

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15285

研究課題名(和文) タンデム型ペプチド環化酵素の機能解析と化学酵素合成への応用

研究課題名(英文) Characterization of a tandem-macrocyclase in nonribosomal peptide synthetases

研究代表者

今野 翔 (Konno, Sho)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：70882190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、環状リポペプチドMA026のペプチド環化酵素であるタンデム型チオエステラーゼ(TE1-TE2)の機能解析を行い、さらにMA026誘導体の化学酵素合成への応用を検証した。まず、大腸菌を用いて調製した組換えタンパク質を用いて、それぞれのTEの機能について調べた。その結果、TE1のみが直鎖MA026を環化することが明らかとなった。続いて、TE1が基質のどのアミノ酸を認識しているか調べたところ、広範な基質許容性を示すことがわかり、さまざまなMA026誘導体の合成に応用できることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環状ペプチドは、生体内安定性や標的選択性に優れていることから、重要な創薬モダリティに位置付けられている。ペプチドの環化反応は誘導体合成における律速段階になることが多いが、ペプチド環化酵素を利用することで効率的な合成が期待できる。本研究はペプチド環化酵素の中でも例の少ないタンデム型チオエステラーゼの機能を明らかにしており、ペプチド環化酵素に関する新たな知見を見出した。さらに、誘導体合成に応用できることを証明しており、本研究成果は創薬候補となる環状ペプチド天然物の迅速な構造最適化に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Tandem thioesterase (TE) domain are a unique peptide cyclase which is often found in C-terminus of lipodepsipeptide synthetases. While peptide cyclases can be used as a biocatalyst for chemoenzymatic synthesis of macrocyclic peptides, the function and utility of tandem TEs are less understood. In this study, we investigated the enzymatic function of each TE domain in biosynthetic enzymes of cyclic lipodepsipeptide MA026, a tight junction opener. Our biochemical experiments using recombinant MazC TEs and synthetic peptide substrates revealed that TE1 domain solely functions as a MA026 cyclase. The chemoenzymatic reaction of MazC TE1 and peptide substrate analogs demonstrated that MazC TE1 can produce a variety of MA026 derivatives, indicating that TE1 of tandem TE domain would be a potential biocatalyst for preparation of macrocyclic peptide analogs.

研究分野：Chemical Biology

キーワード：非リボソームペプチド合成酵素 ペプチド環化酵素 チオエステラーゼ 環状ペプチド 生合成 NRPS  
化学酵素合成 ハイブリッド合成

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

天然化合物の中でも環状ペプチドは、高い生体内安定性に加え、ユニークな生物活性と標的選択性を示すことから、有望な医薬資源となってきた。しかしながら、その多様かつ複雑な構造ゆえに、有機合成による環状ペプチドの誘導体化は容易でない。特に分子内環化反応は、一般に長時間かつ高希釈条件を必要とし、環状ペプチド誘導体を合成する上で律速段階となっている。一方、ペプチド性天然化合物の生合成酵素である非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) において、環化反応は主にチオエステラーゼ (TE) が担っており、効率的に分子内環化反応を触媒する。近年、これらの酵素を利用した合成ペプチドの簡便な酵素的環化反応が報告されている<sup>1</sup>。そのため、新しい環化酵素の発見と機能解析・改変は、酵素を利用した多様性の豊かな環状ペプチドライブラリーの構築につながる。

申請者らは最近、抗 HCV 活性を示す環状ペプチド MA026 の生合成遺伝子クラスターを同定し、その中にタンデム型 TE が存在することを発見した (図 1a, b)<sup>2</sup>。タンデム型 TE は主に *Pseudomonas* 属のリボペプチド合成酵素に存在する珍しい触媒ドメインで、数例のみ機能解析が報告されている<sup>3-5</sup>。しかし、タンデム型 TE の機能は報告ごとに異なり、MA026 合成酵素のタンデム型 TE がどのような役割を持っているか不明である (図 1c)。さらに、タンデム型 TE を用いた化学酵素合成例はない。そこで本研究では、MA026 生合成酵素に存在するタンデム型 TE の「それぞれの酵素の機能」および「化学酵素合成への応用は可能か」の 2 点について検証した。

