

「短鎖環状ペプチドの酵素・生物合成」

研究期間：2020年10月～2023年3月

研究者：松田 研一

加速フェーズ期間：2023年4月～2024年3月

1. 研究のねらい

環状ペプチドは、直鎖状ペプチドに比べ標的特異性、膜透過性、分解酵素への耐性に優れる。実際、抗生物質 daptomycin や免疫抑制剤 cyclosporine 等の臨床応用された天然物や合成ペプチド医薬品が環状骨格を有する。中でも 10 残基以下のアミノ酸から構成される短鎖環状ペプチドは優れた代謝安定性・組織移行性を示す。実際、哺乳類で経口吸収性が報告されている環状ペプチドのうち 9 割以上を 10 残基以下の短鎖環状ペプチドが占める。このため、短鎖環状ペプチドの効率的な合成法の開発は、医薬品開発から製造プロセスまで、広い範囲に波及効果を与えうる。現状、ペプチドの環化反応は、煩雑な保護基の着脱工程や、高価な縮合剤、大量の有機溶媒を要する点で課題を抱えている。また縮合剤の使用は分離困難な異性体の副生成物を生じる。ペプチド結合はトランス配座が優先するため反応点を近づけることが難しく、鎖長が短くなるほど環化反応は特に困難である。一方で環状ペプチドは天然からも数多く単離されており、これらの生合成を担う環化酵素を触媒として用いることで、環状ペプチドの効率生産が可能になると考えられてきた。実際、微生物や植物由来のペプチド環化酵素は研究試薬として市販されている。しかしこれらはいずれも 10 残基以上の比較的大きな環状ペプチドの環化反応に限定的である。結果として、10 残基以下の短鎖環状ペプチドの合成は、化学的にも酵素的にも困難である。

一方、我々はこれまで放線菌の非リボソーム性環状ペプチド生合成経路において、新規なペプチド環化酵素ファミリー「ペニシリン結合タンパク質型チオエステラーゼ (PBP-type TE)」を見出してきた。代表的な PBP-type TE である SurE は、構造の全く異なる 2 種の短鎖環状ペプチドの生合成に関与し、非常に寛容な基質選択性を有する。本酵素は短鎖環状ペプチド合成のための生体触媒ツールとして高いポテンシャルを有する一方、これまでの解析から、環化点となる残基に対して一定の選択性を示すことが判明している。

そこで本研究では、SurE の基質選択性の分子基盤を解明する。得られた知見に基づき、酵素工学的的手法により選択性を拡張した改良生体触媒を創成する。これにより、これまで効率的な合成法が存在しなかった短鎖環状ペプチドを精度高くかつ安定して供給する、汎用性・環境調和性に優れる合成技術の開発を目指す。加えて、本酵素を活用した合成生物学により、短鎖環状ペプチドの生物合成法の確立を試みる。

加速フェーズでは、ペプチド環化酵素 PBP-type TE の基質一般性のさらなる解明を目指した。具体的には、PBP-type TE が非ペプチド性オリゴマーの環化に適用可能か検証した。また、head-to-tail 型の環化反応を選択的に触媒する本酵素ファミリーが、head-to-side chain 型の環化反応に適用可能か検証した。これに加え、PBP-type TE を固定化し、環状ペプチドのフロー合成系の確立を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、我々が独自に見出した新規酵素ファミリーPBP-type TE を活用した短鎖環状ペプチドの効率合成法の確立を目指す。これにあたり、PBP-type TE の基質選択性の分子基盤を解明することを第一目標とした。また得られた知見に基づく酵素工学により、現状でSurEが抱える基質選択性の課題を克服することを目指した。まず、異なる基質選択性を有するホモログ酵素を比較し、①基質鎖長、②環化点の立体化学、③C 末端側鎖残基の 3 つのポイントに焦点を絞って選択性の分子基盤の解明を目指した(詳細 I)。

