

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16390

研究課題名(和文) PBP type-TEのペプチド環化触媒能の解明と環状ペプチドの多様性拡張

研究課題名(英文) Characterization of peptide cyclization mediated by penicillin-binding protein-type thioesterases and its protein engineering

研究代表者

松田 研一 (Matsuda, Kenichi)

北海道大学・薬学研究院・講師

研究者番号：50812301

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)：放線菌の産生する非リボソームマクロラクタムの生合成に関わる新規環化酵素SurEを解析し、基質選択性を明らかにするとともにその構造基盤を解明した。SurEと2つのホモログ酵素との生化学的・構造的に比較し、基質選択性の違いを生み出す構造を明らかにした。得られた知見に基づき酵素の基質選択性の論理的な改変に成功した。さらに、酵素基質の合成スキームを検討し、高効率な合成法を確立した。本手法と酵素的環化反応を連続的に行うことで、環状ペプチドのシームレスな化学酵素合成が可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペプチドの環化反応は、代謝安定性や標的特異性が向上する創薬上重要な修飾反応である。一方で、有機合成的な環化反応は、多量の廃棄物や分離困難な副生成物を生じる問題を抱えている。本研究では、独自に発見した新規ペプチド環化酵素の触媒利用を目指し、この有用酵素ファミリーに関する基礎的知見を数多く獲得した。得られた知見は、有機合成的手法の課題を克服した環境調和性の高いペプチド環化反応の実現に向けた基盤となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：SurE, a novel peptide cyclase involved in the biosynthesis of nonribosomal macrolactams produced by actinomycetes, was analyzed to elucidate its substrate selectivity and its structural basis; biochemical and structural comparison between SurE and two homologous enzymes was performed to clarify the structure that generates differences in substrate selectivity. Based on the findings obtained, we succeeded in logically modifying the substrate selectivity of the enzyme. Furthermore, we investigated the synthesis scheme of the enzyme substrate and established a highly efficient synthetic method. The modified solid phase peptide synthesis combined with sequential enzymatic cyclization realized seamless chemoenzymatic synthesis of cyclic peptides.

研究分野：天然物化学

キーワード：環状ペプチド 生合成 非リボソームペプチド 環化酵素 生体触媒 酵素工学 放線菌

1. 研究開始当初の背景

免疫抑制剤シクロスポリンや抗 MRSA 抗菌薬ダプトマイシンに代表される天然由来の環状ペプチドは、多くの生物活性物質を含む重要な医薬資源である。ペプチドは大環状化することで剛直な構造をとり、作用標的特異性、膜透過性、分解酵素への耐性が向上する。このため、ペプチドの大環状形成反応は生物活性を示すペプチドの化学合成において非常に重要なステップである。しかし、有機化学的合成手法の発展した現代においても本ステップは克服すべき課題を抱えており、その例として、位置選択的な環化のために煩雑な保護・脱保護のステップが必要な点や、縮合剤の使用により C 末端アミノ酸残基の α 炭素が異性化する点、さらには高濃度での反応では分子内環化反応よりも分子間反応が優先してしまう点などが挙げられる。一方、天然物の生合成では、各ペプチドに特化したペプチド環化酵素が、保護基を用いることなく位置選択的な環化を効率よく触媒する (図 1)。このため、基質特異性の寛容なペプチド環化酵素は、ペプチド環化触媒としての応用が期待される。リボソーム由来するペプチドに作用する環化酵素はこれまでに微細藻類や植物などから endopeptidase 型の環化酵素がいくつか報告されており、幅広い基質特異性を有することが示されている。一方、リボソーム由来ペプチドに比べ複雑な異常アミノ酸を多く含む非リボソーム経路に由来するペプチドの環化酵素の例は乏しく、非リボソーム型ペプチド合成酵素 NRPS の C 末端に位置するチオエステラーゼ (TE) ドメインが知られるのみであった。

