S.; Dai, T. *Chembiochem* 2018, 19, 2045–2048.
12. Feng, Z.; Ogasawara, Y.; Dai, T. *Chem Sci* 2021, 12, 2567–2574.
13. Freeman, M. F.; Gurgui, C.; Helf, M. J.; Morinaka, B. I.; Uri, A. R.; Oldham, N. J.; Sahl, H. G.; Matsunaga, S.; Piel, J. *Science* 2012, 338, 387–390.
14. Feng, R.; Satoh, Y.; Ogasawara, Y.; Yoshimura, T.; Dai, T. *J Am Chem Soc* 2017, 139, 4243–4245.

（おがさわら やすし
北海道大学 大学院工学研究院
https://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/tre/ABCLab_jp/）
（だいいり とおる
北海道大学 大学院工学研究院
https://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/tre/ABCLab_jp/）

未利用資源から有用資源を創出する！ 放線菌が生産する二次代謝産物の生合成研究

1. はじめに

この度、PNJ への執筆の機会をくださいました後藤佑樹先生（東京大学）に感謝申し上げます。当研究室では長年、放線菌が生産する二次代謝産物の生合成研究を行ってきました。放線菌は実に多種多様な生理活性物質を生産しており、これまでに数万種類にも及ぶ化合物が発見されています。しかし、その中で実際に医薬品や農薬として実用に至っているものはほんのわずかであり、多くは様々な問題から未利用のままになっています。そこで我々は、このような未利用化合物の生合成経路を明らかにし、その仕組みを使って有用な化合物へと導くことができれば、創薬スピードを加速させることが可能であると考えていま



濱野 吉十



丸山 千登勢

す。その一例として、我々は、未利用化合物の一つである抗生物質ストレプトスリシン (ST) をモデル化合物として研究を行ってきました。本ニュースレターでは、これまでに明らかにした ST および ST 類縁化合物の生合成に関わるペプチド合成酵素を解説し、生合成酵素群を応用利用した新規化合物の創製と実用化についてご紹介いたします。

2. 様々な放線菌が創り出す ST および ST 類縁化合物の化学構造

放線菌が生産する抗生物質 ST (図 1) は、1943 年にワックスマン博士によって *Streptomyces lavendulae* の培養液から初めて単離され¹、以来、数多くの放線菌から見つかっている抗生物質です。ST は、真核・原核生物の両者に対して強力な抗菌活性を示すにも関わらず、マウスなど動物への毒性が強く医薬品や農薬として利用されていません²⁻¹³。微生物由来の天然生理活性物質を探索する多くの研究者にとっては「よく出くわす」化合物ではありますが、ST が持つ強力な抗菌活性を有効活用するために、有機化学的な手法による毒性緩和への努力が 1980 年代ごろまで試みられ、多くの類縁化合物が創製されてきましたが、実際に医薬品として利用された報告はありません。ST 及び ST 類縁化合物は共通して、streptothrisamine 骨格 (図 1) を有しますが、この骨格だけでは各種微生物に対する抗菌活性も細胞毒性も示しません。しかしアミノ酸側鎖として、1~7 残基の β -lysine (β -Lys) または β -Lys oligopeptide [oligo(β -Lys)]¹、あるいは glycine 誘導体¹⁴⁻¹⁹が結合した多くの類縁化合物は強力な抗菌活性と細胞毒性を示します (図 1)。また、この oligo(β -Lys) 側鎖の長さが長くなればなるほど抗菌活性が強くなることから、ST 類縁化合物の生理活性には、アミノ酸側鎖構造が重要であることがわかっています。さらに、前述したように、これまでに数多くの ST 類縁化合物が微生物から発見されていますが、興味深いことに、アミノ酸側鎖構造としては、 β -Lys タイプと glycine タイプの 2 種類しか発見されていません。したがって、このアミノ酸側鎖部分にこれら以外のアミノ酸を結合させることができれば、新しいタ

イプの ST 類縁化合物を創製することができ、真核生物への毒性がなくなった化合物が創出できると考えました。そこで我々は、この生理活性に重要なアミノ酸側鎖構造の生合成機構に着目し、その仕組みを解明するとともに、その応用利用によって新規 ST 類縁化合物の創製を目指しました。

3. ST が有する oligo(β -Lys) 側鎖および glycine 誘導体側鎖の生合成研究

放線菌 *Streptomyces rochei* NBRC12908 は、1~4 残基の β -Lys をアミノ酸側鎖に有する ST を生産します。そこでまず、*S. rochei* のゲノムライブラリーより、ST 生合成遺伝子群を同定し、各遺伝子の機能推定を行ったところ、本遺伝子群には非リボゾームペプチド合成酵素 (NRPS) 遺伝子を含む遺伝子群が見出され、ST の生合成の一部は、NRPS が関与していると推測されました。次に、各遺伝子の破壊実験による生合成中間体の同定と、各種生合成酵素の組換え酵素を用いた生化学的な解析から、我々は oligo(β -Lys) が新規反応メカニズムを有する NRPS によって生合成されることを明らかにしました²⁰ (図 2A)。単独型の adenylation (A)-domain である Orf5 と Orf19 は、両者とも β -Lys をアデニル化によって活性化しますが、Orf5 によって活性化された β -Lys だけが Orf18 の thiolation (T)-domain にローディングされることがわかりました。興味深いことに、Orf19 によって活性化された β -Lys は、Orf18 の T-domain に結合した状態で進行する oligo(β -Lys) 合成の伸長基質として直接使われ、そのペプチド合成反応は Orf19 が直接触媒する極めて興味深いメカニズムでした。これまでに様々な NRPS の A-domain が報告されていますが、基質の活性化だけでなく、それを直接基質として利用し、さらにペプチド結合形成反応を繰り返して触媒できる A-domain は初めての例でした。T-domain 上で伸長した oligo(β -Lys) は、Orf18 の condensation (C)-domain の触媒により ST 生合成中間体 streptothrisamine と縮合し、ST として Orf18 からリリースされます (図 2A)。

