

平成 30 年 4 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18692

研究課題名(和文) ペプチドライゲースオルソログの機能解析

研究課題名(英文) Exploring and functional analysis of peptide ligase orthologs

研究代表者

小笠原 泰志 (Ogasawara, Yasushi)

北海道大学・工学研究院・助教

研究者番号：20732986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新規アミド結合形成酵素(ペプチドライゲース, PGM1)の相同遺伝子について解析を行った。Micromonospora属放線菌の相同遺伝子(KtmD)が、新規シュードペプチドとして単離したケトメミシンの生合成中のアミド結合に関わることを明らかにした。ケトメミシンのメチレンケトン部の生合成について、アルドラーゼ(KtmA)、脱水酵素(KtmC)、PLP依存-オキソアミン合成酵素(KtmB)、還元酵素(KtmF)の関与で生合成されることを明らかにした。
その他の相同遺伝子についても周辺の遺伝子クラスターと共に異種宿主発現し、特異的に生産された代謝産物をいくつか確認した。

研究成果の概要(英文)：We previously identified a novel amide bond forming enzyme (peptide ligase, PGM1) responsible for the biosynthesis of peptide antibiotic, pheganomycin. In this study, we studied PGM1 orthologs found in actinobacteria. We first analyzed a ortholog (KtmD) responsible for the biosynthesis of previously discovered novel pseudotriptides, ketomemcins, which possess a C-terminal pseudodipeptide connected with a carbonylmethylene instead of an amide bond. We showed that KtmD was a novel dipeptide ligase catalyzing amide bond formation between amidino-arginine and pseudodipeptides in the final step of biosynthesis. We next examined the biosynthesis of pseudodipeptide structure in ketomemcins and fully characterized the biosynthetic pathway of the pseudodipeptide in vitro. Furthermore, we investigated other orthologs to probe the functions of these genes. We heterologously expressed ortholog-containing gene clusters in Streptomyces lividans and detected several specific metabolites.

研究分野：天然物化学

キーワード：ペプチドリガーゼ 酵素 アミド結合 天然物 疑似ペプチド 生合成 放線菌 二次代謝

1. 研究開始当初の背景

微生物や植物が生み出す二次代謝産物は新しい生理活性物質の発見の重要な源であり、それらの生合成に関わる酵素の解析は、新規酵素反応の発見や、その応用の基盤となることから重要である。当研究室では最近、ペプチド系抗生物質であるフェガノマイシンの生合成研究において、新奇なペプチドライゲース(PGM1)を発見した。(Noike et al Nat. Chem. Biol. 2015, 11, 71.) PGM1はアミジノフェニルグリシンのカルボン酸をアデノシン三リン酸(ATP)存在下でリン酸無水物へと活性化し、ここにリボソームによって生合成されたペプチドのN末端が求核攻撃することでアミド結合形成の反応を触媒する。これはATP-grasp型のアミド結合形成反応でペプチドを求核剤として用いる初めての例である。興味深いことに、PGM1は求核剤基質の認識が非常に緩く、様々なペプチドが基質として受容できるが、これは本酵素がN末端修飾酵素として応用可能であることを示唆するものである。そこで、ペプチドライゲースの一般性や多様性に興味を持ち、PGM1相同遺伝子(オルソログ)について解析を行った。ゲノムデータベースを探索したところ、放線菌を中心に様々な微生物からPGM1の相同遺伝子が見つかった。また、その多くは周辺の他の遺伝子群とクラスターをなしており、それらが二次代謝産物の生合成に関与することが予想された。見出した遺伝子クラスターうち、3つの放線菌, *Micromonospora* sp., *Salinispora tropica*, および *Streptomyces mobaraensis* に見出された遺伝子クラスターは互いに類似しており、6つの遺伝子をすべて共通に有する特徴を持つことから、各クラスターの異種宿主発現実験により代謝産物の解析を行い、新規シュードペプチド天然物ケトメミシン類を見出した。ケトメミシン類は通常のパペチド結合がカルボニルメチレン構造に置き換わったシュードジペプチド構造を有しており、そのN末にアミジノアミノ酸がアミド結合したシュードトリペプチドであった。

2. 研究の目的

ケトメミシン生合成遺伝子クラスター中のPGM1相同遺伝子であるKtmDは、ケトメミシン生合成の最終段階で、アミド結合形成反応を触媒すると考えられたため、その実証を行う。また、カルボニルメチレン型の擬似ペプチドの生合成は未解明である。そこで、ケトメミシンの擬似ペプチド部の生合成について、組換え酵素を用いた実験で全容を明らかにする。