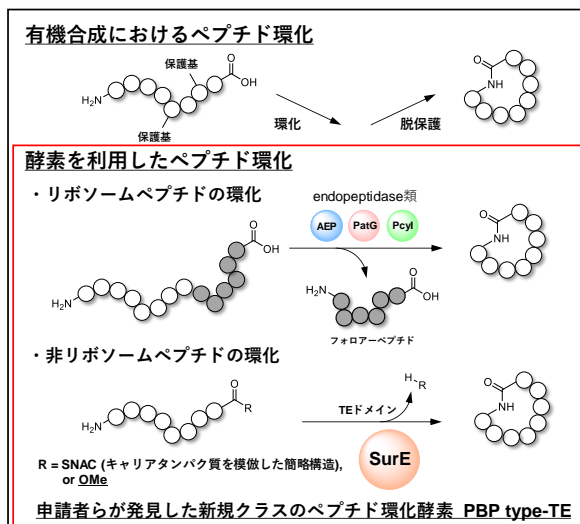


図 1. ペプチドの大環状化反応

そのような中、申請者らは最近、海洋放線菌に由来する非リボソームペプチド Surugamide 類の生合成に関わる新規ペプチド環化酵素 SurE を同定した (文献 1) (図 2)。一般的な非リボソームペプチドの生合成では、NRPS の C 末端に融合した TE ドメインによって、中間体の直鎖状ペプチドの大環状化が触媒されるのに対し、申請者の見出した SurE は NRPS から独立して存在する。SurE は通常の TE ドメインとは配列相同性を示さないことから、これを新しいタイプの TE ドメイン「PBP type TE」と名付けた。さらに化学合成した基質ペプチド類縁体を用いること

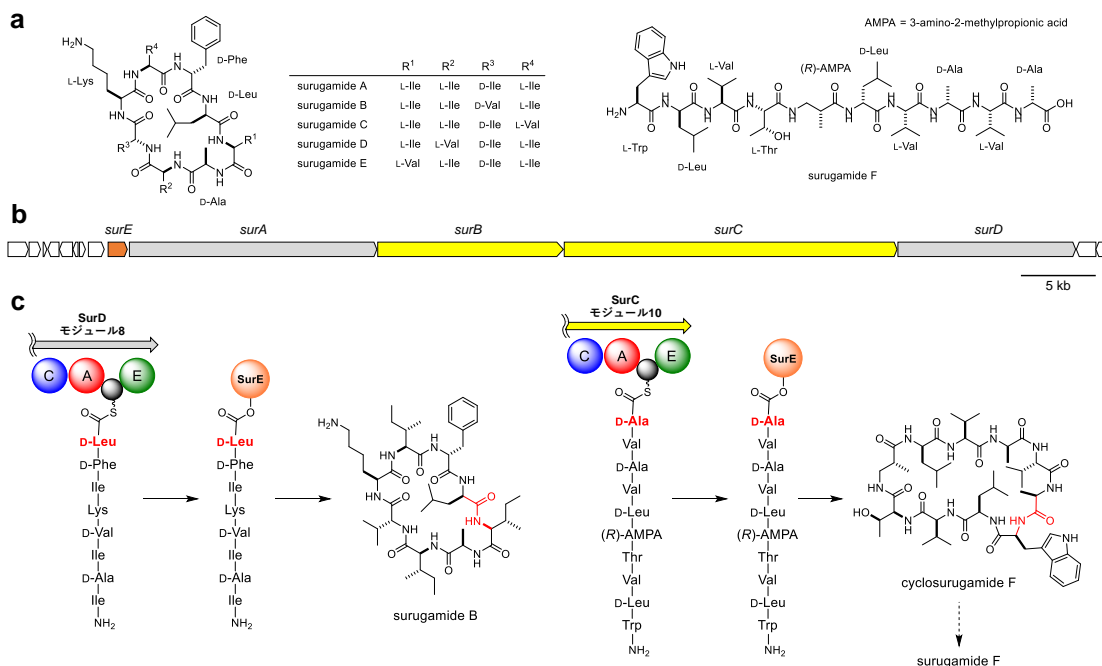


図 2. 非リボソームマクロラクタム surugamide とその生合成

a) surugamide 類の化学構造。 b) surugamide 類の生合成遺伝子クラスター。 c) surugamide 生合成におけるマクロラクタム化反応。反応は NRPS から独立したタンパク質 SurE によって触媒される。