次に我々は、BD-12^{14,15} (図 1) が有する glycine 誘導体側鎖の生合成機構を解明するために、ST の生合成研究で見出した streptothrisamine 骨格の生合成遺伝子群を指標に、BD-12 生産菌 *S. luteocolor* NBRC13826 から約 30 kbp からなる BD-12 生合成遺伝子群を同定しました。我々は、BD-12 における glycine 側鎖も ST の β -Lys 側鎖と同様に NRPS によって生合成されると予想し、BD-12 生合成遺伝子群から Orf5, Orf18, Orf19 のホモログ酵素遺伝子を探しました。しかし予想に反し、そのようなホモログ酵素遺伝子は存在しませんでした。そこで、各遺伝子産物の構造予測を基にアミド合成に関わる酵素遺伝子を探した結果、Orf11 が FemXA family に相同性を示すことが判明しました。FemXA は、微生物のペプチドグリカン生合成過程におけるペプチド架橋反応を触媒する tRNA 依存型ペプチド合成酵素として知られていたことから、BD-12 の glycine 側鎖は、NRPS ではなく、tRNA 依存的な機構で生合成される可能性が示唆されました。そこで我々は、Orf11 の機能解析を

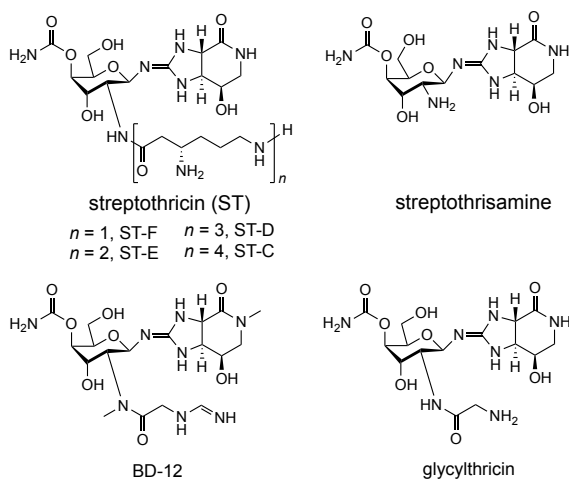


図 1 streptothricin (ST) および ST 類縁化合物の化学構造

行うために、Orf11 組換え酵素を用いた *in vitro* 反応を試みました。Orf11 の基質となる aminoacyl-tRNA の供給には、大腸菌由来 *in vitro* タンパク質合成システムを利用し、streptothricamine と glycine を基質に酵素反応を行ったところ、BD-12 生合成中間体 glycylothricin (図 1) の生成が確認されました²¹ (図 2B)。さらに Orf11 の基質特性を調べるために、タンパク性アミノ酸 20 種類を基質として用いて同様の酵素反応を行ったところ、興味深いことに、わずかに alanine を基質認識し、alanine 側鎖を有する新規 ST 類縁化合物 alanylthricin を与えました。

また本研究を通して、ST 類縁化合物を生産する放線菌は、非タンパク性アミノ酸 (β -Lys) を構成成分とする場合には NRPS を、タンパク性アミノ酸 (glycine) を利用する場合は、tRNA 依存型ペプチド合成酵素を使い分ける微生物の巧みな生合成戦略を明らかにしました。

4. ST が有する oligo(β -Lys) 側鎖の役割とは？ oligo(β -Lys) の応用利用に関する研究

前述の通り、ST は oligo(β -Lys) 側鎖が長くなるほど、抗菌活性や細胞毒性が強くなることが知られています。一般的にカチオン性ペプチド化合物は高い細胞膜透過性を有することが知られており、ST においても、oligo(β -Lys) 側鎖が長くなることによって生じる高いカチオン性が、ST の動物細胞への取込み活性の向上に寄与していると考えられました。すなわち、種々の化合物を oligo(β -Lys) で化学修飾することで、動物細胞内に送達させることができると考えました。そこでまず、oligo(β -Lys) で化学修飾する基盤技術の構築に取り組みました。

3. で示した通り、ST の oligo(β -Lys) 生合成に関わる 3 つの NRPS による酵素反応において、Orf19 はフ

リーの β -Lys (伸長基質) と Orf18 に結合した β -Lys (アクセプター基質) を基質としてペプチド合成 (オリゴマー化) を触媒します (図 2A)。そこで、アクセプター基質の構造アナログとして、 β -Lys-PEG₃-azide を用いて酵素反応を行ったところ、興味深いことに、 β -Lys のオリゴマー合成活性を検出しました (図 3A)。さらに、酵素反応の至適条件を確立することで、アジド基を有する oligo(β -Lys)_n-PEG₃-azide を著量合成することができました (図 3A)。そこで、oligo(β -Lys)_n-PEG₃-azide のアジド基を利用した Click Chemistry で蛍光色素 (FAM) と結合し (図 3B)、HeLa 細胞への取り込み実験を行いました。その結果、oligo(β -Lys)_n を持たない FAM 分子は、HeLa 細胞内に全く取り込まれませんが、我々の予想通り、oligo(β -Lys)_n で化学修飾した FAM は細胞内に存在する様子が観察され、oligo(β -Lys)_n が高い細胞膜透過性を有することを明らかにしました²² (図 3C)。

5. おわりに

本研究で我々は、生合成酵素群を応用利用することにより、 β -Lys、glycine 誘導体に続く第 3 のアミノ酸側鎖を有する新規 ST 類縁化合物を創出することができました。今は量的な問題から、生理活性試験には至っていませんが、真核生物への毒性が緩和されているか、大変興味深いところです。またこれらアミノ酸側鎖の生合成酵素群の機能改変により、今後はさらに多様なアミノ酸側鎖を持つ ST 類縁化合物の創出が可能となり、その中には真核生物に毒性を示さない有用化合物が存在するかもしれません。

