

環状ペプチドの抗菌性を高める新規酵素を発見

～中分子ペプチド医薬品創製への貢献に期待～

ポイント

- ・アルギニンがプレニル化された環状ペプチドを藍藻から発見。
- ・アルギニンをプレニル化する新規酵素の機能を解明。
- ・プレニル化によって抗菌性を高めることが可能。

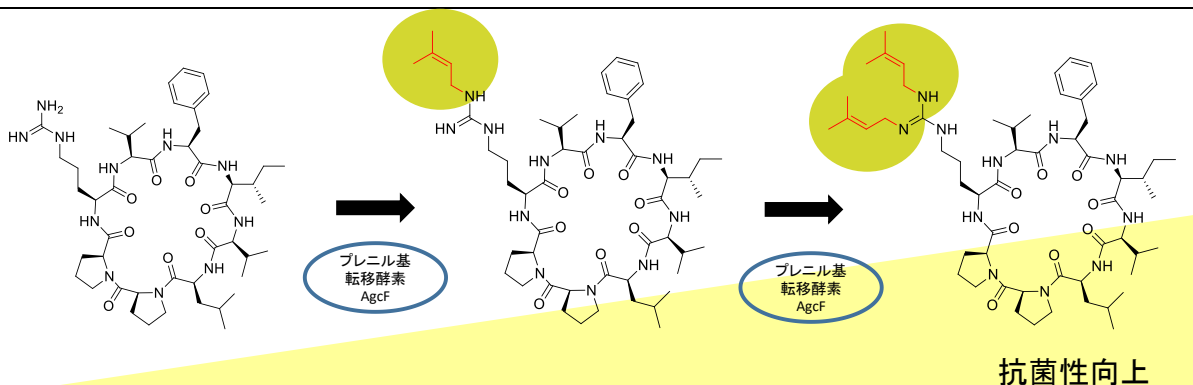
概要

北海道大学大学院地球環境科学研究院の沖野龍文教授と薬学研究院の松田研一助教、脇本敏幸教授らの研究グループは、多剤耐性菌などに対する抗菌活性を示す環状ペプチドのアルギシクラミド類を、湖沼にアオコを形成する藍藻から発見しました。環状ペプチドに含まれるアミノ酸アルギニンのグアニジン部分の窒素にプレニル基*1が2個結合していることが構造の特徴です。ペプチド中のアルギニンをプレニル化する酵素は明らかにされていなかったため、研究グループは、この藍藻の遺伝子解析を行い、アルギシクラミド類の生合成酵素の解明に取り組みました。

その結果、AgcF と名付けたプレニル基転移酵素を見いだしました。化学合成したプレニル基をもたないアルギシクラミド C との酵素反応を試みた結果、プレニル基 1 個のアルギシクラミド B を経て、プレニル基 2 個で抗菌性をもつアルギシクラミド A に変換することが確認されました。アルギシクラミド C のアルギニンの代わりに、トリプトファンやリシンなどの異なるアミノ酸に置換した化合物や、アルギシクラミド C と同じアミノ酸配列でありながら環化していない直鎖の化合物を合成して、AgcF との酵素反応を試みましたが、プレニル化は進みませんでした。一方、プレニル基が 2 個つながったゲラニル基を取り込むことも、この酵素は可能でした。この酵素の立体構造を予測したところ、活性部位の入り口部分が類似の酵素に比べて広くて、より大きなゲラニル基を取り込めると予想されました。

分子量 500～2,000 の中分子は新しい医薬品の候補として期待されています。本研究で発見した環状ペプチドもその範疇に入りますが、一般に生体膜を通過しにくく細胞内に入り込めないという問題があります。プレニル化は、脂溶性を高めて生体膜を通りやすくすることができます。実際、プレニル基が 2 個結合したアルギシクラミド A が最も高い抗菌性を示しました。本研究で発見したプレニル基転移酵素を使って、医薬品候補環状ペプチドのアルギニンをプレニル化することでその効果を高め、実用化を目指すことが期待されます。

なお、本研究成果は、2021 年 6 月 28 日（月）公開の *Journal of the American Chemical Society* 誌に掲載されました。



【背景】

従来の低分子医薬品や抗体薬などのバイオ医薬品に加えて分子量 500~2,000 の中分子医薬品が次世代医薬品として期待されています。特に、環状ペプチドは中分子医薬品になり得る可能性を秘めています。湖沼などでアオコを形成する藍藻は、厄介者扱いされる生物ですが、多種多様な環状ペプチドを生産することで知られています。研究グループは長年藍藻から抗ガン剤候補物質や酵素阻害活性を有することで医薬品候補となる化合物を報告してきました。

