



Title	アルギニン選択的ビスプレニル化酵素の機能解析とペプチド修飾反応への適用
Author(s)	藤田, 慧
Description	この博士論文の全文は利用可能日以降に公開されます。
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第16788号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16788
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99633
Type	doctoral thesis
File Information	Kei_Fujita_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



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 藤田 慧

学 位 論 文 題 名

アルギニン選択的ビスプレニル化酵素の機能解析とペプチド修飾反応への適用

ペプチドは環化および脂肪鎖の付加やアルキル化修飾を施すことで生体膜透過性や代謝安定性、標的特異性が向上することが知られている。これまでに数多くの環状ペプチドの構造活性相関研究がなされてきたが、これらは残基の置換による活性の発現に必要な残基の特定と、活性向上を狙う側鎖残基に対する修飾の2段階で行われることが多い。しかし、残基の置換とアルキル基の導入等による活性の増減は必ずしも直交しないため、1段階目で活性を示さないかった類縁体も、側鎖残基のアルキル化により全く異なる活性を示す可能性を有している。一方で多様な側鎖官能基が混在するペプチドに対して位置選択的かつ化学選択的に環化やアルキル化修飾を施すことは容易ではなく、多段階の保護・脱保護や金属触媒の使用および多大な時間と労力がかかる精製作業を必要とする。したがって段階的な手法による高活性類縁体の獲得においては上記のような側鎖修飾により活性が回復するような類縁体を見落とす可能性が高い。この課題を解決するためには、環化と側鎖アルキル化を簡便かつ高効率で行う手法が必要となる。そこで本研究では天然物の生合成における修飾酵素に着目した。

シアノバクチンは藍藻類が産生する環状ペプチド天然物の一群、シアノバクチンの多くは、生合成過程においてシアノバクチンプレニル基転移酵素 (PT) により側鎖官能基上へプレニル基が導入される。これら PT は修飾部位に対して厳密な位置選択性を示す一方、それ以外の部分構造に対しては比較的高い基質許容性を示すことから、ペプチドの官能基選択的アルキル化修飾ツールとしての利用が検討されている。しかしこれまでに機能解析が行われてきた PT は、鎖状ペプチドの主鎖アミンやカルボン酸、Ser、Thr、Tyr、Trp、His 側鎖官能基を修飾対象とするものに限られていた。本研究は、Arg 側鎖グアニジン部位に2つのプレニル基を有する初のシアノバクチン argicyclamide 類に着目し、その生合成経路から Arg 側鎖選択的なビスプレニル化酵素 AgcF を同定した。本酵素が argicyclamide のプレニル化に特化した PT であり、基質選択性が非常に厳格であることを明らかにした。さらにゲノムマイニングにより、基質選択性が非常に寛容なホモログ酵素 DciF を見出し、本酵素の機能解析を行った。DciF は AgcF と比較して寛容な基質選択性を有することを明らかにし、X 線結晶構造解析とドッキングシミュレーションを通じて DciF の触媒機構とプレニル化回数制御の構造基盤を解明した。最後に DciF をペプチド環化酵素 PBP-type TE 組み合わせることで効率的かつ簡便なプレニル化環状ペプチド合成法を開発した。

1. 新規シアノバクチンプレニル基転移酵素 AgcF の同定

淡水性藍藻 *Microcystis aeruginosa* NIES-88 より単離された argicyclamide A は特徴的な N^{α} -ビスプレニルグアニジン構造を有し、B は N^{α} -モノプレニルグアニジン構造を有していた。これら argicyclamide 類はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌を含むグラム陽性細菌に対して抗菌活性を示し、その活性はグアニジン部位に導入されたプレニル基の数に依存して増強されたことから、プレニル化修飾が生物活性発現に重要であることが示唆された。そこで argicyclamide の生合成において Arg 残基のプレニル化を担う酵素の同定を目指すこととした。