また、酵素合成によって、カチオン性ペプチド oligo(β -Lys)_n の創出に成功し、本化合物は高い細胞

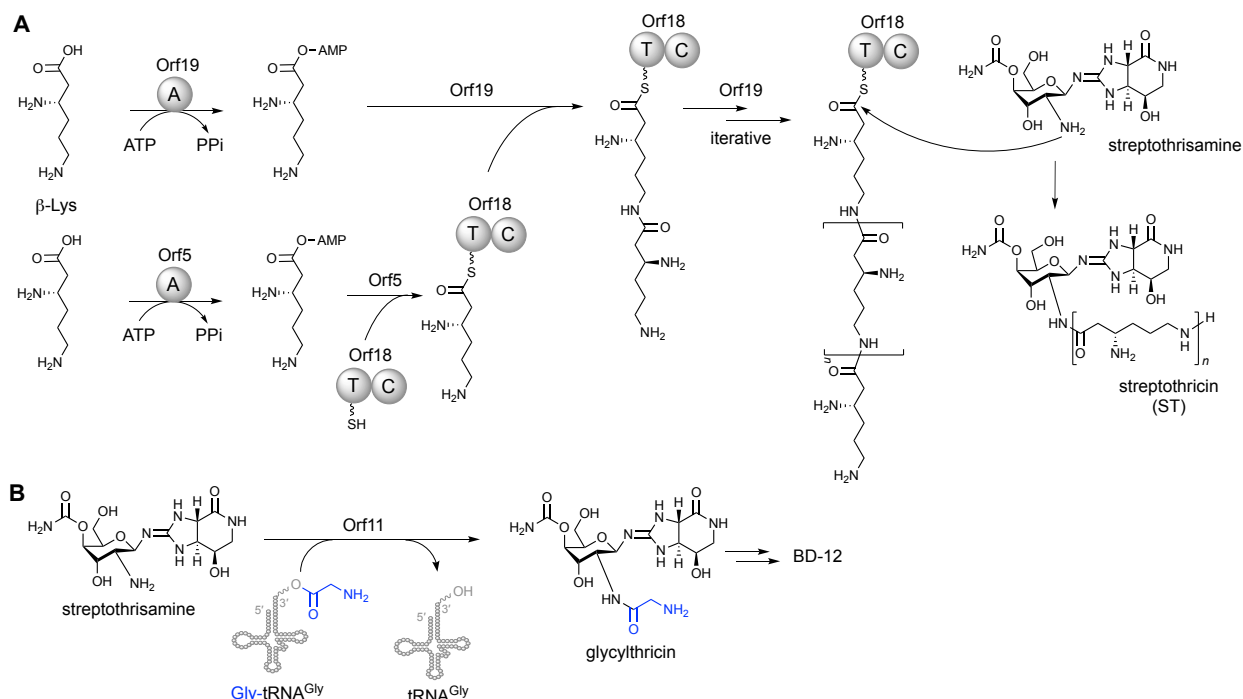


図 2 β -Lys 側鎖および glycine 誘導体側鎖の生合成メカニズム

膜透過性から、様々な化合物の細胞内送達を実現するポリカチオン化修飾剤としての応用が期待されます。

本研究で我々は、「ただの毒」である未利用資源から、2つの新規化合物を創製することができました。実用化に向けた検討はまだまだ必要な段階ですが、未利用資源から有用資源を見出す成功例となることを目指し、今後も研究を続けてまいります。

参考文献

1. Waksman, S. A. J Bacteriol 1943, 46, 299–310.
2. Haupt, I.; Huebener, R.; Thrum, H. J Antibiot 1978, 31, 1137–1142.
3. Goldstein, A. L.; McCusker, J. H. Yeast 1999, 15, 1541–1553.
4. Hentges, P.; Van Driessche, B.; Tafforeau, L.; Vandenhoute, J.; Carr, A. M. Yeast 2005, 22, 1013–1019.
5. Shen, J.; Guo, W.; Kohler, J. R. Infect Immun 2005, 73, 1239–1242.
6. Idnurm, A.; Reedy, J. L.; Nussbaum, J. C.; Heitman, J. Eukaryot Cell 2004, 3, 420–429.
7. Joshi, P. B.; Webb, J. R.; Davies, J. E.; McMaster, W. R. Gene 1995, 156, 145–149.
8. Takemoto, T.; Inamori, Y.; Kato, Y.; Kubo, M.; Morimoto, K.; Morisaka, K.; Sakai, M.;

Sawada, Y.; Taniyama, H. Chem Pharm Bull 1980, 28, 2884–2891.

9. Chamberlain, D. A.; Brettell, R. I. S.; Last, D. I.; Witrzens, B.; McElroy, D.; Dolferus, R.; Dennis, E. S. Aust J Plant Physiol 1994, 21, 95–112.
10. Inamori, Y.; Sunagawa, S.; Tsuruga, M.; Sawada, Y.; Taniyama, H.; Saito, G.; Daigo, K. Chem Pharm Bull 1978, 26, 1147–1152.
11. Inamori, Y.; Morimoto, K.; Morisaka, K.; Saito, G.; Sawada, Y.; Taniyama, H.; Matsuda, H. Chem Pharm Bull 1979, 27, 230–234.
12. Inamori, Y.; Kato, Y.; Morimoto, K.; Morisaka, K.; Saito, G.; Sawada, Y.; Taniyama, H. Chem Pharm Bull 1979, 27, 2570–2576.
13. Kato, Y.; Kubo, M.; Morimoto, K.; Saito, G.; Morisaka, K.; Inamori, Y.; Hama, I.; Maekawa, T.; Mazaki, H.; Ishimasa, T.; Sawada, Y.; Taniyama, H. Chem Pharm Bull 1981, 29, 580–584.
14. Furumai, T.; Kaneko, K.; Matsuzawa, N.; Sato, M.; Okuda, T. J Antibiot 1968, 21, 283–289.
15. Ito, Y.; Ohashi, Y.; Sakurai, Y.; Sakurazawa, M.; Yoshida, H.; Awataguchi, S.; Okuda, T. J Antibiot 1968, 21, 307–312.
16. Kusakabe, Y.; Yamauchi, Y.; Nagatsu, C.; Abe,

