様　式　C−19、F−19、Z−19　(共通)

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 27 年　4 月 16 日現在

機関番号：10101
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2013～2014
課題番号：25560397

研究課題名（和文）ペプチド化合物のリボソームとNRPSによる協同的新規生成機構の解明

研究課題名（英文）Peptide synthesis cooperatively achieved by peptide ligase and ribosomes

研究代表者
大利　徹（Dairi, Tohru）

北海道大学・工学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：70264679

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：放線菌が生産するペプチド系抗生物質、フェガノマイシン（PM）は、N-末のフェニルグリシン誘導体（PheGly）に長さと配列の異なるペプチド（NVKDRとNVKDGPT）が結合している2種類が知られている。その生合成研究を行った結果、2つのペプチド部分がリボソームにより、38アミノ酸からなるプレカーサーペプチドとして供給されること、さらにATP-graspモチーフを持つPGM1がPheGlyをATP依存的にリン酸化し、次いで、2つのペプチドが求核剤として働くことを明らかにした。本酵素は幅広い基質特異性を有したことから結晶構造解析も行った。

研究成果の概要（英文）：Pheganomycin (PGM) (1) consists of a nonproteinogenic amino acid, (S)-2-(3,5-dihydroxy-4-methoxyphenyl)-2-guanidinoacetic acid (2) at the N-terminus and a proteinogenic core peptide derived from NVKDGPT or NVKDR. The biosynthetic gene cluster was identified in Streptomyces cirratus to contain a gene encoding a precursor peptide, which included both the core peptides, and several genes plausibly encoding enzymes for 2 biosynthesis. We identified a gene (pgm1) responsible for the peptide bond formation between 2 and the peptides in the cluster. A pgm1-disruptant lost 1 productivity and recombinant PGM1 catalyzed the ATP-dependent peptide bond formation. This is the first example of cooperative peptide synthesis achieved by ribosome and peptide ligase using a peptide as a nucleophile. PGM1 accepted a variety of peptides as the nucleophile and the flexibility was comprehended by the crystal structure of PGM1 and the mutagenesis analyses.

研究分野：生合成工学

キーワード：フェガノマイシン　ペプチド抗生物質　放線菌　ペプチドライゲース

１．研究開始当初の背景

タンパク質の中で、数個から数十個のアミノ酸から成るものを特にペプチドと呼んでいる。ペプチドの中には、重要な生理作用を持つ物も多く、近年注目されている化合物である。天然に見出されるペプチド化合物の生合成機構として、最も良く知られているのが、タンパク質の生合成と同様にリボソーム関与の機構である。この場合、ペプチドに取り込まれるアミノ酸の種類と順番は、DNA に書き込まれたコドンに従う。

リボソームが関与しないペプチドの生合成として、非リボソームペプチド合成の英語名（non-ribosomal peptide synthetase）の頭文字を取って NRPS と総称される機構による生合成も知られている。NRPS では、非タンパク性のアミノ酸も基質として利用できるのが特徴である。NRPS によるペプチド結合形成は、以下の 3 つのドメインにより触媒される。(非)タンパク性のアミノ酸を ATP を用いてアデニル化により活性化するアデニレーション（A）-ドメイン、活性化基質をペプチドキャリアプロテインのセリン残基に付いている 4'-ホスホパンテテインのチオールに受け渡すチオレーション（T）-ドメイン)、チオエステル化された 2 つのアミノ酸間のペプチド結合形成を触媒するコンデンゼーション（C）-ドメイン。これらドメインは、取り込まれるアミノ酸の数に対応する数が必要であり、NRPS は巨大酵素である場合が多い。この機構の場合、ペプチドに取り込まれるアミノ酸の種類は、A-ドメインによって規定される。

上記以外にペプチド結合を形成する例としては、アミノ酸を ATP を用いてリン酸化により活性化した後、もう 1 つのアミノ酸のアミノ基との間でペプチド結合を形成するアミノ酸リガーゼや、リボソームでのタンパク合成に使用されるべき、アミノアシル化 t-RNA を用いて環状ジペプチドを形成する反応も知られている。しかし、何れの場合もペプチド基本骨格そのものは上記の何れかにより生合成される。