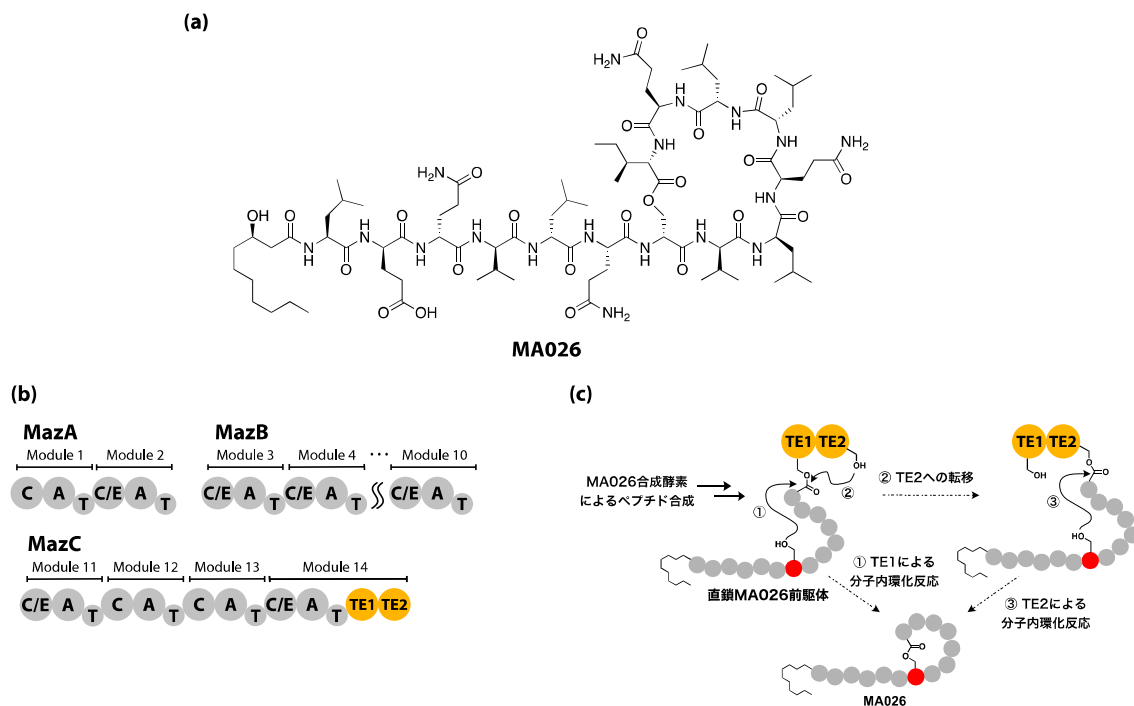


図 1. (a) MA026 の構造。 (b) MA026 合成酵素。MazC のモジュール 14 は二つの TE を有する (C: コンデンセーション, A: アデニレーション, T: チオレーション, E: エピメラーゼ, TE: チオエステラーゼ)。 (c) タンデム TE による MA026 の推定環化メカニズム。

### 2. 研究の目的

本研究では、MA026 合成酵素に存在するタンデム型 TE の機能を明らかにし、さらにタンデム型環化酵素を用いた環状ペプチドの化学酵素合成への可能性を検証することを目的とする。本研究の遂行により、タンデム型 TE を利用した新たな化学酵素合成の基盤技術構築をめざす。