その他のPGM1の相同遺伝子について、周辺に見出した遺伝子クラスターと共に異種宿主し、特異的に得られる代謝産物を分析、得られた産物の構造を明らかにする。また、

相同遺伝子の機能解明も行う。

3. 研究の方法

ケトメミシンの遺伝子クラスター中のペプチドライゲースの相同遺伝子および、その他の生合成遺伝子について、大腸菌を用いて組み換えタンパク質を発現、精製し、*in vitro*での酵素反応の検討を行った。

相同遺伝子を含む遺伝子クラスターを近縁の放線菌で異種宿主発現し、HPLCやLC-MSによる代謝産物の分析、NMR等による構造決定を行った。

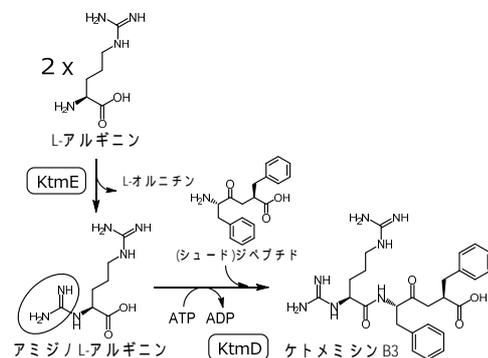
4. 研究成果

(1) PGM1の相同遺伝子であるKtmDがケトメミシン生合成の最終段階で、アミジノ-L-アルギニンとシュードジペプチド間のアミド結合形成反応を触媒することを*in vitro*解析により明らかとした。また、KtmDの基質認識についても検討を行い、本酵素がC末基質としては通常のジペプチドも認識できる(シュード)ジペプチドライゲースであることが明らかにした。

(2) ケトメミシン類の構造について、これまでは平面構造のみ明らかになっていた。KtmDのN末、C末基質で可能性のあるすべての立体化学のものを有機合成で調製し、KtmDの酵素反応を行った。また生成物を天然のケトメミシンと比較することで、ケトメミシンBの絶対立体配置を決定した。

(3) KtmDは、C末基質として(シュード)ジペプチドを認識できる点でPGM1とは異なり、これは、ペプチドライゲースに多様性があることを示している。

(4) ケトメミシンの生合成中、N末基質のアミジノ-L-アルギニンが2分子のL-アルギニンからアミジノ基転移酵素(KtmE)によって生成されることを*in vitro*で確認した。



(5) これまで報告がなかったカルボニルメチレン型のシュードジペプチドの生合成について、ケトメミシン遺伝子クラスターの6つの遺伝子の内の残りの4つの遺伝子が関

与すると予想し、これを組換え酵素を用いて検証した。

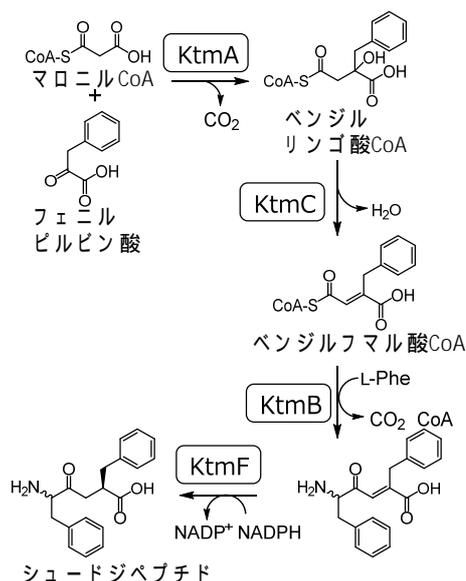
(6) 初発反応を担うと考えた KtmA はクエン酸の分解に関わる乳酸菌のクエン酸リアーゼと相同性を有しており、当初アセチル CoA とフェニルピルビン酸からベンジルリンゴ酸 CoA が生成すると予想し酵素反応を行ったが反応は進行しなかった。しかし、アセチル CoA の代わりにマロニル CoA を用いた場合には反応が進行し、ベンジルリンゴ酸 CoA の生成が確認できた。また、本酵素について速度論的定数や金属要求性を明らかとした。

(7) 脱水酵素 (KtmC) を KtmA の生成物と反応させたところ、ベンジルフマル酸 CoA へと変換されることを LC-MS で確認した。

(8) PLP 依存酵素である α -オキソアミン合成酵素 (KtmB) がベンジルフマル酸 CoA と L-フェニルアラニン間の炭素-炭素結合形成と続く脱炭酸反応を触媒することを、*in vitro* での反応解析で解明した。

(9) 最後に KtmB 生成物の二重結合が還元酵素 (KtmF) により還元されシュードジペプチドが生成することを明らかにした。また、KtmF は補酵素として NADPH と NADH のいずれも受容できることを示した。