アオコ形成種の藍藻である *Microcystis aeruginosa* (NIES-88) が有する化合物を分析したところ、質量分析の結果からプレニル化している化合物があることが予想されました。その化合物を単離して構造決定したところ、アルギニンのグアニジン部分の窒素 2 個がプレニル化されている極めて珍しい構造をしていることがわかりました。プレニル化は、化合物の脂溶性をあげることで細胞に入り込みやすくなるので、活性を向上させることが期待されます。そこで、プレニル化を司る酵素を調べることにしました。

【研究手法】

研究グループは、藍藻 *Microcystis aeruginosa* (NIES-88) から得られたアルギシクラミド類のアミノ酸配列から、このペプチド骨格をコードする遺伝子配列を探索しましたが、公開されている NIES-88 株の遺伝子情報から発見することができませんでした。あらためて遺伝子全体 (ゲノム) を解析することで、目的の遺伝子配列を発見しました。環状ペプチドのアミノ酸トリプトファンやチロシンをプレニル化する酵素は知られているので、その配列を手がかりにプレニル基転移酵素を探索したところ AgcF と名付けた酵素が候補として挙がりました。AgcF がアルギシクラミド類のプレニル化を司っていることを確かめるために、プレニル化されていないアルギシクラミド C を合成して反応を行いました。さらに、AgcF の基質選択性を検証するために、アルギシクラミド C の環化していない直鎖の化合物、アルギシクラミド C のアルギニンの代わりにトリプトファン、チロシン、セリン、トレオニン、リシンに置換した化合物も合成し、AgcF と反応させました。炭素数 5 個のプレニル基を付加する反応だけでなく、炭素数 10 個のゲラニル基、15 個のファルネシル基の付加も試みました。さらに、既に立体構造が明らかになっているプレニル基転移酵素の構造を鋳型として、コンピュータモデリングにより AgcF の立体構造を予測しました。

【研究成果】

アルギシクラミド A は、8 個のアミノ酸残基が環状に結合したペプチドで、アルギニンのグアニジン部分の 2 個の窒素にプレニル基が結合していることを決定しました。アルギニンから「アルギ」を使ってアルギシクラミドと命名しました。プレニル基が結合していないアルギシクラミド C には抗菌活性はありませんが、プレニル基が 1 個結合したアルギシクラミド B は多剤耐性黄色ブドウ球菌に弱い抗菌活性を示し、2 個結合したアルギシクラミド A は強い抗菌活性を示しました。プレニル基によって脂溶性が増して細胞に取り込まれやすくなることで抗菌性が高まっていると考えられます。

本研究で発見したプレニル基転移酵素 AgcF は、アルギニンに特異的に反応しました。これまでにみついている環状ペプチドのアルギニン以外のアミノ酸に反応するプレニル基転移酵素は、プレニル基に特異的であるのと異なってプレニル基が 2 個連なっているゲラニル基を付加するという点でも異なります。これは、活性部位の入り口部分のスペースが広く、大きな基質を受け入れやすいためだと考えられます。

環状ペプチドのプレニル基転移酵素の機能解明は 10 年前から始まりました。図 1 に示すように、

最近 10 年間活発に研究されていますが、本研究で初めてアルギニンをプレニル化する酵素の機能が解明されました。

【今後への期待】

ペプチド医薬品の開発において、体内で効果を示すためには細胞に取り込まれやすい構造であることが必要です。プレニル化は、脂溶性を高めることで細胞に取り込まれやすくする方法の一つです。これまで見つかっていなかった環状ペプチドのアルギニンをプレニル化する酵素が見つかったことにより、構造多様性を拡張する新しい道具を得ることができました。この道具を用い、新しい環状ペプチドを創製して医薬品開発につなげることが期待されます。

【謝辞】

本研究は、文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「生合成リデザイン」、基盤 B、若手研究、特別研究員奨励費及び国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)「革新的中分子創薬技術の開発」、国立研究開発法人科学技術振興機構(JST) A-STEP, ACT-X「生命と化学」、旭硝子財団、内藤記念科学振興財団、上原記念生命記念財団、住友財団、第一三共生命科学研究振興財団の支援を受けて行われました。