### 3. 研究の方法

#### A. MA026 タンデム型 TE のクローニング・異種発現

まずタンデム型 TE に相当する遺伝子を取得する。遺伝子は上流の T ドメインから発現することにした。また、活性中心のセリンをアラニンに変異した変異酵素 (T-TE1\*-TE2, T-TE1-TE2\* および T-TE1\*-TE2\*) もそれぞれ作製する。T-TE1-TE2 に加えて、T-TE1 および TE2 のみもクローニングし、単独でのそれぞれの機能も精査する。これらの遺伝子を組み込んだ pET ベクターを大

腸菌に導入し、組換えタンパク質の異種発現を行う。精製用タグとして His タグを導入予定だが、組換えタンパク質が可溶化しないなど問題が発生した場合、可溶化しやすいタグへの変更を検討する。

#### B. MLP-SNAC の合成と酵素機能評価

項目 A で異種発現した組換えタンパク質の酵素活性を評価する。一般的に TE は直鎖ペプチド-SNAC (N-acetylcystamine) を基質として認識することが知られている<sup>6</sup>。そこで、固相および液相合成を用いて MA026 linear peptide-SNAC (MLP-SNAC) を合成し、酵素活性評価試験に用いる。酵素による環化体の生成は LCMS で確認する。

#### C. タンデム型 TE を利用した化学酵素合成への応用

項目 A および B の結果を基に、化学酵素合成に向けてタンデム型 TE の基質許容性を評価する。MA026-SNAC のそれぞれのアミノ酸について異なるアミノ酸を導入した基質誘導体を合成し、化学酵素合成に向けた環化反応の汎用性を明らかにしていく。

### 4. 研究成果

#### A. MA026 タンデム型 TE のクローニング・異種発現

まず、MazC のモジュール 14 に存在する T-TE1-TE2 に相当する遺伝子を pET28a に導入した。大腸菌 BL21 (DE3) 株を用いて異種発現し、Ni-NTA カラムを用いて精製したところ、可溶性の T-TE1-TE2 を得ることに成功した。また、同様の遺伝子から、T-TE1\*-TE2、T-TE1-TE2\*、T-TE1\*-TE2\*、T-TE1 および TE2 をそれぞれクローニングし、pET28a に組み込んで異種発現を試みた。T-TE1\*-TE2、T-TE1-TE2\*、T-TE1\*-TE2\*、T-TE1 は可溶性画分に得られたが、TE2 は不溶化していることが判明した。様々なリフォールディング条件を試したが、TE2 を可溶化することはできなかった。そこで、pCold-GST にサブクローニングし、GST 融合タンパク質として TE2 の発現を試みた。その結果、GST-TE2 を可溶性タンパク質として得ることができ、目的のタンパク質を全種類調製することに成功した。

#### B. MLP-SNAC の合成と酵素機能評価

まず、酵素活性評価に用いる MLP-SNAC の合成を行なった。MA026 は両親媒性の環状リポペプチドであり、酵素評価に用いるバッファーに対する溶解性が極めて悪い。そこで、脂肪酸部分を C10 から C4 に置換することにし、MLP-SNAC の合成を試みた。2-クロロトリチル樹脂を用いて、Fmoc ペプチド固相合成法によりペプチド鎖を伸長し、脱樹脂した保護ペプチドのチオエステル化を試みた。目的物の生成は確認できたが収率が低かったことから、種々縮合条件を検討した。しかし、いずれの条件においてもチオエステル化の収率及び反応再現性が低かったことから合成ルートを変更することにした。C4 脂肪酸を含む Leu1-D-Gln13 ペプチドを固相で合成し、別途液相合成した Ile-SNAC の縮合を試みたところ、円滑に反応が進行した(図 2)。脱保護の後、逆相 HPLC で精製することで MLP-SNAC を得ることに成功した。

