



Title	非リボソームペプチド環化酵素を利用した環状ペプチドの効率的な化学：酵素合成法の開発 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	小林, 雅和
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第15783号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92306
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Masakazu_Kobayashi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（薬科学） 氏 名 小林 雅和

学 位 論 文 題 名

非リボソームペプチド環化酵素を利用した環状ペプチドの効率的な化学-酵素合成法の開発

ペプチドの大環状化は、化合物の代謝安定性や標的特異性を向上させる重要な修飾であり、シクロスポリンをはじめとする多くのペプチド医薬品に見られる構造である。しかし、有機合成によるペプチドの大環状化は反応制御が難しく、縮合剤の使用によるペプチド鎖C末端残基のエピメリ化や競合する分子間反応による収率低下、保護基の着脱工程や大量の有機溶媒を消費する点など、いくつか課題を抱える。一方、天然から見出される非リボソーム型環状ペプチドの生合成では、各ペプチドに特化した環化酵素が温和な条件下、保護基を用いることなく位置特異的にペプチド環化反応を触媒する。そのため、寛容な基質選択性を有するペプチド環化酵素を同定し、それを生体触媒として利用することで、既存の合成法を相補する効率的で環境調和性の高い環状ペプチド合成法の確立が期待できる。そこで本学位論文では、新規ペプチド環化酵素の同定およびその生体触媒の開発を通じて、環状ペプチドの効率的な化学-酵素合成法の確立を目指した。

1. 新規非リボソームペプチド環化酵素 SurE の発見

海洋放線菌 *Streptomyces* sp. JAMM992 から単離された環状オクタペプチド surugamide A-E (SA-SE) は、非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) である SurA/SurD により生合成される。また、同遺伝子クラスター中にコードされた別の NRPS である SurB/SurC により、構成残基や鎖長が異なる鎖状デカペプチド surugamide F (SF) が生合成される。通常、NRPS の生合成では、合成酵素 C 末端に存在する TE ドメインにより鎖状生合成中間体の環化反応や加水分解反応が触媒されるが、本クラスターは TE ドメインを欠いており、未知の生合成機構の存在が示唆された。そこでこの新奇な生合成機構に着目し、鎖状生合成中間体の環化機構と加水分解機構の解明を目指した。

Surugamide 生産菌のゲノム情報を詳細に解析した結果、生合成遺伝子クラスターの upstream にコードされる Orf として *surE* 遺伝子を見出した。BLAST 検索の結果、SurE はペニシリン結合タンパク質 PBP と相同性を示すことが判明した。PBP は、細菌の細胞壁生合成においてアミド結合形成を触媒する酵素であることから、SurE も PBP と同様の分子機構により鎖状生合成中間体の環化反応を触媒する可能性が考えられた。そこで、遺伝子破壊による *in vivo* 実験、および組換え SurE を用いた *in vitro* 実験を行い、SA-SE 生合成における SurE の機能を解析した。その結果、*surE* 遺伝子を欠損させた株では SA-SE の生産が消失すること、また、組換え酵素 SurE が SB 環化前駆体の SNAC 基質を効率よく環化することが明らかとなった。この結果から、SA-SE 生合成における SurE を介した鎖状生合成中間体の環化機構が明らかとなった。さらに、SF 生合成における SurE の機能を検証するため SNAC 基質を用いた *in vitro* 酵素反応を行った結果、SurE は SF ではなく、その環化体である cyclosurugamide F (cyc-SF) を生成した。この結果から、SurE は SA-SE に加えて SF 生合成における環化放出過程をも担う、寛容な基質選択性を有するペプチド環化酵素であることが明らかになった。SurE は PBP と相同性を示すことから、これを新規非リボソームペプチド環化酵素ファミリー「PBP-type TE」と位置付けた。本研究により、新規ペプチド環化酵素 SurE を同定し、NRPS 生合成の環化機構における新たな知見を得た。