論文情報

論文名	Argicyclamides A–C unveil enzymatic basis for guanidine bis-prenylation (アルギシクラミド A–C がグアニジンのビスプレニル化の酵素反応を明らかに)
著者名	Chin-Soon Phan ¹ , 松田研一 ^{2,3} , Nandani Baloo ⁴ , 藤田 慧 ² , 脇本敏幸 ^{2,3} , 沖野龍文 ¹ (¹ 北海道大学大学院地球環境科学研究院, ² 北海道大学大学院薬学研究院, ³ 北海道大学バイオサーフィス創薬グローバルステーション, ⁴ 北海道大学大学院環境科学院)
雑誌名	Journal of the American Chemical Society (化学全般の専門誌)
DOI	10.1021/jacs.1c05732
公表日	2021 年 6 月 28 日 (月) (オンライン公開)

お問い合わせ先

北海道大学大学院地球環境科学研究院 教授 沖野龍文 (おきのたつふみ)

T E L 011-706-4519 F A X 011-706-4867 メール okino@ees.hokudai.ac.jp

U R L <https://www.ees.hokudai.ac.jp/ems/stuff/okino/index.htm>

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)

T E L 011-706-3239 F A X 011-706-3922 メール wakimoto@pharm.hokudai.ac.jp

U R L <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)

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【参考図】

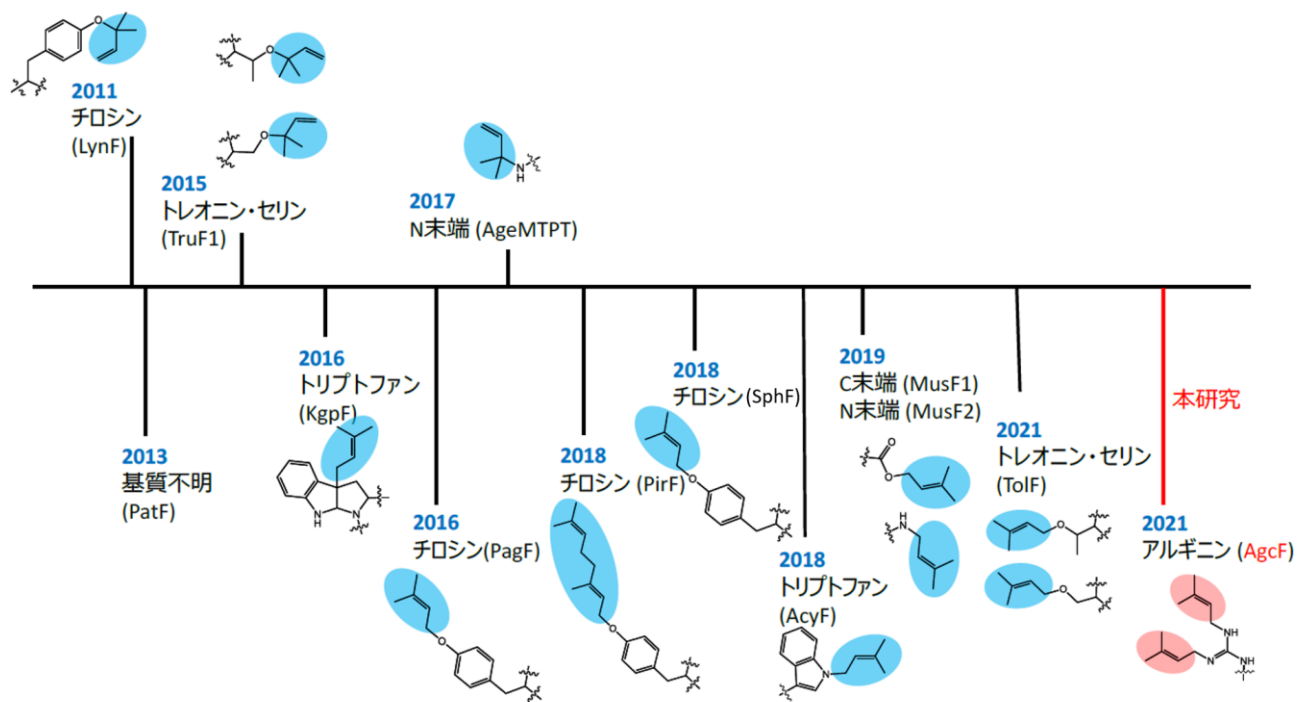


図 1.環状ペプチドのプレニル基転移酵素の発見（年代発表年，その下は基質，かっこ内は酵素名）

【用語解説】

*1 プレニル基 … 炭素5個からなる官能基で，その炭素骨格がテルペノイドの構成ユニット。アルカロイド，ペプチド，タンパク質などがプレニル化されることがある。