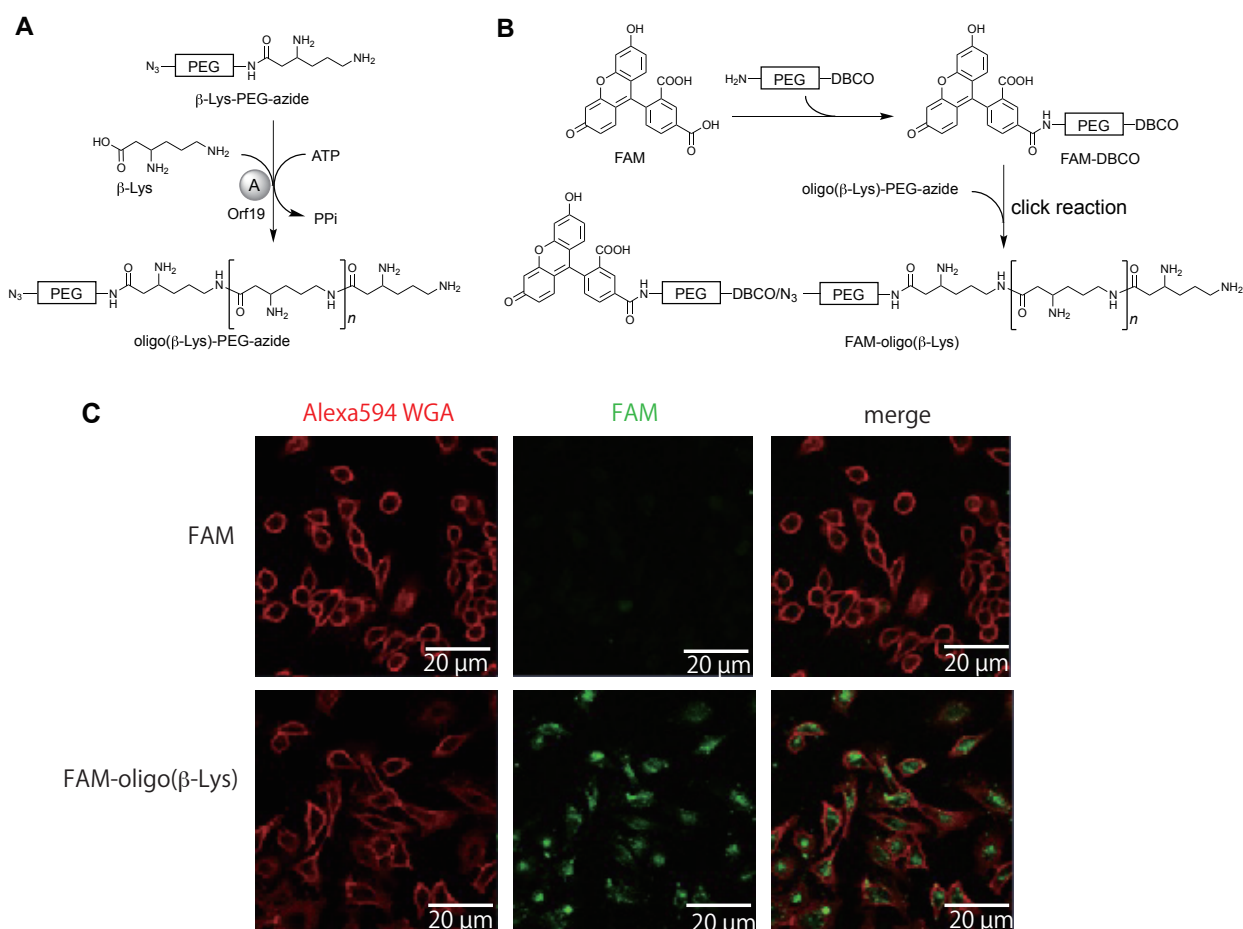


図3 カチオン性ペプチド oligo(β-Lys) による細胞膜透過性試験

- H.; Akasaki, K. J Antibiot 1969, 22, 112–118.
17. Taniyama, H.; Sawada, Y. J Antibiot 1971, 24, 708–710.
 18. Sawada, Y.; Kawakami, S.; Taniyama, H. J Antibiot 1977, 30, 460–467.
 19. Kido, Y.; Furuie, T.; Suzuki, K.; Sakamoto, K.; Yokoyama, Y.; Uyeda, M.; Kinjyo, J.; Yahara, S.; Nohara, T.; Shibata, M. J Antibiot 1987, 40, 1698–1706.
 20. Maruyama, C.; Toyoda, J.; Kato, Y.; Izumikawa, M.; Takagi, M.; Shin-ya, K.; Katano, H.; Utagawa, T.; Hamano, Y. Nat Chem Biol 2012, 8, 791–797.
 21. Maruyama, C.; Niikura, H.; Izumikawa, M.; Hashimoto, J.; Shin-ya, K.; Komatsu, M.; Ikeda, H.; Kuroda, M.; Sekizuka, T.; Ishikawa, J.; Hamano, Y. Appl Environ Microbiol 2016, 82(12), 3640–3648.
 22. Takeuchi, Y.; Ushimaru, K.; Kaneda, K.; Maruyama, C.; Ito, T.; Yamanaka, K.; Ogasawara, Y.; Katano, H.; Kato, Y.; Dairi T.; Hamano, Y. Commun Biol 2022, 5, 1132–1132.