期間内の研究により、①②についてはそれぞれ PenA, DsaJ との比較解析により、選択性に関わるタンパク質部分構造を同定した。

また本研究では、SurE を活用して非天然型環状ペプチドを生物合成するための、合成生物学的手法の確立を目指した(詳細 II)。しかし、計画を進める過程で人工非リボソームペプチド合成酵素の創成が技術的に困難であることが判明したため、生物合成法の確立には至らなかった。

(2) 詳細

I. 「PBP-type TE の基質選択性の分子基盤の解明」

PBP-type TE の基質は、C 末端にチオール性の脱離基を有する 5~10 残基程度のペプチドであり、分子量 1000 弱の中分子である。本研究では PBP-type TE の基質選択性を検証するにあたり、①基質鎖長、②環化点の立体化学、③C 末端側鎖残基の 3 つのポイントに焦点を絞って選択性の発現メカニズムを解明し、選択性の分子基盤の包括的な理解を目指した。そのうえで、これら3点が明確に異なるホモログ酵素を比較した。

① 鎖長選択性について(引用文献1として発表済)

PenA は 5 残基の環状ペプチド pentaminomycin 類、BE-18257 類の生合成を担う PBP-type TE である。8-10 残基のペプチドを環化する SurE とは基質サイズに対する選択性が異なる可能性を考え、PenA 組換え酵素を用いてその鎖長選択性を SurE と比較した。その結果、これらの酵素は基質の基質サイズに対して異なる選択性を示した。テトラペプチドを基質とした反応において、SurE は単量環化体及び二量環化体を与えたのに対し、PenA は二量環化体を与えず、単量環化体を選択的に与えた(図 1)。このことから PenA は SurE と比較して、より短鎖のペプチド基質の環化に特化した環化酵素であることが明らかとなった(引用文献 1)。また PenA のモデル構造を SurE のアポ体の構造と比較したところ、C 末端側のリポカリンドメインのターンループが 10 残基ほど伸長しており、基質ポケットの入り口に覆いかぶさるように位置することが示唆された。このことから本ループ構造が PenA に短鎖ペプチド選択性を付与する重要な構造モチーフである可能性が示唆された(引用文献 1)。

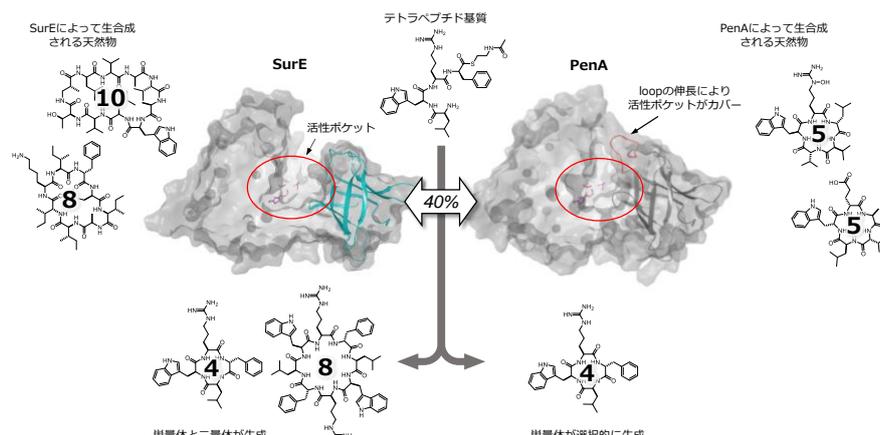


図 1. SurE (左) と PenA (右、モデル構造) の基質選択性と構造の比較

II. 「PBP-type TE を活用した合成生物学による非天然短鎖環状ペプチドの生物合成」

SurE は試験管内だけでなく細胞内でも寛容な選択性を示す。実際、SurE は構造の全く異なる 2 種の環状ペプチドの生合成を担うことに加え、人工的なペプチド合成酵素にも作用し、非天然型環状ペプチドの生物合成も可能であった (Matsuda, K. *et al. Nat. Catal.* 2020)。そこで本研究では、天然型のペプチド合成酵素を改変し、これと SurE 遺伝子を組み合わせることで人工的な環状ペプチド合成経路を細胞内で構築し、非天然短鎖環状ペプチドの生物合成の方法論を確立することを目指した。