Argicyclamide の構成アミノ酸が全て L-アミノ酸であることから、本化合物がリボソーム翻訳系翻訳後修飾ペプチド (RiPPs) であると推測した。そこで、生産菌 NIES-88 の全ゲノム解読を行い、argicyclamide C の配列をクエリとして前駆体ペプチド遺伝子を探索した。その結果、見出した候補遺伝子 *agcE* の近傍に既知のシアノバクチン PT と相同性を示す機能未知遺伝子 *agcF* を見出した。そこで組換え AgcF を調製し、argicyclamide C をプレニルアクセプター、DMAPP をプレニルドナーとした *in vitro* 酵素反応を行った結果、時間依存的にモノプレニル化体 argicyclamide B およびビスプレニル化体 A へと連続的に変換された。したがって本酵素が初の Arg 選択的 PT であることが実証された。AgcF の基質選択性を検証した結果、本酵素は argicyclamide の Arg 残基を他のアミノ酸に置換した環状ペプチドや異なる骨格を有する基質に対しては活性を示さず、高度に argicyclamide の骨格に対して選択的であることが明らかとなった。

2. アルギニン選択的ビスプレニル化酵素 DciF の発見と機能解析

より寛容な基質許容性を示す Arg 選択的 PT を探索するため、AgcF をクエリとした BLAST 検索および系統解析を行った。その結果、複数の推定 Arg 選択的 PT を見出し、それらが AgcF の属するサブクレード 1、autumnalamide 生合成における Arg- N^{α} モノプレニル化酵素 AutF が属するサブクレード 2、そして機能未知の PT のみからならサブクレード 3 へと細分化可能であることが明らかとなった。そこでサブクレード 3 に属する機能未知 PT の基質選択性が寛容であることを期待して、この中から DciF の機能解析を行った。DciF は鎖長や配列の異なる複数の鎖状・環状ペプチドに対して Arg- N^{α} ビスプレニル化を触媒し、非常に寛容な基質許容性を有することが明らかとなった。さらに X 線結晶構造解析により DciF の *apo* 構造を 2.6 Å の分解能で決定し、モノプレニル Arg および DMAPP とのドッキング解析を行った結果、E49、H167、T134 と基質の間に相互作用が観察された。これら残基をそれぞれ Ala へと置換した変異酵素はプレニル化活性を完全に失ったことから、E49、H167、T134 が DciF の触媒する Arg- N^{α} ビスプレニル化に必須であることが示された。さらに、2 回目の反応時に基質に結合したプレニル基を収容するポケット構造を触媒残基近傍に見出し、本ポケットの容積がプレニル化回数を制御することを明らかにした。本ポケット構造の容積は DciF においては主に G65 が、AutF においては D65 が決定しており、この 1 残基の置換のみによって Arg- N^{α} ビスプレニル化酵素とモノプレニル化酵素が相互に変換可能であることが示された。なお DciF において G65 を Leu へと置換した変異酵素はシアノバクチン PT では初となる基質選択性が寛容な Arg- N^{α} モノプレニル化酵素であり、野生型の DciF と変異 DciF を使い分けることにより広範な基質に対してモノ/ビスプレニル化を選択的に触媒可能となった。

3. DciF を用いたプレニル化環状ペプチドの合成

当研究室で開発されたペプチド環化酵素 PBP-type TE を用いた化学酵素的環状ペプチド合成法と基質選択性が寛容な Arg- N^{α} ビスプレニル化酵素 DciF を組み合わせることでプレニル化環状ペプチドの簡便かつ効率的合成手法の開発を目指した。PBP-type TE を用いた環状ペプチド合成法は生物活性を示す副生成物を生じないため、酵素反応物を精製操作なしで活性試験に供することが可能である。そこで結核菌に対して抗菌活性を示す環状ヘキサペプチド wollamide B1 をモデル基質として配列中に L-Arg と D-Arg を両方含む鎖状基質を用いて PBP-type TE のひとつ、WolJ による環化、および DciF によるプレニル化を逐次的に行った。WolJ は定量的に鎖状ペプチドを環化し、DciF は L-Arg 選択的にビスプレニル化を触媒し、96% の高い変換効率でビスプレニル化環状ペプチドが得られた。さらに反応条件を最適化することで、環化およびプレニル化をワンポットで行った場合にも同等の変換率が得られ、本手法が簡便かつ高効率な環状ペプチド構造多様化法であることが示された。