

平成30年6月7日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03110

研究課題名(和文) シュードトリペプチド新規形成機構の解明と応用

研究課題名(英文) Biosynthesis of the Carbonylmethylene Structure Found in a Class of Pseudotripeptides, Ketomemicins

研究代表者

大利 徹 (Dairi, Tohru)

北海道大学・工学研究院・教授

研究者番号：70264679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：当研究室で見出した、シュードトリペプチド(ケトメミシン)が持つカルボニルメチレン構造の生合成機構の解明を行った。ケトメミシン生合成遺伝子クラスターに存在する4つの遺伝子の関与が考えられたため組換え酵素を用いて検討した。その結果、アルドラーゼがマロニルCoAとフェニルピルビン酸からベンジルリンゴ酸CoAの生成を触媒し、次いで脱水酵素によりベンジルマロニルCoAへと変換され、ピリドキサルリン酸依存酵素であるグリシン-C-アセチルトランスフェラーゼが2回目の炭素-炭素結合形成を触媒し、最後に還元酵素により二重結合が還元されカルボニルメチレン構造を持つシュードジペプチドが生成することを証明した。

研究成果の概要(英文)：We recently discovered novel pseudotripeptides, ketomemicins, which possess a C-terminal pseudodipeptide connected with a carbonyl methylene instead of an amide bond. The carbonyl methylene structure is stable than amide bond and its biological significance has been shown in several natural and synthetic compounds. Despite the biological significances of these compounds, little is known about its biosynthetic machinery. We therefore examined it by in vitro studies with recombinant enzymes. Consequently, an aldolase, dehydratase, PLP-dependent glycine-C-acetyltransferase, and dehydrogenase were revealed to be involved in the formation of the pseudodipeptide with malonyl-CoA and phenylpyruvate as starter substrates.

研究分野：生合成工学

キーワード：放線菌 ATP-grasp ligase シュードトリペプチド カルボニルメチレン構造 生合成

1. 研究開始当初の背景

多様な構造を持つペプチド系天然物の生合成では、RiPPS と総称されるリボソーム関与 (*Nat. Prod. Rep.*, **30**, 108, 2013) や NRPS (*Nat. Prod. Rep.*, **26**, 987, 2009) に代表されるリボソーム非関与の生合成機構が用いられる。後者では、非タンパク性のアミノ酸の利用が可能であり、さらに様々なモジュールによる多様な修飾も可能である。しかし、生合成遺伝子が巨大であるため人工的な改変は困難である。他方、技術的に改変が容易なリボソームを利用した系でも多様な骨格が構築可能であることが polytheonamides の生合成や (*Science*, **338**, 387, 2012)、東大・菅らのフレキシザイムを用いた系で示された (*Annu. Rev. Biochem.*, **83**, 727, 2014)。

筆者は、これらと異なる機構として、フェガノマイシンの生合成研究を通じて、ペプチドリガーゼとリボソームによる新規なペプチド骨格形成機構を見出した。この生合成でカギとなる新規ペプチドリガーゼは、ATP-grasp モチーフを持ち、ATP を用いて多様な化合物のカルボン酸をリン酸化し、種々の配列や長さからなるペプチドを求核剤に用いてアミドの形成を触媒した (*Nat. Chem. Biol.*, **11**, 71, 2015)。この幅広い基質認識機構を明らかにするため、結晶構造を解いた結果、全体的には、本酵素が属する ATP-grasp モチーフを持つ酵素群と同様の構造を有していたが、他に見られない巨大な cavity と cleft を持つことが判明した。

本酵素のオーソログ (相同遺伝子) をゲノムデータベースに探索した結果、放線菌を中心に多くの微生物に分布し、何れも個々のクラスターに固有な遺伝子群 (合計 6 遺伝子) とクラスターを成していた。これら遺伝子群の機能を解明するため、オーソログを含む推定生合成遺伝子クラスターを *Streptomyces lividans* を宿主に用いて異種宿主発現させた結果、カルボニルメチレン構造を持つシュードトリペプチド (ケトメミシンと命名) が生産された。

2. 研究の目的

これまでシュードペプチドの生合成機構に関する報告は無いことから、ケトメミシン生合成遺伝子を用いて全容解明を試みた。

3. 研究の方法

ケトメミシン生合成遺伝子クラスターに存在する 6 つの遺伝子の組換え酵素を用いて in vitro 実験を行った。

4. 研究成果

ケトメミシン生合成遺伝子クラスターに存在する 6 つの遺伝子のうち、ペプチドリ

ガーゼとアミジノ基転移酵素については組換え酵素を用い詳細な酵素学的諸性質を明らかにした。また本結果から、ペプチドリガーゼとアミジノ基転移酵素遺伝子以外の 4 つの遺伝子がカルボニルメチレン構造の形成に関与すると予想されたことから組換え酵素を用いて解析を行い、シュードトリペプチド (ケトメミシン) の生合成は以下の 4 つの酵素が関与することを明らかとした。アルドラーゼ (KtmA); マロニル CoA とフェニルピルビン酸からのベンジルリンゴ酸 CoA の生成、デヒドラターゼ (KtmC); 脱水反応によるベンジルフマル酸 CoA の生成、 α -オキソアミンシターゼ (KtmB); 2 回目の炭素-炭素結合形成反応、リダクターゼ (KtmF); 二重結合の還元。