当初、人工非リボソームペプチド合成酵素は天然型遺伝子の相同組換えにて創出することを想定していたが、実験を進めるにつれ、同手法により、細胞内で機能する人工酵素を創出することは非常に困難であることが判明した。その理由として、非リボソームペプチド合成酵素が非常に巨大であること (数 MDa)、また繰り返し配列を多く含み狙い通りの組換えが起きづらいことが考えられる。また、狙い通りの配列の酵素が創出できた場合も、生合成中間体を受け渡す酵素ドメインのペアは人工的であるため、触媒機能の担保は困難である。結果として、本研究期間内に同研究テーマに関する成果は得られなかった。今後、非リボソームペプチド合成酵素の人工改変についての知見が集積すれば、当初計画が実現可能になると考えられる。また、人工酵素創出においても、相同組換えではなく、より精度の高い CRISPR-Cas9 システムを使用する等の工夫が必要であった。

III. 「ジオールを脱離基とする環状ペプチドの化学-酵素合成法の開発」(研究成果リスト4)

当初計画案には含めていなかったが、環化酵素の基質合成経路の最適化を行い、これに基づく効率的な環状ペプチドの化学酵素合成法を開発した(図5下段)。本技術について特許出願を行っている(「環状ペプチドの効率的な化学-酵素合成方法」、特願 2022-24966、PCT/JP2022/038513)。これまでの研究では、基質の C 末端にチオエステル型の脱離基を採用してきた(図5上段)が、ペプチドを固相から切り出したのち、縮合剤によって C 末端に脱離基を導入する際、C 末端残基の異性化が進行し、分離困難なエピマーが生じる問題があった。このため個々の基質合成に多大な労力がかかり、結果的に基質選択性の網羅的な検証の大きな妨げとなっていた。そこで、合成がより簡便な脱離基を検討した結果、エチレングリコール(EG)を脱離基として用いた場合にも SurE による環化反応が進行することを見出した(図6)。そこで EG を基質 C 末端に導入する手法を検討した。その結果、ペプチド合成後に液相で脱離基を導入するのではなく、予め脱離基を担持した固相上でペプチドを伸長する経路によって基質を高効率で合成できることを見出した。これにより、これらの問題を同時に解決し、従来では 30%程度だった基質の合成効率を 80%以上に引き上げることに成功した。EG は安価でありプロセス合成に非常に好適であるため、今回新たに確立した環状ペプチドの化学酵素合成の方法論は、大量に環状ペプチドを簡便にかつ、安価に生成する優れた技術となると期待される。本技術は、副生成物が生じる液相での縮合反応を回避できるため精製工程を省略でき、これまでにない種類の基質の多検体並列合成が可能にな