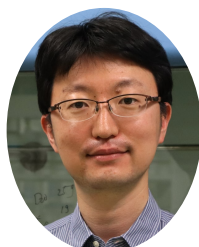
はまの よしみつ
福井県立大学 大学院生物資源学専攻
分子機能科学研究領域
y-hamano@g.fpu.ac.jp
<https://applied-microbiology-fpu.com>

まるやま ちとせ
福井県立大学 大学院生物資源学専攻
分子機能科学研究領域
ch-maruyama@g.fpu.ac.jp
<https://applied-microbiology-fpu.com>

糸状菌が生産するペプチド系天然物の 生合成に見出された新規酸化酵素の機能多様性

はじめに

このたび、東京大学の後藤佑樹先生から本ニュースレターの「ペプチドの酵素合成分野」をテーマとした企画への寄稿のお話をいただきました。貴重な機会をいただきましたことを、編集委員の先生方に心より御礼申し上げます。筆者は、放線菌や糸状菌等の微生物が生産する多様な天然有機化合物を対象として、生合成研究を行っています。複雑かつユニークな化学構造を有する天然物の生合成経路やそこに関わる酵素の機能を明らかにし、得られた知見を新規化合物の探索や創製、化合物の構造展開に活かすことを目指しています。特に最近では、天然物の構造多様性と生物活性の発現に寄与する酸化酵素に着目し



尾崎 太郎

て研究を進めてきました¹。本稿では、ペプチドの酵素合成に関わる話題ということで、糸状菌が生産するペプチド系天然物の生合成に関わるユニークな酸化酵素の機能についてご紹介いたします。

背景

ペプチド系天然物の中には、RiPPs (Ribosomally synthesized and Posttranslationally modified Peptides) と呼ばれるグループが知られています。これは、生体内の他のタンパク質と同様に、遺伝子の転写と翻訳によって合成されたペプチド（あるいはタンパク質）が前駆体となり、これが種々の翻訳後修飾により天然物が生合成されるという特徴から提案された名称です²。多様な化学構造と優れた生物活性を示す化合物が多い魅力的な化合物群であり、生合成研究においては RiPPs の生合成酵素を利用した修飾ペプチドの創製なども盛んに試みられています³。RiPPs は動物や植物、微生物などすべての生物に普遍的に分布していますが、糸状菌（カビやキノコなど）においてはキノコ毒として知られるアマトキシン等限られた例しか知られておりませんでした。近年、マイコトキシンの一種である ustiloxin B も RiPPs の一種であることが報告されましたが、本化合物が有する特徴的な 13 員環エーテルの構築に関わるのが二種の機能未知酵素 UstYa/UstYb です^{4,5} (図 1)。前駆体遺伝子 *ustA* を、*ustYa/ustYb* 及びチロシナーゼ様酵素遺伝子 *ustQ* と共発現することで環状ペプチドが生産されることが報告されています⁵。UstYa/UstYb は互いに相同性を示し、機能未知酵素ドメイン DUF3328 のみで構成されています。チロシン・イソロイシン残基間の酸化的なエーテル環化に関わることから新たなタイプの酸化酵素だと考えられています。UstYa のホモログは糸状菌に広く分布しており⁶、様々な環状ペプチドの生合成に関わると考えられますが、それらの機能はほとんどわかっておりませんでした。近年、これらの酵素がペプチドの環化以外にも様々な分子変換に関わることが明らかになりつつあり、以下に筆者が携わった 2 つの研究を挙げたいと思います。

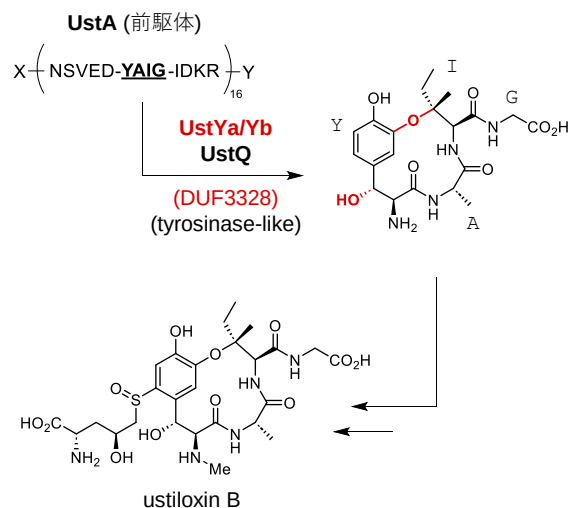


図 1 Ustiloxin B 生合成における環状エーテルの構築

Phomopsin A の生合成研究

Phomopsin A (**1**) はマイコトキシンの一種で、チューブリンの重合を強力に阻害することから抗がん剤のリード化合物としても期待されています。

化学構造上の特徴としては、ustiloxin と共通する 13 員環エーテルを有することに加え、側鎖に炭素-炭素二重結合を含むデヒドロアミノ酸残基を多数含有することが挙げられます。化合物 **1** も RiPPs の一種であり、前駆体タンパク質 PhomA の中に繰り返し現れる YVIPID という 6 残基のペプチドが翻訳後修飾を受けることで生合成されますが、各酵素の機能や経路の詳細は不明でした⁷。

著者らは、**1** の生産菌において各生合成遺伝子をノックアウトし、その各変異体の生産物を分析することで各酵素の機能解析を進めました。**1** の生合成には PhomYa-Ye の 5 種の UstYa ホモログが関わりますが (図 2A)、このうち PhomYa 及び PhomYb はそれぞれチロシン残基 C β のヒドロキシ化とエーテル環化を担います。また、残る 3 種の PhomYc, PhomYd, PhomYe がそれぞれイソロイシン, アスパラギン酸, プロリン残基の不飽和化に関与することを示しました⁸ (図 2B)。この他にも 2 種のチロシナーゼ様酵素 PhomQ1 と PhomQ2 によるチロシン残基の塩素化・ヒドロキシ化や、メチル基転移酵素 (MTase) PhomM の機能などを明らかにし、生合成の概要を図

