

ペニシリン結合タンパク質によるペプチド環化

～D-アミノ酸含有環状ペプチドの効率的合成に期待～

ポイント

- ・放線菌由来環状ペプチド、スルガミド B の全合成に成功。
- ・ペニシリン結合たんぱく質に属する新しいペプチド環化酵素を発見。
- ・環状ペプチドを利用した天然物医薬品への応用に期待。

概要

北海道大学大学院薬学研究院の脇本敏幸教授らの研究グループは、海洋放線菌*1由来のカテプシン B 阻害物質であるスルガミド B の生合成最終段階を触媒する新規ペプチド環化酵素を発見しました。

スルガミド B は非リボソーム型ペプチド生合成酵素 (NRPS*2) によって生合成されますが、生合成の完結に必要な通常の環化酵素が遺伝子上に見当たりませんでした。そこで、まずスルガミド B を生合成に準じた経路で化学的に全合成し、非酵素的な環化反応を試みました。しかし、非酵素的な条件ではスルガミド B は生じなかったため、スルガミド B の生合成には未同定の酵素の関与が必要であることがわかりました。

改めて遺伝子上に存在する環化・放出酵素の候補を探したところ、ペニシリン結合タンパク質に類する SurE と名付けた酵素を見出しました。SurE を大腸菌で発現させ、化学合成した環化前駆体との酵素反応を試みた結果、極めて効率的にスルガミド B が生じることが判明しました。SurE は従来知られている非リボソーム型ペプチド生合成酵素の環化・放出酵素とは相同性*3を示さず、全く新しいペプチド環化酵素であり、生体触媒としての応用が期待されます。

なお、本研究成果は 2018 年 5 月 29 日 (火) 公開の *Angew. Chem. Int. Ed.* 誌にオンライン掲載されました。

【背景】

海洋放線菌から単離されたスルガミド B はがんの浸潤^{しんじゆん}や転移に関わるプロテアーゼであるカテプシン B を阻害し、その構造は 8 個のアミノ酸で構成された大環状骨格で形成されています (図 1)。先行研究による生産菌のゲノム解析の結果、スルガミド B の生合成遺伝子クラスターが明らかになり、スルガミド B は非リボソーム型ペプチド合成酵素 (NRPS) によって生合成されることがわかっています。

非リボソーム型ペプチド合成酵素は複数のモジュールによって構成されており、各モジュールが 1 個のアミノ酸をチオエステル結合を介して受け入れ、上流のモジュールのアミノ酸あるいはペプチドとの縮合を繰り返すことによって、ベルトコンベアのようにペプチド鎖を作り上げます。このベルトコンベアが正常に作動し、スルガミド B のような環状構造を生合成するためには、最終産物の環化を伴った放出を触媒する酵素の関与が必要です。

通常の NRPS の場合、この最終段階を担うチオエステラーゼ (TE*⁴) と呼ばれるドメインがベルトコンベアの終点に存在します。しかし、スルガミド B 生合成酵素にはこの TE ドメインが見当たりませんでした。にもかかわらず、ベルトコンベアが正常に作動し、環状ペプチドであるスルガミド B が生合成されるということは、未知の環化・放出酵素の存在を示唆しています。そこで、脇本教授らの研究グループはスルガミド B 生合成の最終段階を担う酵素の特定を進めることにしました。

【研究手法・研究成果】

スルガミド B 生合成酵素が、放出を担う TE ドメインを欠落した NRPS であったため、まず酵素に依存しない環化機構を検証することにしました。そこでスルガミド B を、生合成経路を模倣したルートで化学的全合成することになりました。ペプチド固相合成法によって鎖状のスルガミド B 前駆体を合成し、液相にて縮合剤を用いた環化を行った結果、通常のペプチド化学合成で問題となる異性化はほとんど生じず、非常に効率的に環化反応が進行することがわかりました。

さらに生合成を模倣した環化前駆体であるチオエステル中間体を合成し、縮合剤非存在下の環化を試みました (図 2)。その結果、スルガミド B はほとんど生じず、代わりにペプチド鎖に含まれるリジン残基の側鎖アミノ基と C 末端で環化したイソペプチドが生まれました (図 2)。したがって、スルガミド B の生合成にはやはり環化酵素の関与が必要であることがわかりました。