体化学については、基質アナログを用いた検証から、L-アミノ酸に対して選択的であることが判明し、SurE はヘテロキラルな残基間 (N 末端の L-アミノ酸と C 末端の D-アミノ酸) でマクロラクタム化を触媒する特異な選択性を有することが明らかになった。

データベースを検索したところ、従来の *cis* 型の非リボソームペプチド環化ドメイン (TE ドメインと C_T ドメイン) によって生合成される head-to-tail 型のマクロラクタムにおいても、多くの場合でヘテロキラルな残基間でのカップリング反応が進行することが判明した。その一方、ヘテロキラルな残基の立体化学は SurE のそれとは逆転しており、N 末端の D-アミノ酸と C 末端の L-アミノ酸でマクロラクタム化が進行していた。このことから SurE をはじめとする PBP-type TE は、従来の環化ドメインでは環化できない残基間で環化を触媒し、立体化学の観点から環化点に多様性をもたらす生合成メカニズムであることが明らかになった。

SurE の結晶構造解析

SurE の特異な末端残基立体化学選択性の構造基盤を解明することを目指し、SurE の X-線結晶構造解析を、東京大学大学院薬学系研究科 阿部郁朗教授、森貴裕助教との共同研究により行った。その結果、SurE の apo 体の構造解析に成功した。SurE は、N 末端の触媒ドメインと C 末端のリボカリンドメインから構成される 2 ドメイン性のタンパク質であり、両ドメインの境界に位置するクレフトの底部に触媒残基が位置していた。得られた apo 体構造を基に、ペプチド-酵素複合体のモデル構造を作成し、ペプチド (C 末端を模倣した N-formyl-D-Leu) 部分の再安定配座を計算したところ、触媒残基近傍の疎水性ポケットに C 末端残基が格納される配座が得られた (図 4)。ペプチド部分を L-体にしたモデルの再安定配座では、このような格納は見られず、その安定化エネルギーは 30 kJ/mol 程度上昇していた。このため触媒残基近傍の疎水性ポケットが基質 C 末端の D-アミノ酸の認識に重要であることが示唆された (文献 3)。

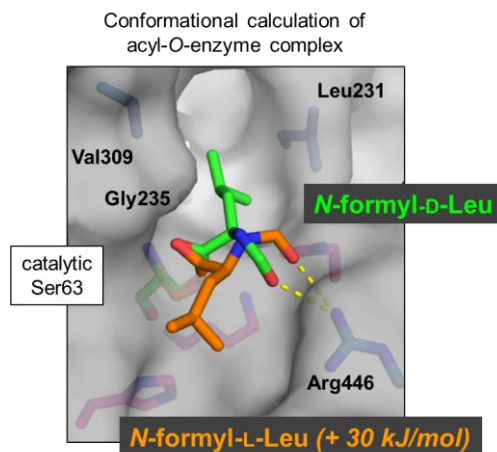


図 4. SurE のペプチド-酵素複合体モデルの安定配座

非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) の改変による非天然マクロラクタムの生物合成

SurE の寛容な基質選択性は生体内でも発揮されるため、この性質を利用し、NRPS の改変による非天然マクロラクタムの生物合成を試みた。デカペプチド生合成を担う NRPS-SurC の C 末端 2 残基の伸長を担う 2 モジュールを、終始コドンの挿入により破壊した。本形質転換体はデカペプチドの生産能を失う一方で、2 残基短縮した非天然マクロラクタムを新たに生産した。このことから、SurE は本来のペアではない PCP ドメインに担持された非天然基質を受け入れ、生体内で環化反応を触媒できることが明らかになった (文献 3)。

