



北海道大学大学院工学研究院 小笠原 泰志

ペプチドの構造に多様性を与える新規酵素の探索

はじめに

アミノ酸の重合体であるペプチドは、生命活動におけるシグナル分子や抗生物質、毒などとして様々な役割を担っている。天然物として単離されるペプチドは修飾されたものが多く、その骨格に非タンパク質性アミノ酸やD-アミノ酸を含有するもの、N-メチル化や環状化されたものなどが存在する。一般に修飾されたペプチドは高い生理活性も有すると同時に、高い生体内安定性（ペプチダーゼ耐性）も持つことが知られている。本研究ではペプチドに構造多様性を付与するペプチド修飾酵素について解析し、いくつかの新規酵素を見出した。

1. 新規ペプチドライゲースの相同遺伝子の機能解析

これまで当研究室では、放線菌が生産するペプチド系抗生物質であるフェガノマイシンの生合成に関与する新規ペプチドライゲース（PGM1）を見出している（図1A）。本酵素はアミノフェニルグリシン誘導体のカルボキシル基をATPの存在下でリン酸無水物へと活性化させ、ここにリボソームによって合成されたオリゴペプチドのN末端が求核攻撃することでアミド結合形成反応を触媒する。これはATP-grasp型のアミド結合形成酵素の中で、ペプチドを求核剤として用いる初めての例である。本酵素は求核剤基質の認識が非常に緩く、様々なペプチドを受容可能であったことから、ペプチドのN末端を非タンパク質性アミノ酸で修飾する酵素として応用面でも興味が持たれた。ペプチドライゲースの多様性や一般性を明らかにするため、PGM1相同遺伝子の機能解析を行った。

初めに、フェガノマイシンと構造が類似しているレゾルシノマイシンの生合成に注目した。この場合、アミド結合はアミノフェニルグリシン誘導体とグリシンとの間で起こることが予想される。実際に生産菌のゲノム解析を行ったところ、その生合成遺伝子クラスターにはPGM1相同遺伝子（*res5*）が含まれ

ていた。また、Res5がレゾルシノマイシンの生合成におけるアミド結合形成に関与していることを、クラスターの異種宿主発現および遺伝子破壊実験により証明した（図1B）。

続いて、PGM1の相同遺伝子をゲノムデータベースに探索した結果、一部の放線菌に見出すことができ、それらは何れも固有な遺伝子群とクラスターをなしていた。この中で3つの放線菌、*Micromonospora* sp., *Salinispora tropica*, および *Streptomyces mobaraensis* に見出された遺伝子クラスターは互いに類似しており、6つの遺伝子をすべて共通に含んでいた。このような遺伝子構成のクラスターはこれまで知られておらず、その代謝産物は新規な骨格を持つことが期待された。そこで、それら推定生合成遺伝子クラスターを各々異種宿主である *Streptomyces lividans* で発現し、培養液を分析した結果、何れにおいても特異的な代謝産物が検出された。また構造解析の結果、それらはすべて新規化合物（ケトメシシンと命名した）であることが分かった。図2には2つの構造のみ示すが、ケトメシシン類はいずれも通常のペプチド結合がカルボニルメチレン構造に置き換わったシュードジペプチド構造を有しており、そのN末にアミノアミノ酸がアミド結合したシュードトリペプチドである。

その生合成について検討した結果、PGM1の相同酵素であるKtmDはケトメシシン生合成の最終段階でアミド結合形成反応を触媒する（シュード）ジペプチドライゲースであることが明らかにした（図1C）。これはC末基質に（シュード）ジペプチドを認識する初の例であり、先のアミノ酸を求核剤とするRes5と合わせて、ペプチドライゲースの多様性を示す重要な知見である。また、N末基質のアミノ-L-アルギニンについては2分子のL-アルギニンからアミノ基転移酵素（KtmE）によって生成されることも *in vitro* で確認した。

2. カルボニルメチレン型シュードジペプチドの生合成

ケトメシシン類のシュードジペプチドにみられるカルボニルメチレン構造は、アミドの生物学的等価体である。これまで、カルボニルメチレン構造を持つシュードペプチド天然物はペプチダーゼ阻害剤として単離されたアルファメニン類にのみが知