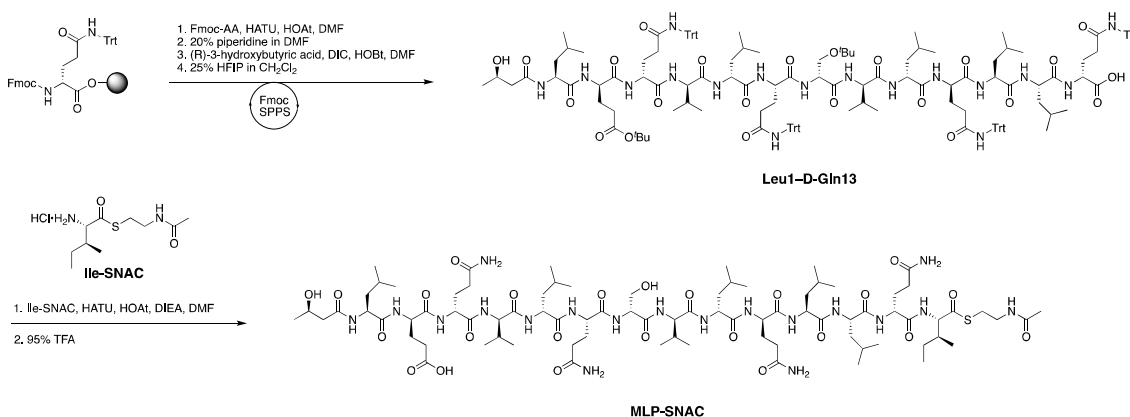


図 2. MLP-SNAC の合成。

続いて、組換えタンパク質と MLP-SNAC を用いて環化反応の評価を行なった。T-TE1-TE2 と MLP-SNAC をバッファー中で反応させたのち、LCMS を用いて反応を追跡した。その結果、C4-MA026 が生成することが確認できた。C4-MA026 の生成は、酵素非存在下では観察されなかった

たことから、T-TE1-TE2 が MLP-SNAC の環化反応を触媒していることが明らかになった。次に、どちらの TE が重要であるか特定するために、T-TE1 および GST-TE2 を用いて同様の評価を行ったところ、T-TE1 のみが環化体を生成した。また、活性中心変異体である T-TE1\*-TE2、T-TE1-TE2\*、および T-TE1\*-TE2\*を用いて MLP-SNAC の環化反応を追跡したところ、TE1 が活性な状態である T-TE1-TE2\*のみが反応を触媒するところが判明した。これらの結果から、MA026 合成酵素のタンデム TE のうち、TE1 が MA026 の環化酵素であることが明らかになった (図 3)。