次に、生合成遺伝子に着目し候補となる酵素を検索したところ、スルガミド生合成酵素 NRPS の上流にペニシリン結合タンパク質 (PBP*⁵) 類似の酵素 (SurE) がコードされていました (図 1)。ペニシリン結合タンパク質は細菌の細胞壁合成を担う酵素であり、D-アラニン認識してペプチド結合を形成する反応を触媒します。この反応機構はペプチド類の環化反応にも類似することから、SurE を環化酵素の候補として検証することにしました。SurE を大腸菌で発現させ、化学的に合成したチオエステル環化前駆体と混合し、酵素反応を追跡しました。その結果、2 時間の反応で前駆体が消失し、予想どおりスルガミド B が生成することがわかりました (図 2)。

また、SurE による酵素反応ではイソペプチドは全く検出されませんでした。スルガミド B 環化前駆体の C 末端のアミノ酸は D-ロイシンであったため、SurE は C 末端の D-アミノ酸*⁶ を選択的に認識して環化を触媒することが示唆されました。実際、C 末端のアミノ酸を L-ロイシンに変え、酵素反応を行った結果、やはり環化反応は進行しませんでした。SurE はこれまで知られている TE ドメインなどの環化・放出酵素とは同源性を示さず、NRPS の最終段階を担う全く新しいタイプの環化酵素であることが明らかになりました (図 3)。

【今後への期待】

放線菌のゲノムデータベースの検索によって、SurE 類似の酵素が他にも数多く存在していることがわかっています。今後、類似の生合成機構による新規環状ペプチドの探索や SurE 類似酵素の機能解析が期待できます。また、抗生物質などの天然物医薬品などに見られるペプチド類には D-アミノ酸を含むものが数多く知られており、さらに環状構造は消化酵素への抵抗性などを付与する上で重要な構造要素です。今後 SurE の基質特異性をより詳細に検証することで、D-アミノ酸含有環状ペプチドを効率的に合成できる新たな生体触媒としての応用が期待できます。

論文情報

論文名 Total Synthesis of the Non-Ribosomal Peptide Surugamide B and Identification of a New Offloading Cyclase Family (非リボソームペプチド、スルガミド B の全合成と新規環化酵素の同定)

著者名 倉永健史¹, 松田研一¹, 佐野文映¹, 小林雅和¹, 二宮章洋², 高田健太郎², 松永茂樹², 脇本敏幸¹ (¹北海道大学大学院薬学研究院, ²東京大学大学院農学生命科学研究科)

雑誌名 Angewandte Chemie International Edition (ドイツ化学会誌)

DOI 10.1002/anie.201805541

公表日 2018年5月29日(火)(オンライン公開)

お問い合わせ先

北海道大学大学院薬学研究院 教授 脇本敏幸(わきもととしゆき)

TEL 011-706-3239 FAX 011-706-3922 メール wakimoto@pharm.hokudai.ac.jp

URL <http://www.pharm.hokudai.ac.jp/tennen/index.html>

配信元

北海道大学総務企画部広報課(〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目)