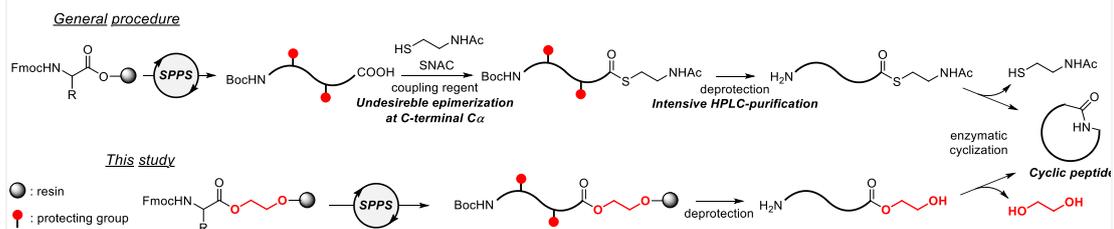


図5. 液相での縮合反応を介する従来の基質合成法と新たに確立したEGを脱離基とした基質合成法の比較

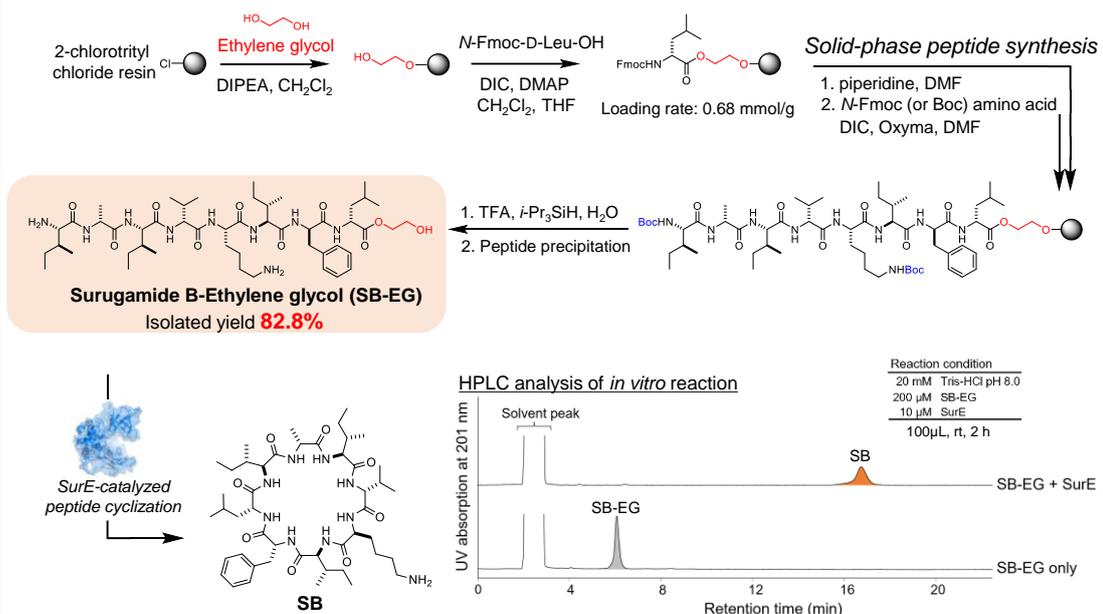


図6. EGを脱離基とした基質合成と酵素反応を、途中精製を介することなく連続して行うシームレスな化学酵素合成法

った。合成したライブラリーを用いて基質 *N* 末端残基に対する選択性を検証した結果、SurE はほぼすべての L-アミノ酸残基を許容した。また、配列内部に PEG など非アミノ酸残基を有する環状ポリマーの合成においても本手法は利用可能であり、検証に用いた 5 アミノ酸残基相当から 23 アミノ酸残基相当の鎖長の基質を定量的に環化した(図 6)。この際、鎖長は 10 アミノ酸残基相当の基質がもっとも高い反応速度で環化され、鎖長が長くなるほどその速度は低下した。本結果から、SurE は環化点に適切なアミノ酸残基を有する環状中分子ポリマーの合成に適用可能であることが示された。

確立した EG を脱離基とする化学酵素合成法を用いて、様々な環状ペプチドの合成を試みた。SurE, WolJ, SurE 変異体 G235L を用いて、5 残基の抗菌性環状ペプチドアナログ deoxypentaminomycin C(環化収率:96%), 6 残基の抗結核菌環状ペプチド wollamide B1(環化収率:98%), D-アミノ酸を一切含まない 9 残基の環状ペプチド desprenylagaramide C(環化収率:99%)がいずれも高収率で合成可能であった。また、EG 脱離基は異なるペプチド環化酵素ファミリーにも適用可能であり、TycC-TE を用いて 10 残基の抗菌性環状ペプチド tyrocidine A(環化収率:70%)を合成可能であった。