2B のように提唱しています。現在は、遺伝子ノックアウトにより間接的に機能が示されたのみですが、今後酵素反応機構など詳細の解明が待たれます。

生合成系を利用したペプチドの生産・創製という点に関して述べると、**1** の生合成酵素の基質認識が比較的緩く、幅広い基質を受容できるということが特筆すべき点として挙げられます。本研究で構築した各生合成遺伝子の欠失変異株は、**1** を生産することができませんが、多くの場合標的とした生合成酵素に対応する部分のみが未修飾の構造類縁体を生産しました⁸。これは、一部の修飾が行われない場合でも UstYa ホモログ等の各生合成酵素が機能していることを示しています。本研究では、9 種の変異株を作製し合計 13 種の phomopsin 類縁体を同定することができました。この結果は、生合成経路や酵素の利用が **1** のような複雑な構造を有するペプチド系天然物の供給や構造展開において有用な手法であることを示すものと言えます。

Cyclochlorotine の生合成研究

既に UstYa のホモログが RiPPs の生合成に広く分布していることを述べましたが、最近これらの酵素が非リボソームペプチドの生合成に関わる例も見出されました。Cyclochlorotine (**2**) は、糸状菌 *Talaromyces islandicus* が生産するマイコトキシンの一つであり、塩素化されたプロリン等を含有する環状

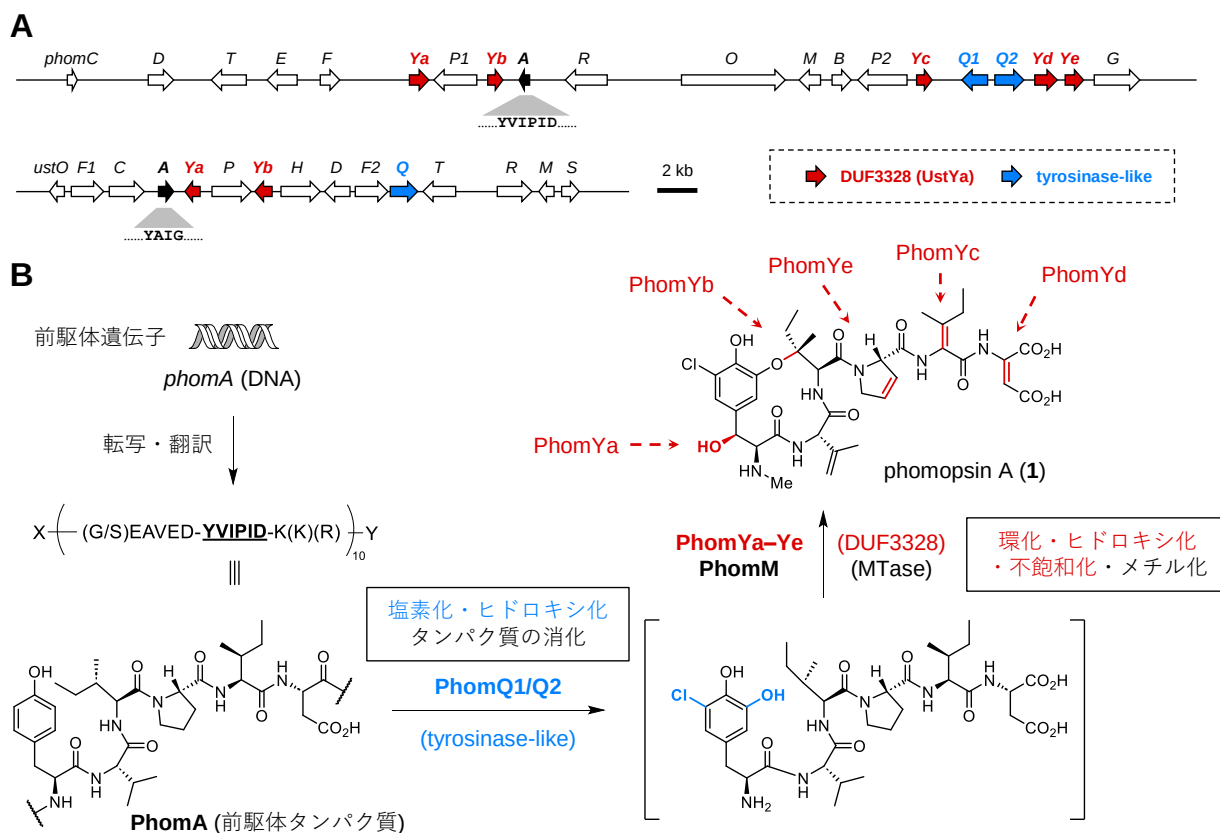


図 2 Phomopsin A の生合成。(A) Phomopsin A 及び ustiloxin B の生合成遺伝子クラスター (BGC) の比較。Phomopsin A の BGC には ustiloxin B のものよりも多くの UstYa ホモログ及びチロシナーゼ酵素遺伝子が存在し、これが両者の構造の違いの一因になっている。(B) Phomopsin A 生合成の概要。各酵素が作用する順序やタンパク質の消化されるタイミングなどは分かっていない。

ペンタペプチドです。そのペプチド骨格の合成にはリボソームペプチド合成酵素 (NRPS) CctN が関与することが知られていました⁹ (図 3A)。一方、塩素化反応については、既知のハロゲン化酵素のホモログがゲノム上に存在せず、候補遺伝子の探索・解析が行われたものの知見が得られておりませんでした。

筆者らは、染色体上で NRPS 遺伝子の近傍に 3 種の *ustYa* ホモログ *cctO*, *cctP2*, *cctR* が存在することに着目し、これらが **2** の生合成における修飾酵素遺伝子ではないかと仮説を立てました (図 3A)。実際に、各遺伝子のノックアウトや異種宿主での発現等を行い、CctP2 がプロリン残基の塩素化、CctR がアミノ酪酸 (aminobutyric acid: Abu) 残基のヒドロキシ化に関与することを明らかにしました。また、通常の NRPS はアミノ酸の縮合によりペプチド結合を形成しますが、**2** の生合成においては NRPS によるペプチド鎖伸長の過程でセリンと Abu の間でエステル結合を形成し、デブシペプチド **3** が生成することが分かりました。続く塩素化により **4** が生成した後、CctO が分子内アシルシフトを触媒することにより **2** が生合成されることがわかりました¹⁰ (図 3B)。この異質化は非酵素的にも容易に進行しますが、*cctO* 欠損株では **4** が蓄積することから生体内では確かに CctO が存在しないと進行しないようです。なぜ *T. islandicus* がこのような回りくどい方法でペプチド結合を作るのか？という問いに対する合理的な説明は今のところなく、さらなる解析が必要な状況です。上記 3 種の *UstYa* ホモログの機能発現には、同じく NRPS 遺伝子近傍に存在する 2 種の輸送酵素遺伝子 (図 3A の *cctQ* と *cctS*) との共発現が必須であったことから、各生合成