2. SNAC 基質を用いた SurE の基質選択性の解明

SurE は SA-SE および cyc-SF の生合成に関与することから、寛容な基質選択性を有するペプチド環化酵素であることが示唆された。そこで、本酵素の生体触媒としての応用を見据え、複数の SNAC 基質を用いて基質適用範囲や基質認識機構の解明を目指した。まず、基質両末端残基の立体選択性を検証するため、基質の両末端残基の立体化学をそれぞれ独立に反転した SNAC 基質を用いて SurE の *in vitro* 酵素反応を行った。その結果、SurE の環化反応には基質 C 末端に D-アミノ酸、N 末端に L-アミノ酸が必要であり、本酵素がヘテロキラルな残基間での head-to-tail 環化を選択的に触媒することが明らかとなった。また、複数の SNAC 基質を用いた *in vitro* 酵素反応の結果から、SurE は基質配列内部の残基に対して寛容な選択性を有する一方で、基質 C 末端に対して厳密な残基選択性を有することが示唆された。

SurE の機能解析に付随し、ホモログ酵素である PBP-type TE の探索と基質選択性の検証を行った。可溶性タンパク質として得られた 2 種類の PBP-type TE、SurE₁₄₉₈₈ と SurE₁₅₄₅₂ に対して、SB の環化前駆体を基に設計した 3 種類の SNAC 基質を用いて酵素反応を行った。その結果、どちらの PBP-type TE も本来とは異なる基質にも関わらず、環化反応や加水分解反応を触媒した。この結果から、SurE に限らず PBP-type TE 全体が寛容な基質選択性を有するペプチド環化酵素ファミリーであることが強く示唆された。さらに、SurE をはじめとした PBP-type TE ファミリーの寛容な基質選択性の一端を明らかにし、生体触媒としての利用可能性を見出した。

3. Head-to-tail 型環状ペプチドの効率的な化学-酵素合成法の開発

SurE の触媒利用を目指すにあたり、酵素反応に用いる SNAC 基質の煩雑な化学合成が課題であった。そのため、これまでに調製した SNAC 基質の数や種類は非常に限定的であり、SurE の基質選択性の全容解明には至っていない。さらに、SurE を利用してペプチド環化段階を効率化できたとしても、その前段階である SNAC 基質の化学合成が非効率的では生体触媒の実用化に向けて課題が残る。そこで次に、高い収率・純度で簡便に基質を調製できる新たな基質合成法を開発し、SurE の基質選択性を網羅的に検証することで本酵素の生体触媒としての有用性を検証した。

検討の結果、安価に入手可能な ethylene glycol を固相合成に組み込むことで、SurE の基質となる鎖状ペプチドを高収率・純度で簡便に調製できる合成法を確立した。本手法を駆使して多数の基質を調製し、SurE の基質選択性を詳細に検証した結果、SurE は基質 N 末端と配列内部の残基に対して寛容な選択性を有する一方、基質 C 末端残基に対して厳密な選択性を有することが明らかとなった。SurE の基質 C 末端残基選択性を拡張するため、ホモログ酵素 DsaJ とのタンパク質構造比較に基づく酵素改変を行った。その結果、野生型 SurE では環化できなかった C 末端 Gly の基質を環化可能な SurE 変異体を複数創出することに成功した。本研究により SurE の生体触媒として有用性を明らかにし、head-to-tail 型環状ペプチドの効率的な化学-酵素合成法を確立した。

4. Head-to-side chain 型環状ペプチドの効率的な化学-酵素合成法の開発

上記で確立した手法で合成できる環状ペプチドは head-to-tail 型環状ペプチドに限定されるため、SurE の環化様式の乏しさが課題であった。そこで、SurE の生体触媒としての適用範囲の拡張を目指し、head-to-side chain 型環状ペプチドの化学-酵素合成を試みた。検討の結果、分岐型ペプチドを酵素反応の基質とすることで、SurE が head-to-side chain 型環状ペプチドを効率よく生成することを見出した。本手法は SurE 以外のペプチド環化酵素に対しても適用可能であり、構成残基や環サイズが異なる多様な環状ペプチドを効率よく酵素合成することに成功した。

本学位論文にて確立した化学-酵素合成法は、目的の環状ペプチドを精製工程なしに高純度かつ高変換効率で合成することができる。そのため、本手法は環状ペプチドの大スケール合成だけでなく、環状ペプチドライブラリーの創出などペプチド創薬の分野にも応用が期待される。