２．研究の目的

放線菌が生産するペプチド系抗生物質、フェガノマイシン（PGM）は、N-末の L-3,5-dihydroxy-amidino-phenylglycine（DHPG）誘導体に、タンパク性のアミノ酸からなる NVKDR と NVKDGPT が結合した 2 種類が知られている。PGM は非タンパク性のアミノ酸である DHPG を有することから NRPS で生合成されると推定されるが、一般に NRPS の A-ドメインのアミノ酸の認識は厳密であり、どのように 2 種類の配列からなるペプチドが生合成されるか興味が持たれたことから解明を試みた。

３．研究の方法

バンコマイシンの DHPG 骨格は、Type III PKS（DpgA）により生合成されることが報告されている。そこで DpgA 遺伝子オーソログを PGM 生産菌のドラフトゲノム配列中に探索した。放線菌では、天然物の生合成遺伝子はクラスターを成すことが多いことから、次いで、その周辺領域の遺伝子を精査、解析することによる PGM 生合成機構の解明を試みた。

４．研究成果

（１）DpgA 遺伝子オーソログをドラフトゲノム配列中に探索したした結果、生合成遺伝子クラスターを見出した。本クラスターには DHPG の修飾に関与すると推定される酵素遺伝子群が存在したが、NVKDR と NVKDGPT を合成し得る巨大な NRPS は存在しなかった。そこで、クラスター内にペプチダーゼが存在したことも考慮し、ペプチド部分がリボソーム関与で合成される可能性を考え塩基配列を精査した結果、38 アミノ酸からなる遺伝子を見出した。このペプチドは NVKDR と NVKDGPT の両方の配列を含んでおり、C-末の多様性を良く説明できた。

（２）本遺伝子を欠失させた変異株では、PGM の生産が消失したことから、NVKDR と NVKDGPT はリボソームにより供給されると結論づけた。

（３）しかし、DHPG とのペプチド結合を触媒する酵素に関しては候補遺伝子を見出せなかった。クラスター内には、A-ドメイン 1 つを持つ NRPS-A、T-ドメインを持つ NRPS-T、C-ドメインを持つ NRPS-C が存在した。これまで NRPS の A-ドメインで活性化されたアミノ酸に対し、ペプチドが求核剤となり C-ドメインで縮合された報告例は無いが、本可能性を確かめるため、NRPS-C の in-frame 破壊を行った。その結果、破壊株は PGM の生産性を維持したことから本 NRPS は PGM 生合成には関与しないと結論づけた。

（４）そこで取得したクラスター内の機能未知遺伝子が PGM の生合成に関与する可能性を検討した。既知のペプチド結合生成酵素は、ATP を基質の活性化に用いる場合が多いことから、ATP 結合モチーフを持つ ORF を探索し、プレカーサーペプチド遺伝子の右隣に ATP-grasp motif を持つ遺伝子（*pgm1*）を見出した。本遺伝子の破壊を行った結果、PGM 生産性が消失したことから、本遺伝子がペプチド結合形成に関与することが解った。

（５）組換え酵素を調製し、化学合成した L-amidino phenylglycine と NVKD（または NVKDGPT）を Mg^{2+}、ATP 存在下で反応さ

せた。その結果、両基質がペプチド結合した化合物が生成した。また、ATP-grasp motif から予想されたように、本酵素は基質をリン酸化により活性化し、ペプチドが求核剤となりペプチド結合を生成することが解った。

（6）これまで幾つかの ATP-grasp motif を持つ酵素の機能解析が行われているが、本酵素はペプチドを求核剤に用いる初めての例であり、またリボソームと、それ以外の機構が協同してペプチドの基本骨格を形成する初めての例でもある。

（7）組換え酵素を用いて酵素学的諸性質を検討した結果、本酵素は幅広い基質特異性を有することが分かった。N-末として、D-amidino phenylglycine 、2-guanidinoacetic acid、 creatine も基質となった。さらに求核剤として、PGM とは全く関連が無い、アスパルテームや昆虫由来の 18 アミノ酸から成る抗菌ペプチドも基質となることが分かった。したがって、本酵素は、種々のペプチドの N-末キャッピング酵素と言え、LC/MS を用いたプロテオーム解析の内部標準の作成や、生理活性ペプチドのペプチダーゼからの保護等に応用可能かもしれない。

（8）本酵素が示す幅広い基質特異性を理解するため、結晶構造解析も行った。種々の基質との結晶化を試みた結果、AMP との複合体として結晶を得ることが出来た。解析の結果、配列相同性が 18%と低いが、同じく ATP-grasp superfamily に属する、glycinamide ribonucleotide synthase（PurD）と構造的に類似していることが解った。また、N-末のグアニジノ基の認識や求核剤として働くペプチドの認識に関わるアミノ酸残基をドッキングシュミレーションにより推定し、変異導入実験により確認した。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 2 件）