(10) 本経路では炭素-炭素結合形成を行う 2 つの酵素がシュードジペプチドの構成アミノ酸残基を決定しており、KtmA が C 末側のアミノ酸基質を、KtmB が N 末側基質の認識と選択している。



(11) ペプチドライゲースのオルソログを含む遺伝子クラスターの中で、遺伝子クラスターに含まれる遺伝子がユニークであった

遺伝子クラスターを 10 菌株選択し、それぞれ遺伝子を異種宿主に導入し、得られた生成物を HPLC で分析した。その内のいくつかについては宿主に存在しない代謝産物のピークを見いだした。

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 5 件)

Yasushi Ogasawara and Tohru Dairi, Peptide Epimerization Machineries Found in Microorganisms. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*:156.

doi: 10.3389/fmicb.2018.00156

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(ケトメシミン)がもつカルボニルメチレンの合成を解明～、*化学と生物*, **2017**, *56*, 76-78. doi: 10.1271/kagakutoseibutsu.56.76

Yasushi Ogasawara and Tohru Dairi, Biosynthesis of Oligopeptides using ATP-grasp Enzymes. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 10714-24.

doi: 10.1002/chem.201700674

Junpei Kawata, Taiki Naoe, Yasushi Ogasawara, and Tohru Dairi, Biosynthesis of the Carbonylmethylene Structure Found in the Ketomemycin Class of Pseudotripeptides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 2026-9.

doi: 10.1002/anie.201611005

Yasushi Ogasawara, Michiko Fujimori, Junpei Kawata, and Tohru Dairi, Characterization of three amidinotransferases involved in the biosynthesis of ketomemycins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 3662-4.

doi: 10.1016/j.bmcl.2016.05.090

[学会発表](計 11 件)

小笠原 泰志、ペプチドの構造に多様性を与える新規酵素の探索、日本農芸化学会、名古屋、2018 年 3 月 15 日 (農芸化学会奨励賞受賞講演)

重松 真由子、小笠原 泰志、大川 徹、ポリグルタミン酸合成の解析、日本農芸化学会、名古屋、2018 年 3 月 15-18 日

竹田 薫平、見目 晃平、佐藤 康治、小笠原 泰志、新家 一男、大利 徹、ペプチド系天然化合物 JBIR-78 および JBIR95 の生合成研究、第 59 回 天然有機化合物討論会、わくわくホリデーホール、札幌、2017 年 9 月 20-22 日

直江 大樹、川田 順平、小笠原 泰志、大利 徹、ケトメシニ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、生合成リデザイン第一回若手セミナー、草津、2017 年 8 月 26-27 日

Yasushi Ogasawara, Junpei Kawata, Taiki Naoe, Michiko Fujimori, and Tohru Dairi, Exploring novel peptide ligase orthologs-Discovery and biosynthetic studies of carbonylmethylene-containing pseudotriptides ketomemcins, Directing Biosynthesis V, Warwick University, Warwick, UK, 2017 年 3 月 22-24 日

藤村 祐子、小笠原 泰志、大利 徹、放線菌に見出されたペプチドリガーゼオルソログの機能解析、2017 年度日本農芸化学会大会、京都女子大学、2017 年 3 月 17-20 日

小笠原 泰志、藤盛 道子、川田 純平、大利 徹、ケトメシニ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、京都女子大学、2017 年 3 月 17-20 日

Yasushi Ogasawara, Junpei Kawata, Taiki Naoe, Michiko Fujimori, and Tohru Dairi, Biosynthesis of the Carbonylmethylene Containing Pseudopeptides, Ketomemcins, 2nd US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products For Young Researchers, Tokyo Institute of Technology, Tokyo, Japan, 2017 年 3 月 4-5 日

藤村 祐子、小笠原 泰志、大利 徹、放線菌に見出された新規ペプチドライゲースオルソログの機能解析、平成 28 年度 日本農芸化学会 北海道支部第 2 回講演会、北海道大学農学部 4F 大講堂、2016 年 11 月 23 日

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(ケトメシニン)の発見と酵素的全合成、第 58 回 天然有機化合物討論会、東北大学百周年記念会館 川内萩ホール、2016 年 9 月 14 日-16 日

川田 純平、直江 大樹、小笠原 泰志、大利 徹、ケトメシニ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、東京大学農学部弥生講堂、2016

年 9 月 8-9 日

〔図書〕(計 1 件)
小笠原 泰志 他(計 110 名) 技術情報協会、ペプチド医薬品のスクリーニング・安定化・製剤化技術、2017 年 12 月 27 日、557 ページ (第 3 章-2 節)
http://www.gijutu.co.jp/doc/b_1925.htm

〔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
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