ホモログ酵素の探索

公共のゲノムデータベースを探索したところ、PBP-type TE の候補遺伝子が 700 個以上見出された。これらをアミノ酸配列の類似性に基づくネットワーク解析に供したところ、基質選択性に応じて 40 種類程度のクラスターに分類されることが分かった (図 5)。本解析により、新規性の高いホモログ酵素を効率的に開拓することが可能になった。そこで、各クラスターを代表するホモログ酵素を 10 種選び、それらのクローニングと異種発現を試みた。組換えタンパク質発現用プラスミドを作製し、大腸菌を宿主とした発現と Ni レジンによるアフィニティークロマトグラフィーによってリコンビナント酵素を精製した。その結果、10 個のホモログ酵素のうち 8 個が不溶性酵素として得られた。可溶性タンパク質として 2 つ得られた (Nsm16 と SurE14988)。さらに、2020 年に静岡大学の小谷らによって環状ペプチドである pentaminomycin 類が PBP-type TE によって生合成されていることが報告された。そこで、その環化を担う PenA を *Streptomyces cacaoi* NBRC 12748 よりクローニングし、大腸菌にて異種発現を試みた。その結果、可溶性タンパク質として得ることに成功した。

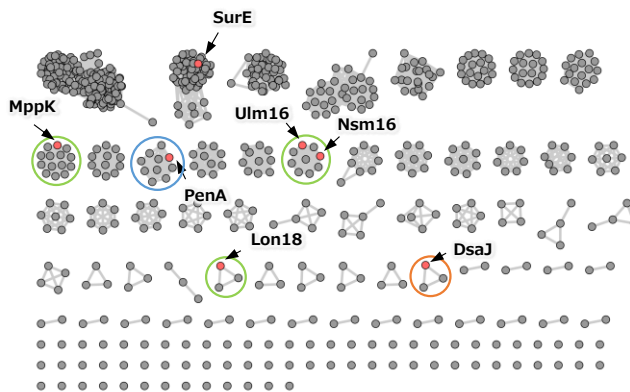


図 5. PBP-type TE のネットワーク解析

ホモログ酵素 PenA の機能解析

PenA は *Streptomyces cacaoi* が生産する環状ペプタペプチド pentaminomycin 類、BE-18257 類の生合成に参与する PBP-type TE である。PenA は、これまで詳細な機能解析がなされた SurE よりも環サイズの小さな環状ペプチドを与えるため、その詳細な基質特異性の検討を行なった。その結果、PenA は surugamide B の環化を触媒することができない一方で、短鎖基質に特化した酵素であることが明らかになった (図 6 c)。具体的には、SurE は 5~11 アミノ酸残基のペプチドを環化できる一方で、4 残基の基質に対しては、環化の他に基質の二量体化が進行した。それに対し PenA は、4~5 残基のペプチドの環化し、4 残基の基質に対しても二量体を生成することなく環化反応を選択的に触媒した (図 6 a,b)。また PenA のタンパク質モデル構造から、その特異な選択性に関与すると推測されるループ構造を見出した (文献 4)。