また、これら 4 つの酵素のオーソログをゲノムデータベースに探索した結果、4 つの遺伝子全てを持つクラスターに加え、ktmF は持たないが、ktmA-C とオルニチンシクロデアミナーゼの 4 つの遺伝子を共通に持つ遺伝子群を幾つかの微生物に見出した。これら遺伝子群が関与する代謝産物を明らかにするため、4 株の放線菌 *Salinispora tropica*、*Streptomyces griseus*、*Streptomyces afghaniensis* 及び *Streptomyces sclerotialus* 由来の推定生合成遺伝子群を近縁の *Streptomyces lividans* で異種宿主発現し、特異的に生産される化合物を HPLC で分析した。その結果、*S. sclerotialus* 由来の遺伝子群が関与する特異的な代謝産物を 1 つ確認した。今後の構造解析が待たれる。

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 9 件)

1. Y. Ogasawara and T. Dairi, Peptide d Epimerization Machineries Found in Microorganisms. *Front. Microbiol.*, **9**, 156 (2018). DOI: 10.3389/fmicb.2018.00156
査読有
2. 小笠原泰志, 大川 徹, 放線菌が生み出した疑似ペプチド化合物-疑似ペプチド (ケトメミシン) がもつカルボニルメチレンの生合成を解明-, *化学と生物*, **56**, 76-78 (2018). DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.56.76
査読有
3. Y. Ogasawara and T. Dairi, Biosynthesis of Oligopeptides using ATP-grasp Enzymes. *Chem. Eur. J.*, **23**, 10714-10724 (2017). DOI: 10.1002/chem.201700674
査読有
4. J. Kawata, T. Naoe, Y. Ogasawara, and T. Dairi, Biosynthesis of the Carbonylmethylene Structure Found in the Ketomemycin Class of Pseudotripeptides. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **56**, 2026-2029

(2017). DOI: 10.1002/anie.201611005

査読有

5. 小笠原泰志, 大利 徹, ペプチド結合を触媒する新たな酵素, ペプチド医薬品のスクリーニング・安定化・製剤化技術(技術情報協会), 第3章 第2節(2017) ISBN: 978-4-86104-687-2 C3047 査読無
6. Y. Ogasawara, M. Fujimori, J. Kawata, and T. Dairi, Characterization of three amidinotransferases involved in the biosynthesis of ketomemicins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **26**, 3662-3664 (2016). DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.05.090 査読有
7. Y. Ogasawara, J. Kawata, M. Noike, Y. Satoh, K. Furihata, and T. Dairi, Exploring Peptide Ligase Orthologs in Actinobacteria—Discovery of Pseudopeptide Natural Products, Ketomemicins. *ACS Chem. Biol.*, **11**, 1686-1692 (2016). DOI: 10.1021/acscchembio.6b00046 査読有
8. Y. Ogasawara, K. Ooya, M. Fujimori, M. Noike, and T. Dairi, Structure and activity relationship of anti-Mycobacterium antibiotics, resorcinomycin and pheganomycin. *J. Antibiot.*, **69**, 119-120 (2016). DOI: 10.1038/ja.2015.88 査読有
9. K. Ooya, Y. Ogasawara, M. Noike, and T. Dairi, Identification and analysis of the resorcinomycin biosynthetic gene cluster. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **79**, 1833-1837 (2015). DOI: 10.1080/09168451.2015.1050992 査読有

〔学会発表〕(計 18 件)

1. 大利 徹, カルボニルメチレン構造を有するシュードトリペプチド (Ketomemicin) の生合成機構, 2018 年度日本農芸化学会大会シンポジウム, 2017 年 3 月 18 日, 名城大学 (愛知県名古屋市中)
2. 直江 大樹, 川田 純平, 小笠原 泰志, 大利 徹, ケトメミシンにみられるカルボニルメチレン型シュードペプチドの生合成, 科研費新学術領域「生合成リデザイン第 1 回若手シンポジウム, 2017 年 8 月 26-27 日, 草津セミナーハウス (群馬県草津町)
3. Y. Ogasawara, J. Kawata, T. Naoe, M. Fujimori, M. Noike and T. Dairi, Exploring Novel Peptide Ligase Orthologs – Discovery and Biosynthetic Studies of Carbonylmethylene-Containing

Pseudotriptides Ketomemicins, Directing Biosynthesis V, March 22-24th, 2017, Warwick University, Warwick (United Kingdom)