TEL 011-706-2610 FAX 011-706-2092 メール kouhou@jimuhokudai.ac.jp

【参考図】

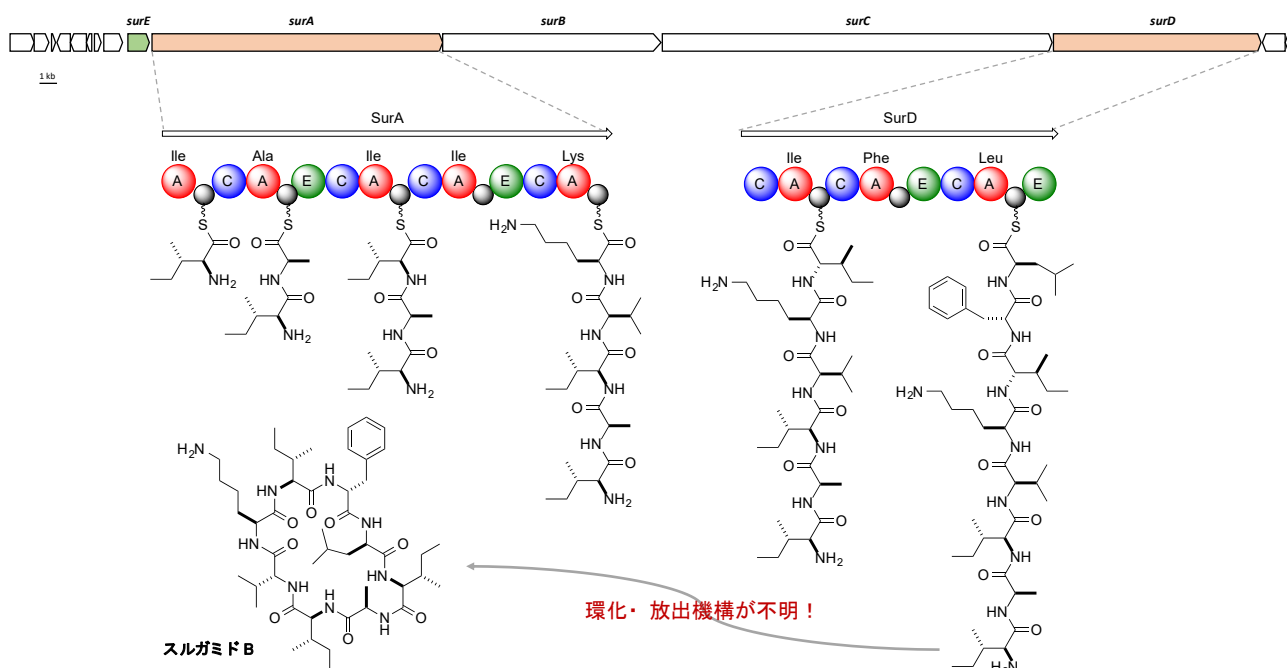


図 1. 非リボソーム型ペプチド合成酵素によるスルガミド B の推定生成機構

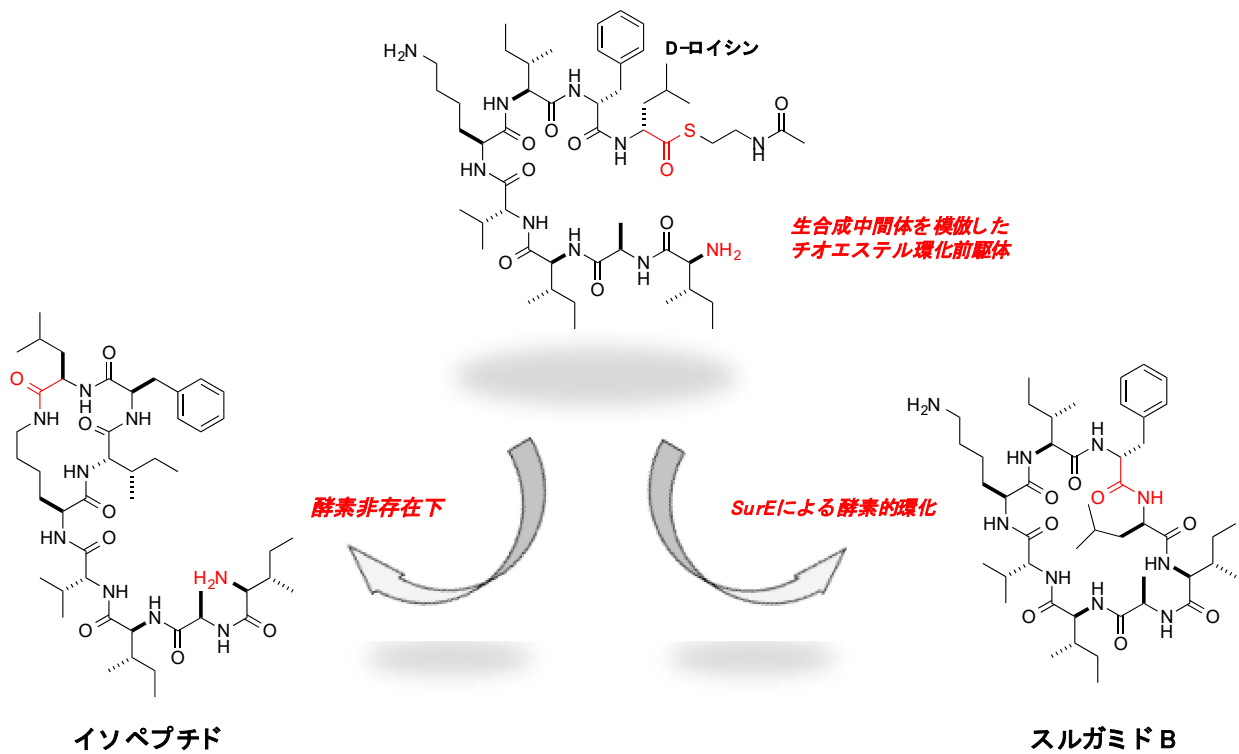


図2. チオエステル前駆体の環化反応

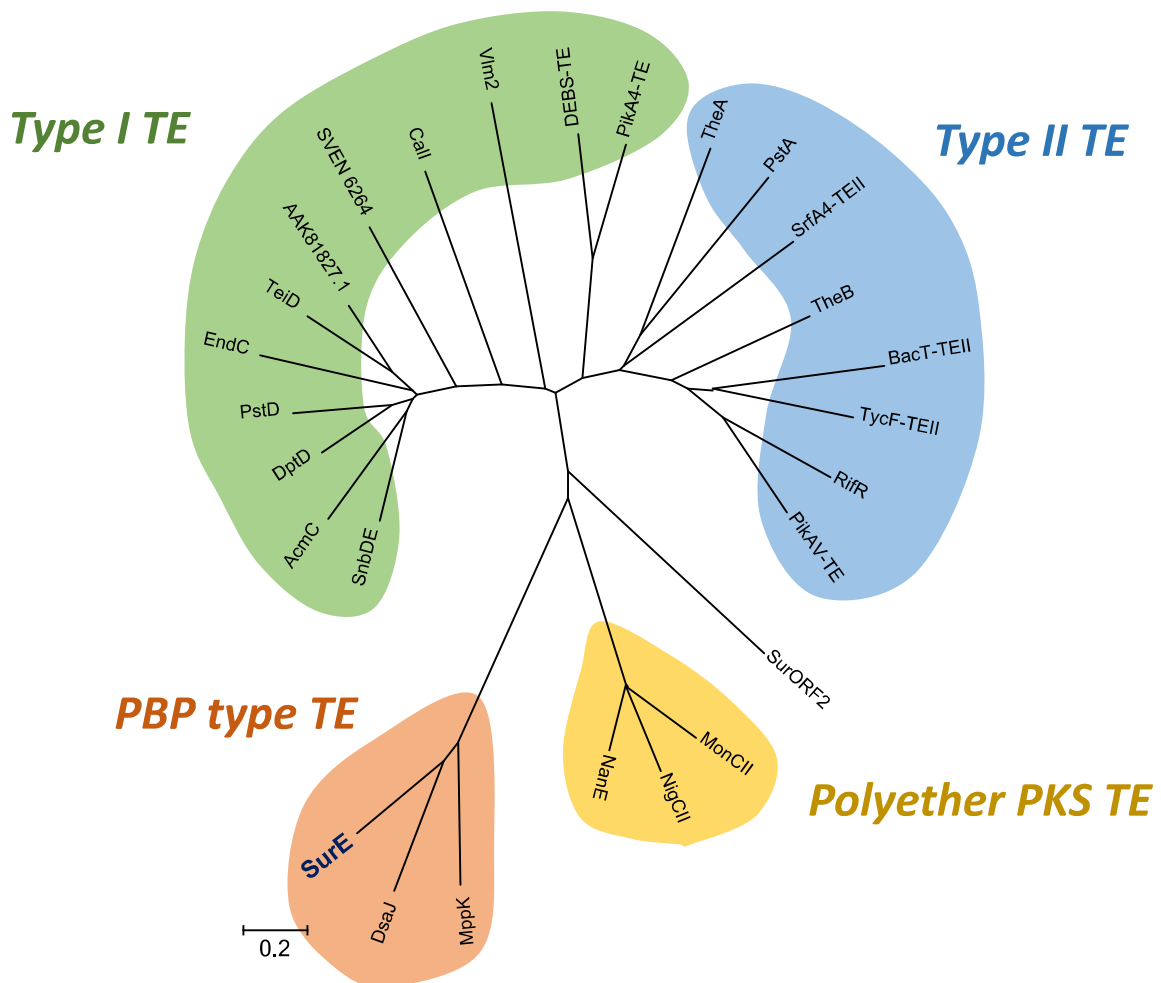


図3. SurE の系統樹解析

【用語解説】

- *1 放線菌 …土壤中, その他自然界に広く分布する微生物で, 抗生物質(ストレプトマイシンなど)を産出するストレプトマイセス属を含む仲間。
- *2 NPRS(Non-ribosomal peptide synthetase) … 通常のタンパク質などを生合成するリボソーム系とは異なり, DNA の塩基配列に依存せずペプチド系化合物を生合成する酵素。
- *3 相同性 … ある形態や遺伝子が共通の祖先に由来すること。
- *4 TE … チオエステルの加水分解酵素のこと。
- *5 PBP(Penicillin binding protein) … ペニシリン結合タンパク質のこと。
- *6 D-アミノ酸 … 通常のタンパク質を構成する L-アミノ酸の立体化学が反転したアミノ酸。