



研究代表者	北海道大学・工学研究院・教授 大利 徹 (だいき とおる)	研究者番号:70264679
研究課題 情報	課題番号: 22H04976 キーワード: ペプチド、異性化酵素、ペプチドグリカン、ポリグルタミン酸、シュードペプチド	研究期間: 2022年度~2026年度

なぜこの研究を行おうと思ったのか (研究の背景・目的)

● 研究の全体像

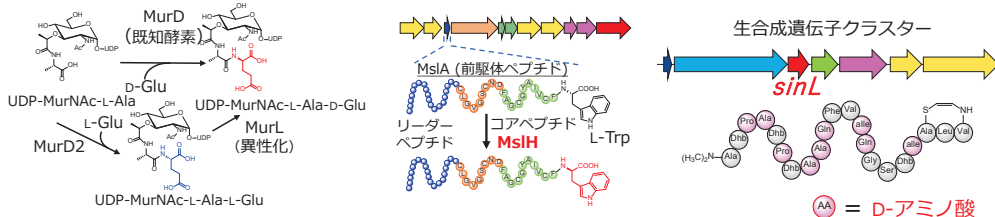
近年、比較的低コストで構造と生理活性の多様性を生み出せるペプチド系中分子化合物 (分子量が数千程度) が着目されている。

天然ペプチドに着目すると、基本骨格は生物に共通な機構であるリボソームによる翻訳、あるいはノンリボソームペプチド合成酵素 (NRPS) で合成される。NRPSは、非タンパク性のアミノ酸も利用し、ペプチドの高機能化や安定性向上をもたらしている。他方、リボソーム翻訳の場合、20種類のL体のタンパク性アミノ酸のみが用いられるため、ペプチドの構造機能多様性はNRPSに比べ限定され、またプロテアーゼで容易に分解される。これら欠点を補うためか、多くの場合、翻訳後にペプチド骨格がメチル化や水酸化などで多様に修飾される。修飾例の一つにペプチド内のL体のアミノ酸をD体に異性化する機構が知られている。進化上、有利に働いたためかD体アミノ酸を含む天然ペプチドは多いが、解明された異性化機構は限定される。我々は、新たに4種類の新規異性化酵素を見出したが、これらは既知酵素と全く相同性がない。そこで、これら酵素の詳細な反応機構を完全解明し、酵素番号 EC 5.1.1 (アミノ酸の異性化酵素) の新規性と多様性を示す。

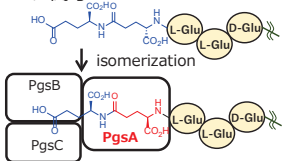
また、分解酵素に対する防御や多様な生理活性を生み出すために、ペプチドに似せた「シュード (偽) ペプチド構造」を持つ化合物も多く単離されている。しかし、これら化合物の生合成機構については、多くは不明であることから、4つのシュードペプチドを題材に解明を試みる。

図1 新たに見出したペプチド内のL体アミノ酸をD体に異性化するエピメラーゼの反応機構解明 【1】~【4】

【1】 ペプチドグリカンの生合成に関与 【2】 MS-271の生合成に関与



【4】 ポリグルタミン酸のD-Glu導入に関与



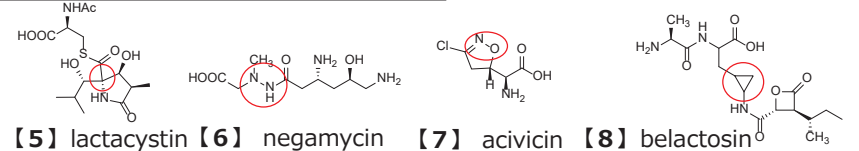
【1】 ペプチドグリカン生合成では、UDP-MurNAc-L-AlaにD-Gluが結合する。しかし一部の細菌では、L-Gluが結合した後に、MurLがD体に異性化する。しかし反応機構は不明であることから解明する。

【2】 MS-271はリボソームで合成されるが、C末端のTrpはD体である。解析の結果、新規酵素 (MslH) が前駆体ペプチド (MslA) のC末L-TrpをD体に異性化することが分かったので反応機構を解明する。

【3】 salinipeptinは、リボソームで合成されるが9個のD体アミノ酸を含む。生合成遺伝子クラスターに存在する唯一の機能未知酵素、SinLが異性化に関与すると考えられることから検証する。

【4】 ポリグルタミン酸に (PG) 含まれるD-Gluは、異性化酵素によりL-Gluから供給され伸長鎖に取り込まれると考えられてきた。しかし解析の結果、L-Gluが伸長鎖に取り込まれた後、異性化されることが分かった。3つからなる生合成酵素のうち、PgsAが異性化を触媒すると考えられたことから検証する。