4. 小笠原 泰志, 藤盛 道子, 川田 純平, 大利 徹, ケトメミシンの生合成に関わるアミジノ基転移酵素の機能解析, 2017 年度日本農芸化学会大会, 2017 年 3 月 18 日, 京都女子大学 (京都府京都市)
5. Y. Ogasawara, J. Kawata, T. Naoe, M. Fujimori, and T. Dairi, Biosynthesis of the Carbonylmethylene Containing Pseudopeptides, Ketomemicins. US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products for Young Researchers, March 4-5th, 2017, 東京工業大学 (東京都目黒区)
6. Y. Ogasawara, J. Kawata, and T. Dairi, New enzymes for biosynthesis of ketomemicin, a pseudotriptide with carbonylmethylene structure. 5th International Conference on Novel Enzymes, October 11-14th, 2016, Hampshire Hotel-Plaza Groningen, Groningen (Netherlands)
7. 小笠原 泰志, 川田 純平, 野池 基義, 藤盛 道子, 佐藤 康治, 降旗 一夫, 大利 徹, カルボニルメチレン構造を持つシュードトリペプチド (ケトメミシン) の発見と酵素的全合成, 第 58 回天然有機化合物討論会, 平成 28 年 9 月 16 日, 東北大学 (宮城県仙台市)
8. 川田 純平, 直江 大樹, 小笠原 泰志, 大利 徹, ケトメミシンにみられるシュードペプチド部の生合成解析, 2016 年度日本放線菌学会大会, 平成 28 年 9 月 8 日, 東京大学 (東京都文京区)
9. Y. Ogasawara, J. Kawata, M. Noike, Y. Satoh, K. Furihata, and T. Dairi, Exploring peptide ligase orthologs in actinobacteria. The Fifth International Conference on Cofactors (ICC-05) and Active Enzyme Molecule 2016 (AEM 2016), September 4-8th, 2016, 黒部宇奈月国際ホール (富山県黒部市)
10. 小笠原 泰志, 藤盛 道子, 雄谷 洸一, 野池 基義, 大利 徹, フェガノマイシン, レゾルシノマイシン類抗生物質の構造活性相関, 2016 年度日本農芸化学会大会, 平成 28 年 3 月 27 日-30 日, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
11. T. Dairi, Peptide synthesis cooperatively achieved by peptide ligase and ribosomes,

Pacificchem 2015, December 19th, 2015,
Sheraton Waikiki, Honolulu (USA)

12. 大 利 徹, 放線菌の新規ペプチドリガーゼ、第 88 回日本生化学会大会シンポジウム、2015 年 12 月 1 日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
13. 重松 真由子, 小笠原 泰志, 大 利 徹, 放線菌に見いだされた新規ペプチドライゲースオルソログの機能解析、2015 年度日本農芸化学会北海道支部大会、2015 年 11 月 14 日、北海道大学 (北海道札幌市)
14. 直江 大樹, 小笠原 泰志, 大 利 徹, 放線菌に見いだされた新規ペプチドライゲースオルソログの機能解析、2015 年度日本農芸化学会北海道支部大会、2015 年 11 月 14 日、北海道大学 (北海道札幌市)
15. 大 利 徹, 放線菌に見出した ATP-grasp-ligase が触媒する多様なアミド形成反応、第 67 回日本生物工学会大会シンポジウム、2015 年 10 月 26 日~28 日、城山観光ホテル (鹿児島県鹿児島市)
16. T. Dairi, A novel enzyme capping *N*-terminus of various peptides with amidino-PheGly derivatives. 2nd European Conference on Natural Products, September 6-9th, 2015, Goethe-Universität, Frankfurt/Main (Germany)
17. Y. Ogasawara, J. Kawata, M. Noike, K. Furihata and T. Dairi, Exploring Novel Peptide Ligase Orthologs in Actinobacteria. 2nd European Conference on Natural Products, September 6-9th, 2015, Goethe-Universität, Frankfurt/Main (Germany)
18. T. Dairi, A novel enzyme capping *N*-terminus of various peptides with amidino-PheGly derivatives, 42nd International Symposium & Annual Meeting (The Korean Society for Microbiology and Biotechnology), June 25th, 2015, Gyeongju Hwabaek International Convention Center, Gyeongju (Republic of Korea)

〔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

(2)研究分担者

濱野 吉十 (HAMANO YOSHIMITSU)
福井県立大学・生物資源学部・教授
研究者番号：50372834

(3)連携研究者

佐藤 康治 (SATO YASUHARU)
北海道大学・大学院工学研究院・助教
研究者番号：30360928

小笠原泰志 (OGASAWARA YASUSHI)
北海道大学・大学院工学研究院・助教
研究者番号：20732986

森田 洋行 (MORITA HIROYUKI)
富山大学・和漢医薬学総合研究所・教授
研究者番号：20416663