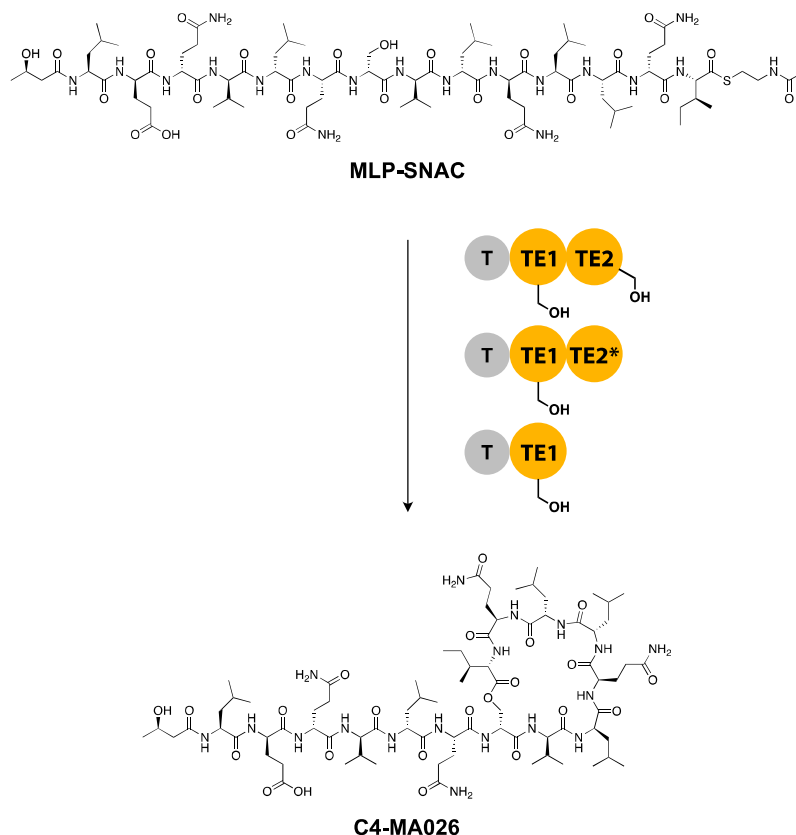


図 3. MazC タンデム TE を用いた環化反応。TE1 が存在すると酵素的環化反応が進行する。

### C. タンデム型 TE を利用した化学酵素合成への応用

TE1 が MLP-SNAC から C4-MA026 を合成できることがわかったことので、TE1 が化学酵素合成に応用可能か検証することにした。種々アミノ酸を置換した基質ペプチドを合成し、基質として認識され、さらに環化されるか検証した。まず、それぞれのアミノ酸をアラニンに置換した基質ペプチドを用いて側鎖による影響を調べたところ、反応速度に差はあるものの全ての基質が認識され、環化体が得られることがわかった。次に、環化点のドナー側およびアクセプター側となる D-Ser7 および Ile14 を置換した基質ペプチドを合成し、その影響を評価した。その結果、本来の基質よりも効率的に環化されるアミノ酸を見出すことに成功した。

以上、本研究では MA026 合成酵素である MazC のタンデム型 TE について機能評価を行い、TE1 が MA026 の環化に関与していることを見出した。また、MazC-TE1 は様々な基質を認識して環化することが可能であり、環状リポペプチド誘導体の化学酵素合成に応用可能であることを明らかにした。

### < 引用文献 >

1. Kohli, R. *et al*, *Nature* 2002, 418, 658.
2. Uchiyama, C. *et al*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2021, 60, 8792.
3. Roongsawang, N. *et al.*, *ChemBioChem* 2007, 8, 501.
4. Hou, J. *et al.*, *Chem. Biol.* 2011, 18, 655.
5. Mandalapu, D. *et al.*, *J. Org. Chem.* 2018, 83, 7271.
6. Ehmann, D. E. *et al.*, *Chem. Biol.* 2000, 7, 765.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>田中 美有、今野 翔、田口 晃弘、谷口 敦彦、林 良雄   |
| 2. 発表標題<br>Characterization of Tandem Thioesterase Domains in MA026 Synthetase |
| 3. 学会等名<br>第59回ペプチド討論会   |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>今野 翔、田中 美有、水口 友絵、田口 晃弘、谷口 敦彦、林 良雄   |
| 2. 発表標題<br>Peptide Phosphonates as a Transition State Analog for Thioesterases in Nonribosomal Peptide Synthetases |
| 3. 学会等名<br>第59回ペプチド討論会   |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Miyu Tanaka, Sho Konno, Akihiro Taguchi, Atsuhiko Taniguchi, Yoshio Hayashi                         |
| 2. 発表標題<br>Functional Characterization of Tandem Thioesterase in MA026 Biosynthesis                            |
| 3. 学会等名<br>4th International Conference on NATURAL PRODUCT DISCOVERY and DEVELOPMENT in the Genetic Era (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2023年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Sho Konno, Miyu Tanaka, Tomoe Mizuguchi Akihiro Taguchi, Atsuhiko Taniguchi, Yoshio Hayashi         |
| 2. 発表標題<br>Development of Peptide Phosphonate Inhibitors for Thioesterases in Nonribosomal Peptide Synthetases |
| 3. 学会等名<br>4th International Conference on NATURAL PRODUCT DISCOVERY and DEVELOPMENT in the Genetic Era (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2023年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|