酵素の局在や生合成中間体の細胞内輸送について知見を得ることで上記の問いに対する答えに迫れるのではないかと考えています。

おわりに

以上ご紹介したように、当初 RiPPs の生合成における環化酵素として発見された *UstYa* ですが、エーテル環化以外に塩素化や不飽和化などにも関与することがわかり、その機能の多様性には目を見張るものがあります。生体内の酸化酵素・代謝酵素としてよく知られるシトクロム P450 もヒドロキシ化やエポキシ化などの単純な酸化反応以外に多様な反応を触媒することが知られておりますが、*UstYa* もそれに匹敵する機能の多様性を持つ酵素ファミリーであると考えられます¹¹。また、RiPPs だけでなく NRPS の生合成に関わる例も見つかるなど、対象とする化合物という点でも広がりを見せています。本稿で挙げた以外にポリケチドやテルペノイド等ペプチド以外の生合成遺伝子の近傍に *ustYa* ホモログが存在する事例もいくつかあり、糸状菌天然物の生合成に広く関わる重要な酵素群なのではないかと推測して、現在も研究を進めています。今後、この興味深い酵素ファミリーの機能がより詳細に明らかになることで、ユニークな構造を有するペプチド系天然物の探索や生合成系を利用した新規ペプチドの創製が加速するものと期待しています。

本稿は北海道大学大学院理学研究院の有機反応論研究室で行った研究を中心に執筆いたしました。終始ご指導を賜りました及川英秋先生、南篤志先生、一緒に研究を進めていただいた研究室のメンバー、そして研

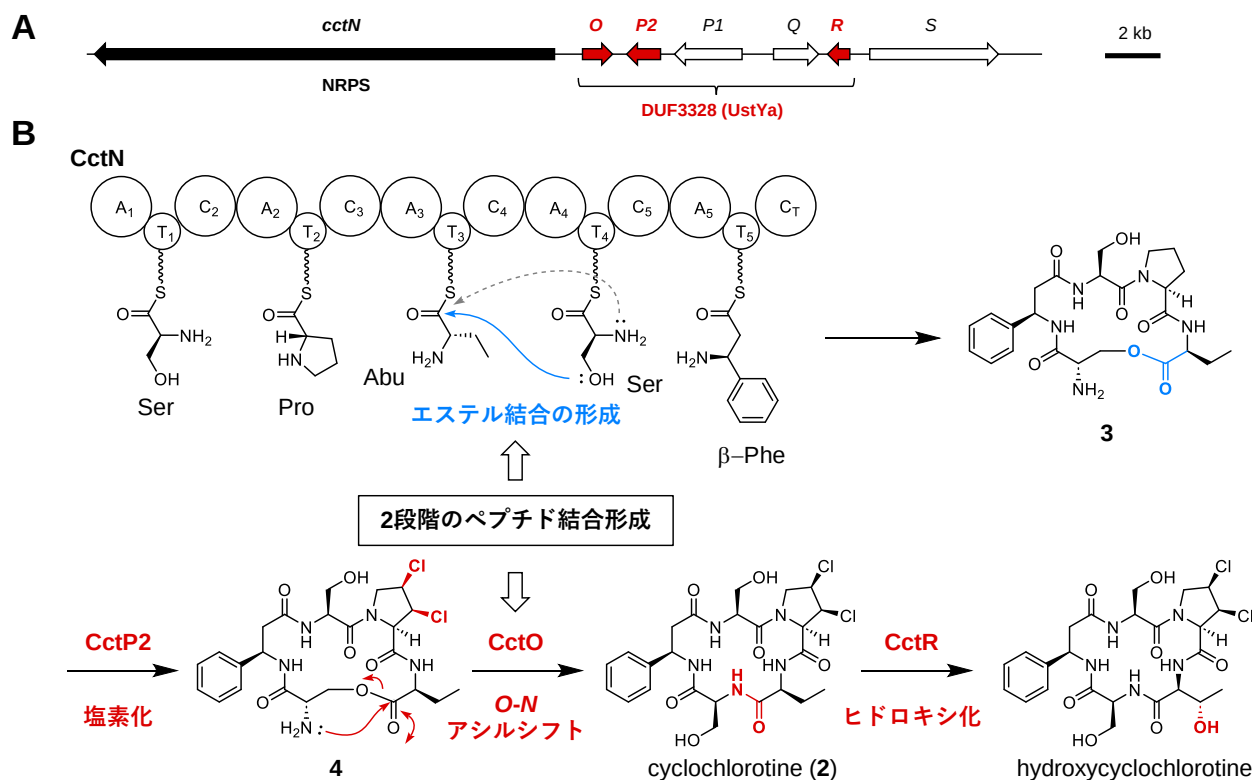


図 3 Cyclochlorotine の生合成。(A) Cyclochlorotine の BGC, (B) Cyclochlorotine の生合成経路と 3 種の *UstYa* ホモログの機能。