上記の研究成果は国内外の企業から注目を集めており、これまで複数の国内企業から打ち合わせの申し出をいただき、今後の連携を模索している状況である。

VII. その他(加速フェーズ期間内に実施)(成果リスト6)

IIIで開発した化学-酵素合成法によって合成される環状ペプチドは一般に高純度であり、酵素反応液を精製することなく、さらなる化学的・酵素的な修飾反応に直接供することができる。そこで、加速フェーズ申請当初は計画に含めていなかったが、化学-酵素合成法と銅触媒による alkyne-azido のクリック反応(CuAAC)を組み合わせることで、二環性ペプチドのワンポット合成が可能か検証した。側鎖にクリック素子を有するアミノ酸残基を配列内部に導入したオクタペプチド基質を酵素反応に供したところ、本基質は環状ペプチドへと定量的に変換された。酵素反応液を精製することなく、銅触媒とアスコルビン酸を添加しインキュベートしたところ、単環性オクタペプチドは二環性の環状ペプチドへと高効率で変換された。このことから化学-酵素合成法と CuAAC を連続して行う二環性ペプチドのワンポット合成が可能であることが判明した。本手法により二環性のヘキサペプチドおよびウンデカペプチドの合成も可能であった。

3. 今後の展開

本研究では、当初目標とした環化酵素の基質選択性の分子基盤を包括的に理解するには至らなかったものの、基質鎖長に対する選択性・末端残基に対する立体選択性を明らかにできた。今後は残る末端残基側鎖に対する選択性の構造基盤解明に挑む。

4. 自己評価

本研究課題は概ね順調に遂行できたと考えている。得られた成果を 1 報の論文として発表し、また本報告書作成時点で、もう 1 報が submit 直前の段階、さらにもう 1 報を執筆中という状況であ

り、論文発表という点から一定の成果につながったと考えている。2018年に我々が同酵素ファミリーを報告して以来、少なくとも3つの異なる海外の研究グループが同酵素ファミリーの研究に参入してきており、競争が激化している状況であるが、本研究で得られた成果によって国際的なイニシアチブを維持できたと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 8件

1. Matsuda, K., Fujita, K., Wakimoto, T. PenA, a penicillin-binding protein-type thioesterase specialized for small peptide cyclization. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *48*, kuab023.

抗菌性環状ペプチド pentaminomycin 類、BE-18257 類の生合成遺伝子クラスターにコードされた機能未知の SurE ホモログ酵素 PenA の機能解析を行った。本酵素は *in vitro* で pentaminomycin C 類縁体ペプチド配列を定量的に環化したことから、ペプチド環化酵素として機能することが明らかになった。本酵素は SurE とは明確に異なる鎖長選択性を有しており、4 残基の非常に短いペプチド鎖に対しても選択的に単量環化体を与えた。PenA モデル構造の解析から、短鎖ペプチドの環化に関与すると考えられる伸長したループ構造を見出した。

2. Phan, C.-S.[#], Matsuda, K.[#], Balloo, N., Fujita, K., Wakimoto, T.*^{*}, Okino, T.*^{*} Argicyclamides A-C unveil enzymatic basis for guanidine bis-prenylation. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 10083-10087. ([#]equal contribution)

淡水生シアノバクテリアより特異なビスプレニルグアニジン構造を有する環状ペプチド argicyclamide 類を発見した。グアニジンのビスプレニル化は抗 MRSA 活性の発現に重要であった。またグアニジンビスプレニル化酵素 AgcF を発見し、その基質選択性を詳細に解析した。プレニル化グアニジンは植物や微生物由来の天然物にしばしばみられる特異な官能基であるが、その生合成酵素が明らかになったのは今回が初めてである。

3. Matsuda, K.*^{*}, Arima, K., Akiyama, S., Yamada, Y., Abe, Y., Suenaga, H., Hashimoto, J., Shinya, K., Nishiyama, M., Wakimoto, T.*^{*} A natural dihydropyridazinone scaffold generated from a unique substrate for a hydrazine forming-enzyme. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 28, 12954-12960. (*co-corresponding authors)

ゲノム情報を指標にした天然物探索を行い、医薬品母核として盛んに研究されてきたジヒドロピリダジノン環を有する初めての天然物 actinopyridazinone 類を放線菌より発見した。またその特異な環構造を全合成によって実証した。またその生合成における鍵中間体であるヒドラジンを同定し、微生物のもつヒドラジン生合成経路の多様性を明らかにした。actinopyridazinone 類の生合成酵素の利用することで、本複素環の効率的な合成や構造展開が可能になる。

研究期間累積件数: 12 件(加速フェーズ実施後更新)