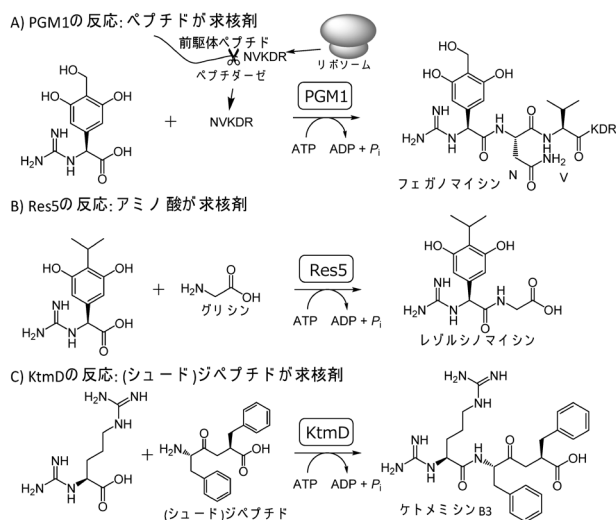
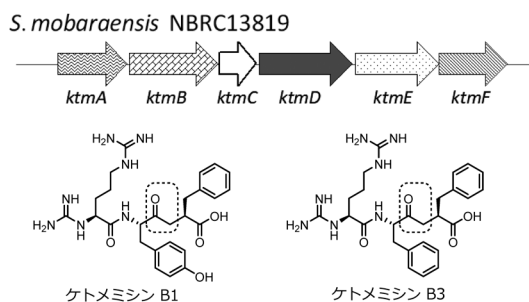


図1. ペプチドライゲースおよびその相同酵素の反応

図2. *S. mobaraensis*由来の生合成遺伝子クラスターおよびケトメシシンの構造

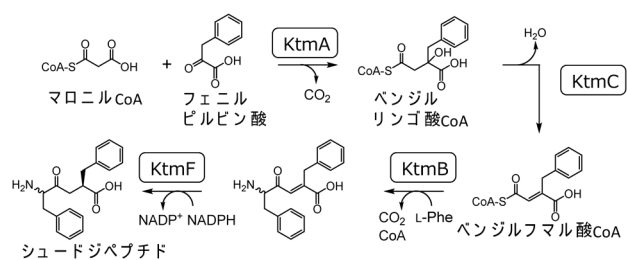


図3. シュードジペプチド部の生合成経路

られているが、このシュードジペプチド構造は合成品ではヒトライノウイルス C3 プロテアーゼ阻害剤であるルピントリビルの部分構造として用いられるなど重要である。これまでその生合成の報告はないことから解明を行った。遺伝子クラスターの6つの遺伝子の内、残りの4つの遺伝子が生合成に関与すると予想されたため、各反応を組換え酵素を用いて検証した(図3)。初発反応を担うと考えたアルドラーゼ(KtmA)はクエン酸の分解に関わるクエン酸リアーゼと相同性を有しており、当初アセチル CoA とフェニルピルビン酸からベンジルリンゴ酸 CoA が生成すると予想し酵素反応を行ったが反応は進行しなかった。しかし、アセチル CoA の代わりにマロニル CoA を用いた場合には反応が脱炭酸を伴って進行し、ベンジルリンゴ酸 CoA の生成が確認できた。続いて、脱水酵素(KtmC)をアルドラーゼ生成物と反応させたところ、ベンジルフマル酸 CoA へと変換された。さらに PLP 依存酵素である α -オキソアミン合成酵素(KtmB)が2回目の炭素-炭素結合形成を触媒し、最後に二重結合が還元酵素の KtmF により還元されシュードジペプチドが生成することを明らかにした。本経路では炭素-炭素結合形成を行う2つの酵素がシュードジペプチドの構成アミノ酸を決定しており、KtmA が C 末基質、KtmB が N 末アミノ酸基質の認識と選択に重要である。