究遂行に多大なお力添えを賜りました共同研究者の方々に深く感謝申し上げます。本研究は、JSPS 科研費 19H04635 の助成を受けたものです。

参考文献

1. Ozaki, T. Biosci Biotechnol Biochem 2023, in press (DOI: 10.1093/bbb/zbad062).
2. Arnison, P. G. et al. Nat Prod Rep 2013, 30, 108–160.
3. Montalbán-López, M. et al. Nat Prod Rep 2021, 38, 130–239.
4. Umemura, M.; Nagano, N.; Koike, H.; Kawano, J.; Ishii, T.; Miyamura, Y.; Kikuchi, M.; Tamano, K.; Yu, J.; Shin-ya, K.; Machida, M. Fungal Genet Biol 2014, 68, 23–30.
5. Ye, Y.; Minami, A.; Igarashi, Y.; Izumikawa, M.; Umemura, M.; Nagano, N.; Machida, M.; Kawahara, T.; Shin-ya, K.; Gomi, K.; Oikawa, H. Angew Chem Int Ed 2016, 55, 8072–8075.
6. Nagano, N.; Umemura, M.; Izumikawa, M.; Kawano, J.; Ishii, T.; Kikuchi, M.; Tomii, K.; Kumagai, T.; Yoshimi, A.; Machida, M.; Abe, K.; Shin-ya, K.; Asai, K. Fungal Genet Biol 2016, 86, 58–70.
7. Ding, W.; Liu, W.; Jia, Y.; Li, Y.; van der Donk, W. A.; Zhang, Q. Proc Natl Acad Sci USA 2016, 113, 3521–3526.
8. Sogahata, K.; Ozaki, T.; Igarashi, Y.; Naganuma, Y.; Liu, C.; Minami, A.; Oikawa, H. Angew Chem Int Ed 2021, 60, 25729–25734.
9. Schafhauser, T.; Kirchner, N.; Kulik, A.; Huijbers, M.; Flor, L.; Caradec, T.; Fewer, D.; Gross, H.; Jacques, P.; Jahn, L.; Jokela, J.; Leclère, V.; Ludwig-Müller, J.; Sivonen, K.; van Berkel, W.; Weber, T.; Wohlleben, W.; van Pée, K. Environ Microbiol 2016, 18, 3728–3741.
10. Jiang, Y.; Ozaki, T.; Liu, C.; Igarashi, Y.; Ye, Y.; Tang, S.; Ye, T.; Maruyama, J.; Minami, A.; Oikawa, H. Org Lett 2021, 23, 2616–2620.
11. Ozaki, T.; Minami, A.; Oikawa, H. J Antibiot 2023, 76, 3–13.

おざき たろう
東北大学 大学院薬学研究科 分子薬科学専攻
分子解析学講座 医薬資源化学分野
taro.ozaki.d3@tohoku.ac.jp

日本ペプチド学会からのお知らせ

《2023 年度行事予定》

2023 年 8 月 8 日 (火) ~ 10 日 (休)

第 55 回若手ペプチド夏の勉強会

場 所：京都大学宇治キャンパスおうばくプラザ

世話人：河野 健一（京都大）

小林 数也（京都薬科大）

吉矢 拓（ペプチド研究所）

2023 年 10 月

Peptide Newsletter Japan No. 130 発行

2023 年 11 月 8 日 (木) ~ 10 日 (金)

第 60 回ペプチド討論会

場 所：びわ湖ホール・中ホール,

ピアザ淡海（滋賀県大津市）

世話人：向井 秀仁（長浜バイオ大学）

相馬 洋平（和歌山県立医科大学）

2023 年 11 月

第 114 回理事会・第 42 回評議員会合同会議

2023 年 11 月

2023 年度日本ペプチド学会通常総会

2023 年 11 月

市民フォーラム 2023

2023 年 11 月

第 18 期評議員選挙公告

2023 年 12 月

第 18 期評議員選挙開票

2024 年 1 月

Peptide Newsletter Japan No. 131 発行

2024 年 1 月

第 115 回理事会

《海外関連学会》

2023 年 10 月 11 日 ~ 14 日

9th Modern Solid Phase Peptide Synthesis & Its Applications Symposium (Solid Phase 2023)

Queensland, Australia

<https://www.solidphase.org/>

2023 年 10 月 15 日 ~ 20 日

13th International Peptide Symposium / 15th Australian Peptide Conference

Brisbane, Australia

<https://www.peptides2023.org/>

編集後記

ペプチドニュースレター No. 129 号はいかがでしたでしょうか？本号では「ペプチドを合成/修飾する酵素」をテーマとして、5 本の研究紹介記事をお届けいたしました。本学会の研究者の多くは化学合成法でペプチドを生産されていると思いますが、最近では生合成分野の先生方の討論会参加が増えてきております。そこで、当該分野の最新研究をまとめてお伝えする機会として本特集を企画いたしました。ペプチド天然物の生合成系は NRPS と RiPP の二大クラスに大別されます。これら両方のクラスについて、「新規酵素の同定と生化学的解析」あるいは「酵素の改変/流用による人工誘導体の合成」を行う幅広い研究事例を網羅した特集になったと自負しております。改めて執筆者の先生方にこの場を借りて感謝申し上げます。

129 号アンケートフォーム URL：

<https://forms.gle/psmsSXp4MXgCwTk5A>

(編集委員：後藤 佑樹)

PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

編集・発行：日本ペプチド学会

〒562-0015 箕面市稲 4-1-2

一般財団法人蛋白質研究奨励会内

発行日：2023 年 7 月 26 日

編集委員

林 良雄（担当理事）（東京薬科大学 薬学部）

TEL 042-676-3275

E-mail : yhayashi@toyaku.ac.jp

巢山 慶太郎（九州大学 基幹教育院）

TEL 092-802-5849

E-mail : suyama@artsci.kyushu-u.ac.jp

後藤 佑樹（東京大学 大学院理学系研究科）

TEL 03-5841-4338

E-mail : y-goto@chem.u-tokyo.ac.jp

武居 俊樹（大阪大学 蛋白質研究所）

TEL 06-6879-8602

E-mail : toshiki.takei@protein.osaka-u.ac.jp

薬師寺 文華（北海道大学 薬学研究院）

TEL 011-706-3229

E-mail : fyakushiji@pharm.hokudai.ac.jp

(本号編集担当：後藤 佑樹)