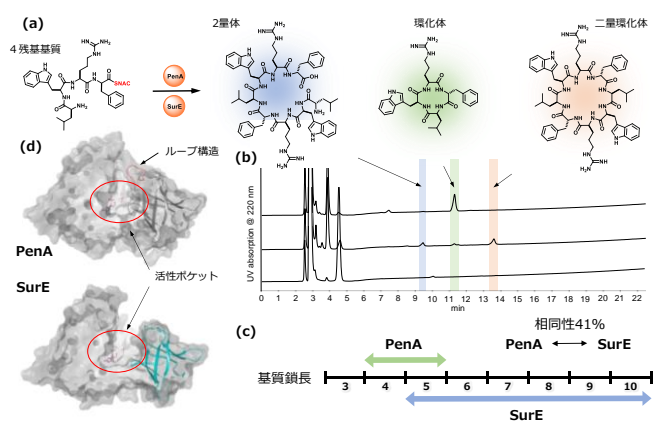


図 6. PenA の機能解析

- 文献 3. [Matsuda, K.](#), Zhai, R., Mori, T., Kobayashi, M., Sano, A., Abe, I., Wakimoto, T. Heterochiral coupling in nonribosomal peptide macrolactamization. *Nature Catalysis*, **3**, 507–515, (2020).
- 文献 4. [Matsuda, K.](#), Fujita, K., Wakimoto, T. PenA, a penicillin-binding protein-type thioesterase specialized for small peptide cyclization. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **48**, kuab023, (2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsuda Kenichi, Zhai Rui, Mori Takahiro, Kobayashi Masakazu, Sano Ayae, Abe Ikuro, Wakimoto Toshiyuki	4. 巻 3
2. 論文標題 Heterochiral coupling in non-ribosomal peptide macrolactamization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Catalysis	6. 最初と最後の頁 507 ~ 515
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41929-020-0456-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kuranaga Takefumi, Matsuda Kenichi, Takaoka Masachika, Tachikawa Chisato, Sano Ayae, Itoh Kosei, Enomoto Ayumu, Fujita Kei, Abe Ikuro, Wakimoto Toshiyuki	4. 巻 21
2. 論文標題 Total Synthesis and Structural Revision of Kasumigamide, and Identification of a New Analogue	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 3329 ~ 3332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.202000409	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Katsuyama Yohei, Matsuda Kenichi	4. 巻 59
2. 論文標題 Recent advance in the biosynthesis of nitrogen-nitrogen bond-containing natural products	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Opinion in Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 62 ~ 68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbpa.2020.05.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsuda Kenichi, Fujita Kei, Wakimoto Toshiyuki	4. 巻 kuab023
2. 論文標題 PenA, a penicillin-binding protein-type thioesterase specialized for small peptide cyclization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 kuab023
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jimb/kuab023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsuda Kenichi, Kuranaga Takefumi, Sano Ayae, Ninomiya Akihiro, Takada Kentaro, Wakimoto Toshiyuki	4. 巻 67
2. 論文標題 The Revised Structure of the Cyclic Octapeptide Surugamide A	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 476 ~ 480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c19-00002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuda Kenichi, Kobayashi Masakazu, Kuranaga Takefumi, Takada Kentaro, Ikeda Haruo, Matsunaga Shigeki, Wakimoto Toshiyuki	4. 巻 17
2. 論文標題 SurE is a trans-acting thioesterase cyclizing two distinct non-ribosomal peptides	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 1058 ~ 1061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8ob02867b	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuda Kenichi, Kuranaga Takefumi, Wakimoto Toshiyuki	4. 巻 77
2. 論文標題 A New Cyclase Family Catalyzing Head-to-Tail Macrolactamization of Non-ribosomal Peptides	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan	6. 最初と最後の頁 1106 ~ 1115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5059/yukigoseikyokaishi.77.1106	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松田研一, 脇本敏幸	4. 巻 77
2. 論文標題 バクテリアが有する新たな非リボソームペプチド環化酵素	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 306 ~ 307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松田 研一、倉永 健史、脇本 敏幸	4. 巻 55
2. 論文標題 ペニシリン結合タンパク質によるペプチド環化	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 650 ~ 654
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14894/faruawpsj.55.7_650	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuda Kenichi、Fujita Kei、Wakimoto Toshiyuki	4. 巻 48
2. 論文標題 PenA, a penicillin-binding protein-type thioesterase specialized for small peptide cyclization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jimb/kuab023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Phan Chin-Soon、Matsuda Kenichi、Balloo Nandani、Fujita Kei、Wakimoto Toshiyuki、Okino Tatsufumi	4. 巻 143
2. 論文標題 Argicyclamides A?C Unveil Enzymatic Basis for Guanidine Bis-prenylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 10083 ~ 10087
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c05732	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jomori Takahiro、Matsuda Kenichi、Egami Yoko、Abe Ikuro、Takai Akira、Wakimoto Toshiyuki	4. 巻 2
