HOKKAIDO UNIVERSITY

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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文　審　査　の　要　旨

博士の専攻分野の名称　博士（薬科学）　　氏　名　　小　林　雅　和

審査担当者	主　査	教　授	脇　本　敏　幸
	副　査	教　授	市　川　聡
	副　査	准教授	薬師寺　文　華
	副　査	講　師	松　田　研　一

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

博士学位論文審査等の結果について（報告）

環状ペプチドは生物活性天然物にしばしば見出される構造であり、近年では医薬品シード化合物の骨格としても期待されている。しかし、ペプチドの環状化は有機合成において制御の難しい反応の一つとして知られており、縮合剤を用いた従来の方法よりも、効率的かつ環境調和性の高い手法が望まれている。そこで、著者は天然環状ペプチドの生合成経路に着目した。天然においてペプチドの環状化は環化酵素のよって触媒される。したがって、広い基質選択性を示すペプチド環化酵素が存在すれば、それらは生体触媒としての応用が期待できる。

天然におけるペプチド生合成経路はリボソーム依存性と非リボソーム依存性経路の２種類が知られている。特に、非リボソーム依存性経路は非タンパク質構成アミノ酸を原料に用いることができるため、多様なペプチド骨格を生合成することが知られている。そのため、非リボソーム環状ペプチドの環化を担う酵素（チオエステラーゼ：TE）は、寛容な基質選択性を示すことが期待されてきた。しかし、過去 20 年以上にわたり、非リボソーム環状ペプチドの環化酵素の機能解析が行われてきた結果、触媒応用が可能な有望な酵素は見出されていない。

一方で著者は本研究において、従来の非リボソームペプチド環化酵素 TE とは相同性を示さない、新規の環化酵素 SurE を発見した。SurE は非リボソ

ーム環状ペプチド surugamide 類の生合成経路から見出された。Surugamide の生合成経路は２つの異なる環状ペプチドを生成するが、SurE はこれら両方の head-to-tail 環化を触媒する。また従来の TE が非リボソーム依存性ペプチド合成酵素に融合したドメインである一方で、SurE は独立した単独のタンパク質として存在する。放線菌のゲノムデータベース上には SurE と同様にペニシリン結合タンパク質に相同性を示すホモログ酵素が 600 以上存在することから、これら新規環化ペプチド酵素ファミリーを PBP-type TE と命名した。

次に著者は SurE の基質選択性の検証に着手した。非リボソーム依存性ペプチド合成酵素はキャリアタンパク上にチオエステルを介して結合したペプチド基質を生合成中間体として利用する。このチオエステル基質を簡略化するために、*N*-acetylcysteamine（SNAC）を C 末端へ縮合したペプチドが環化酵素の基質として一般に用いられてきた。しかし、SNAC 基質の合成は煩雑かつ非効率であるため、構造が異なる多数の基質を調製することは困難であった。そこで著者は酵素による環化反応に適した新たなペプチド基質の合成方法を考案した。あらかじめエチレングリコールを縮合したペプチド固相合成用樹脂を用いてペプチド合成を行い、樹脂から切り離すことで、ペプチド C 末端にエチレングリコールを縮合した基質を効率的に合成した。さらに、得られた基質は PBP-type TE に受け入れられ、環化反応が進行することを見出した。本手法はペプチド基質の HPLC 精製を必要とせず、さらに環化反応も酵素触媒によって定量的に進行することから、極めて効率的な環状ペプチドの合成手法である。

本手法を用いて様々な基質を合成し、SurE の基質選択性を評価した結果、SurE はペプチド鎖中央の配列には寛容な選択性を示した。また、N 末端には L 体のアミノ酸を、C 末端には D 体のアミノ酸を要求することが明らかになった。さらにホモログ酵素の基質選択性を明らかにするとともに、SurE の結晶構造をもとに SurE の変異酵素を設計し、基質選択性の拡張にも成功した。これらの検証の結果、基質 N 末端と C 末端アミノ酸の立体化学に対する選択性は PBP-type TE 全般に共通する基質認識機構であることが判明した。この機構を利用することで、著者はさらに環化様式の拡張にも着手した。

これまで機能の検証が行われた PBP-type TE は全て基質 N 末端と C 末端間の head-to-tail 環化を触媒するが、天然物によく見出される head-to-side chain 型の環化様式を触媒することはできない。そこで、著者は基質ペプチドの内部アミノ酸の側鎖に擬似 N 末端となる L 体アミノ酸を導入することで、分岐型ペプチド基質を設計した。PBP-type TE との酵素反応結果、当初の予想通り head-to-side chain 型の環状ペプチドが効率的に生成した。

以上のように、著者は新規ペプチド環化酵素の発見から、その触媒応用を目指した研究を展開した。詳細な酵素機能解析によって基質選択性を明らかにし、さらに基質認識機構に基づく合理的な基質の設計により、多様な環状ペプチドを効率的に化学−酵素合成する手法を考案した。したがって本研究成果は独創性が高く、かつ環状ペプチドに基づく創薬研究に貢献するものである。よって著者は、北海道大学博士（薬科学）の学位を授与される資格があるものと認める。