図2 シュードペプチド構造の生成機構解明 【5】~【8】



【5】 lactacystinはユニークな $\alpha$ ,  $\alpha$ -二置換アミノ酸構造を持つ。トレーサー実験により、L-Leu、L-Cys、メチルマロン酸から合成されることが分かっているが生合成機構は不明であることから解明する。

【6】 negamycinが持つヒドラジド (N-N-C=O) 構造の形成機構を解明する。

【7】 acivicinが持つイソオキサゾリン (N-O) 構造の形成機構を解明する。

【8】 belactosinが持つアミノ酸側鎖のシクロプロパン生合成機構の解明に取り組んだ結果、詳細が判明したので (Angew. Chem. Int. Ed. 61, e202113189 (2022)), ゲノムデータに見出される類似酵素の基質特異性を検討する。

この研究によって何をどこまで明らかにしようとしているのか

【1】 MurLはATPを補酵素に用いアデニル化により基質を活性化し、逆反応は触媒しない新規異性化酵素である。その反応機構を探るためX線結晶構造解析を行った。ATPアナログとの共結晶が得られたが、基質を捕捉する領域が揺らいでおり、基質認識残基や反応機構を推定するには、アデニル化された反応中間体の類縁体との共結晶が必要と判断された。そこで図3に示す反応中間体の類縁化合物を合成後、MurLとの共結晶の構造を解析し反応機構を明らかにする。

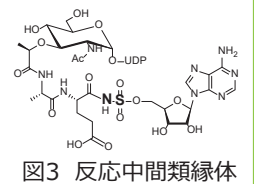


図3 反応中間類縁体

【2】 MslHの反応機構を解明するため、基質であるMslAのC末Trpが欠失させた類縁体との共結晶を得て構造解析した。その結果、図4に示す4つの活性残基を見出したことから、変異導入し検証する。

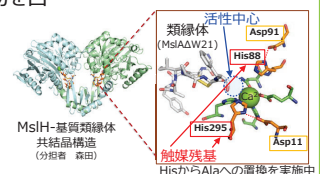


図4 MslHの活性残基

【3】 最近、生合成遺伝子クラスターに、salinipeptinに含まれる9個のD体アミノ酸を生成する酵素遺伝子が含まれていることを確認した。そこで、同手法で異性化に必須な遺伝子を絞り込んだ後、in vitro解析で実証する。

【4】 D-Glu含有量が異なるPGを生産する2種類の生合成遺伝子 (pgsA, pgsB, pgsC) を相互に交換した結果、pgsAがPGのD-Glu比率を決定することが分かった。PgsAは上記MslHと部分的に相同性があることから、MslHの結晶構造を基にPgsAの触媒残基を推定し、周辺の両PgsAで異なるアミノ酸残基を相互置換しD体比率が変化するか検討する。またPGは吸湿性があり天然土壌保水材として使われている。D-Gluが100%のPGは、分解酵素耐性になることが知られていることから、その実用生産も目指す。

【5】 lactacystinは生化学試薬として広く使われている。しかし生合成に関しては同位体を用いたトレーサー実験が行われているのみで詳細は不明であることから酵素レベル解明する。

【6】 これまでの解析で、ヒドラジド (N-N-C=O) 構造の形成には、L-アスパラギン酸に由来する亜硝酸が関与することが分かった。現在、亜硝酸生成酵素遺伝子周辺に、他の生合成遺伝子が存在するが遺伝子破壊により検討している。最終的に、ヒドラジド (N-N-C=O) 構造の形成機構を酵素レベルで解明する。

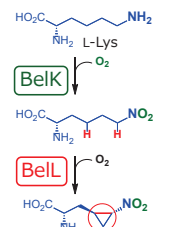


図5 シクロプロパン生成機構

【7】 イソオキサゾリン (N-O) 構造の形成機構を解明する。acivicinはCl基を有することから既知のCl化遺伝子を生産菌のゲノムに探索した結果、候補を4つ見出した。各々の破壊株を構築した結果、1つの破壊株がCl基のないacivicinを生産した。現在、周辺遺伝子の破壊や異種宿主発現によりacivicin生合成に必須な遺伝子の同定を行っている。最終的にイソオキサゾリン骨格の形成機構を酵素レベルで解明する。

【8】 belactosin生合成で明らかにした (図5)、シクロプロパン生合成酵素の基質特異性を、ゲノムデータに見出した類似酵素を用いて検討する。