4. Kobayashi, M., Fujita, K., Matsuda, K.*^{*}, Wakimoto, T.*^{*} Streamlined chemo-enzymatic synthesis of cyclic peptides by non-ribosomal peptide cyclases. *J. Am. Chem. Soc.*, **2023**,



145, 3270–275. (*co-corresponding authors) 「※加速フェーズ実施の成果」

C末端にエチレングリコール付加したペプチドの簡便かつ高収率な合成法を考案し、これを PBP-type TE の酵素反応に供することで環状ペプチドの化学-酵素合成法を確立した。これにより SurE の基質一般性を網羅的に検証した。異なる基質選択性を示す野生型酵素の活用や論理的な酵素改変によって、合成できる環状ペプチドの多様性を拡張した。

5. Arima, K., Akiyama, S., Shin-ya, K., Matsuda, K.*, Wakimoto, T.* *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, e202305155. (*co-corresponding authors) 「※加速フェーズ実施の成果」

Actinopyridazinone の有する特異な N-N 結合含有ヘテロ環 dihydropyridazinone 環の形成機構解明を目指した。生合成遺伝子を網羅的に破壊し、環化直前の鍵中間体を同定した。in vitro における酵素反応を再構成することで、キャリアタンパク質を介した特異なヘテロ環形成メカニズムを明らかにした。本研究により actinopyridazinone 生合成におけるほぼすべての段階を明らかにした。

6. Kobayashi, M., Onozawa, N., Matsuda, K.*, Wakimoto, T.* Chemoenzymatic tandem cyclization for the facile synthesis of bicyclic peptides. *Commun. Chem.* 2024, 7, 67. (*co-corresponding authors) 「※加速フェーズ実施の成果」

本研究では、新たな化学-酵素合成法で合成された環状ペプチドは高純度であり、酵素反応液の精製なしに修飾反応に供することができることを示した。さらに、化学-酵素合成法と銅触媒によるクリック反応を組み合わせ、二環性ペプチドのワンポット合成の可能性を検証した。アミノ酸残基にクリック素子を導入した基質を酵素反応に供すると、環状ペプチドへの変換が見られた。銅触媒とアスコルビン酸を添加することで、単環性ペプチドが二環性の環状ペプチドへと高効率で変換された。この手法により、二環性ペプチドのワンポット合成が可能であり、ヘキサペプチドやウンデカペプチドの合成も実現した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 5 件 (特許公開前のものも含む)

1	発明者	脇本敏幸、松田研一、小林雅和
	発明の名称	環状ペプチドの効率的な化学-酵素合成方法
	出願人	北海道大学
	出願日	2021/10/18、2022/2/21、2022/10/17
	出願番号	特願 2021-170218、特願 2022-24966、PCT/JP2022/038513
	概要	エチレングリコールを脱離基として用いることで、環化基質を高純度で簡便に固相合成し、これを SurE などの PBP-type TE もしくは、TycC-TE を生体触媒とするペプチド環化反応に供することで、環状ペプチドを効率的に化学酵素合成する手法を開発した。
2	発明者	脇本敏幸、松田研一、小林雅和
	発明の名称	酵素を用いたペプチドライゲーション
	出願人	北海道大学
	出願日	2021/9/27
	出願番号	特願 2021-157054



	概 要	SurE などの PBP-type TE を用いることで、脱離基を有するアシルドナー基質と脱離基を有さないアクセプター基質のライゲーション反応を行う手法を開発した。
--	-----	--

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- 2023 年 9 月、第 23 回生体触媒シンポジウム企業注目賞(加速フェーズ後追記)
- 2022 年 9 月、令和 4 年度日本生薬学会 学術奨励賞
- 2021 年 10 月、第 63 回天然有機化合物討論会 奨励賞 口頭発表の部
- 2021 年 10 月、第 57 回ペプチド討論会 若手口頭発表優秀賞
- 2021 年 10 月、令和 3 年度 日本薬学会生薬天然物部会 奨励研究
- 松田研一, 脇本敏幸, 新規ペプチド環化酵素 PBP-type TE の発見と機能解析, ファインケミカル, 4 月号, 2021.