2. 論文標題 Insights into phosphatase-activated chemical defense in a marine sponge holobiont	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RSC Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1600 ~ 1607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1CB00163A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 10件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Matsuda, K., Wakimoto.
2. 発表標題 A new off-loading cyclase in non-ribosomal peptide biosynthesis.
3. 学会等名 2nd German-Japanese Symposium on Natural Product Biosynthesis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 2. 松田研一, Rui Zhai, 森貴裕, 小林雅和, 田地川千里, 藤田慧, 佐野文映, 阿部郁朗, 脇本敏幸
2. 発表標題 非リボソームペプチド環化酵素 PBP-type TE の機能解析と応用
3. 学会等名 第62回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松田研一, 秋山智子, 有馬陸, 脇本敏幸
2. 発表標題 ゲノムマイニングによるactinopyridazinoneの発見とその生合成に関する研究
3. 学会等名 第141回日本薬学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林雅和, 山田惟人, 田地川千里, 松田研一, 脇本敏幸
2. 発表標題 PBP型チオエステラーゼNsm16によるペプチドライゲーション反応
3. 学会等名 第141回日本薬学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐伯梨緒, 吉村彩, 松田研一, 脇本敏幸
2. 発表標題 細菌が放出する細胞外小胞を利用した休眠遺伝子活性化と新規天然物探索
3. 学会等名 第141回日本薬学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田慧, 松田研一, 脇本敏幸
2. 発表標題 環状ペプチド類の生合成を担う環化酵素PenAの機能解析
3. 学会等名 第141回日本薬学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Matsuda K.
2. 発表標題 Identification of a new family of offloading cyclase in biosynthesis of non-ribosomal peptide
3. 学会等名 7th Modern Solid Phase Peptide Synthesis & Its Application Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsuda K.
2. 発表標題 Penicillin-binding protein-type thioesterases; scope, limitation and its application
3. 学会等名 13th Australian Peptide Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松田研一
2. 発表標題 trans-TE NRPS の発見と機能改変
3. 学会等名 若手研究者のための有機化学札幌セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsuda, K., Kobayashi, M., Sano, A., Wakimoto, T.
2. 発表標題 Identification and characterization of a new family of offloading cyclase in biosynthesis of non-ribosomal macrolactams.
3. 学会等名 Gordon Research Conference Marine Natural Products（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松田研一
2. 発表標題 ペプチド環化酵素ファミリー-PBP-type TEの発見・機能解析・応用
3. 学会等名 日本薬学会第142年会 一般シンポジウム「[S08] タンパク質工学による創薬化学の新展開」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenichi Matsuda, Chin-Soon Phan, Nandani Balloo, Kei Fujita, Okino Tatsufumi, and Toshiyuki Wakimoto
2. 発表標題 Enzymatic basis of guanidine bis-prenylation in argicyclamide biosynthesis
3. 学会等名 第58回ペプチド討論会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田研一
2. 発表標題 非リボソームペプチド生合成における新規ペプチド環化酵素の発見と機能解析
3. 学会等名 第23回天然薬物の開発と応用シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田研一
2. 発表標題 ゲノム情報と比色法を利用した稀少天然物の開拓
3. 学会等名 日本生薬学会第67回年会 若手シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田研一, 有馬陸, 秋山智子, 阿部葉, 城内航, 新家一男, 脇本敏幸
2. 発表標題 窒素 - 窒素結合含有天然物のゲノムマイニング
3. 学会等名 第63回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Matsuda, K., Phan, C.-S., Balloo, N., Fujita, K., Okino, T., Wakimoto, T
2. 発表標題 Argicyclamide revealed enzymatic basis for guanidine bis-prenylation
3. 学会等名 第53回若手ペプチド夏の勉強会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenichi Matsuda
2. 発表標題 A marine-derived biocatalyst for cyclic peptide production
3. 学会等名 The 4th international symposium on marine and fisheries research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田研一
2. 発表標題 海洋放線菌に見出した新規ペプチド環化酵素ファミリーの機能解析と応用可能性
3. 学会等名 第21回マリンバイオテクノロジー学会ミニシンポジウム(若手の会)(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田研一
2. 発表標題 新規ペプチド環化酵素の発見と機能解析
3. 学会等名 第3回「生体適合化学の進歩」インタラクティブフォーラム(招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 環状ペプチドの効率的な化学 - 酵素合成方法	発明者 脇本敏幸、松田研一、小林雅和	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-24966	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 新規プレニル化酵素	発明者 脇本敏幸、沖野龍文、松田研一、パンチンスン	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/004501	出願年 2021年	国内・外国の別 国内・外国

産業財産権の名称 新規プレニル化酵素	発明者 脇本敏幸、沖野龍文、松田研一、パンチンスン	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-017504	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 酵素を用いたペプチドライゲーション	発明者 脇本敏幸、松田研一、小林雅和	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-157054	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (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
---------	---------