1 M. Noike, T. Matsui, K. Ooya, I. Sasaki, S. Ohtaki, Y. Hamano, C. Maruyama, J. Ishikawa, Y. Satoh, H. Ito, H. Morita and <u>T. Dairi</u>, A peptide ligase and the ribosome cooperate to synthesize the peptide pheganomycin. Nat. Chem. Biol., 11, 71-76 (2015). doi: 10.1038/nchembio.1697. 査読有

2 <u>大利　徹</u>、多様なペプチドの末端にキャップをかぶせる酵素？！-生理活性ペプチドのさらなる利用を目指して、化学（化学同人）、Vol. 70, No. 3, 44-49 (2015). 査読無

〔学会発表〕（計 11 件）

1 <u>大利　徹</u>、リボソームと新規ペプチドリガーゼによる協調的ペプチド生成機構、日本農芸化学会大会、2015 年 3 月 25 日～29 日、岡山大学（岡山県岡山市）

2 野池基義、松井 崇、小笠原泰志、森田洋行、<u>大利　徹</u>、緩い基質特異性を示すペプチドリガーゼの結晶構造からの考察と応用、日本農芸化学会大会、2015 年 3 月 25 日～29 日、岡山大学（岡山県岡山市）

3 川田純平、小笠原泰志、野池基義、<u>大利　徹</u>、放線菌が持つペプチドリガーゼオーソログの機能解析-1-、日本農芸化学会大会、2015 年 3 月 25 日～29 日、岡山大学（岡山県岡山市）

4 小笠原泰志、川田純平、野池基義、降旗一夫、<u>大利　徹</u>、放線菌が持つペプチドリガーゼオーソログの機能解析-2-、日本農芸化学会大会、2015 年 3 月 25 日～29 日、岡山大学（岡山県岡山市）

5 松井崇、大瀧翔太、野池基義、<u>大利　徹</u>、森田洋行、ペプチド系抗生物質フェガノマイシンの生合成に見いだされた新規ペプチドライゲース PGM1 の結晶構造解析、平成 26 年度日本結晶学会、 2014 年 11 月 1 日～3 日、東京大学農学部（東京都文京区）

6 <u>大利　徹</u>、ペプチドライゲースとリボソームによる協同的なペプチド新奇生合成機構の解明、第 34 回　富山大学和漢医薬学総合研究所特別セミナー、2014 年 10 月 25 日、富山国際会議場（富山県富山市）

7 野池基義、松井 崇、雄谷洸一、佐々木郁雄、丸山千登勢、濱野吉十、石川　淳、佐藤康治、伊藤　肇、森田洋行、<u>大利　徹</u>、第 56 回天然有機化合物討論会、2014 年 10 月 15 日～17 日、高知県立県民文化ホール（高知県高知市）

8 <u>大利　徹</u>、ペプチドライゲースとリボソームによる協同的なペプチド新奇生合成機構の解明、公益社団法人 日本農芸化学会 中部支部第 168 回 例会、2014 年 10 月 12 日、名古屋大学シンポジオン（愛知県名古屋市）

9 野池基義、松井 崇、佐藤康治、森田洋行、<u>大利　徹</u>、放線菌に見いだされた新規ペプチドライゲースは幅広い基質特異性を持つ、2014 年度（第 29 回）日本

放線菌学会大会、2014 年 6 月 19 日～20 日、つくばカピオ（茨城県つくば市）

10　野池 基義、雄谷 洸一、佐々木 郁雄、丸山 千登勢、石川 淳、佐藤 康治、濱野 吉十、伊藤 肇、大利 徹、ペプチドライゲースとリボソームとの協同によるペプチド新奇生合成機構の解明、日本農芸化学会大会、2014 年 3 月 27 日～30 日、明治大学（神奈川県川崎市）

11　大利 徹、放線菌に見出した新規ペプチドライゲース、2013 年度（第 28 回）日本放線菌学会大会、2013 年 9 月 5 日～6 日、メルパルク広島（広島県広島市）

〔その他〕
ホームページ等

http://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/tre/

６．研究組織
(1)研究代表者
大利　徹（DAIRI TOHRU）
北海道大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：70264679