3. 新規ペプチドグリカン生合成経路の解明

細菌の細胞壁の成分であるペプチドグリカンは、*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)と*N*-アセチルムラミン酸(MurNAc)の繰り返し構造を持つ糖鎖にオリゴペプチドが結合し、さらにペプチド鎖同士がクロスリンクした網目構造をしている。その生合成中間体である UDP-MurNAc-ペンタペプチドは UDP-MurNAc のカルボキシル基に L-Ala, D-Glu, *meso*-ジアミノピメリン酸, D-Ala-D-Ala が順次アミド結合することで形成される。本経路において、D-Glu はグルタミン酸ラセマーゼまたは D-アミノ酸アミノ基転移酵素によって生成される。しかし、植物病原菌の *Xanthomonas* 属細菌のゲノムには、UDP-MurNAc-ペンタペプチドを形成する遺伝子群のうち、D-Glu を供給する遺伝子のみが一切見いだせなかった。この事実は *Xanthomonas* において未知の D-Glu 供給系が存在することを示している。そこで、グルタミン酸ラセマーゼ欠損に由来する D-Glu 要求性大腸菌を用いて、D-Glu 要求性を相補する遺伝子断片を *Xanthomonas* ゲノムからショットガンクローニングで取得し、最終的に XOO_1319 及び XOO_1320 の2つが相補に必要であることが分かった。XOO_1319 は既知タンパク質との相同性は見られなかったものの XOO_1320 は既存の MurD と相同性を有していたことから、当初 XOO_1319 がグルタミン酸ラセマーゼと予想し、組換え酵素を用いて *in vitro* アッセイを行ったが活性を確認できなかった。しかし、UDP-MurNAc-L-

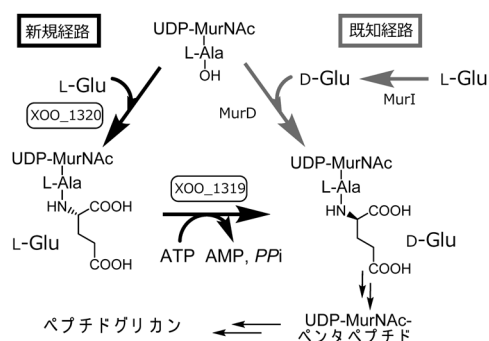


図4. 新規ペプチドグリカン生合成経路と XOO_1319 が触媒するペプチド異性化反応

Ala と L-Glu に2つの酵素を共に添加した場合には UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu の生成が確認できた。これを足掛かりに組換え酵素を用いた解析を行い、XOO_1320 が UDP-MurNAc-L-Ala に L-Glu を結合する酵素であり、続いて XOO_1319 が UDP-MurNAc-L-Ala-L-Glu の末端のグルタミン酸を異性化し UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu を生成することを明らかにした(図4)。XOO_1319 は、既知酵素と全く相同性がなく、特徴的なモチーフ配列や補酵素結合領域も持たない。また、反応の補基質に ATP を用い AMP を副生するが、この点でも既知酵素とは明確に異なり興味深い。XOO_1319 はペプチド鎖上のアミノ酸の立体反転酵素としての応用が期待できる。

おわりに

微生物の二次代謝経路は新規な反応を触媒する酵素の宝庫である。本研究ではペプチド天然物の構造多様性に注目し、これまでの知見では説明できない3つの新規ペプチド修飾反応を明らかにした。これら結果は、自然が生み出したペプチド修飾酵素の多様性を示す点で興味深いだけでなく、遺伝子改変による非天然型の新規ペプチド化合物生産のための基盤としても重要である。今後も、ゲノムマイニングや有機化学的な手法を駆使した新規酵素の探索や生合成の解明、新規化合物の探索研究に取り組んでいきたいと考えている。

謝 辞 本研究は、北海道大学大学院工学研究院・応用生物化学研究室で行われたものです。研究の機会を与えていただき、研究を進めるにあたって終始ご指導ご鞭撻を賜りました北海道大学教授・大利徹先生に心より感謝申し上げます。また、天然物化学の基礎からご指導頂きました東京工業大学教授・(故)柿沼勝己先生、同大教授・江口正先生、ポスドク研究でご指導頂きました米国テキサス大学オースティン校教授・Hung-wen (Ben) Liu 先生に深く御礼申し上げます。日頃からご助言と激励をいただきました北海道大学教授・及川英秋先生、同大助教・佐藤康治先生、福井県立大学教授・濱野吉十先生、東京工業大学准教授・工藤史貴先生、広島大学准教授・荒川賢治先生に深謝いたします。また、本研究の遂行にあたり北海道大学・福士江里先生、東京大学・降旗一夫先生、所属研究室の学生など多くの方々にご助力を頂きました。ここにすべての方のお名前を挙げることはできず残念ですが、皆様に深く感謝申し上げます。最後に、本奨励賞にご推薦下さいました日本農芸化学会北海道支部長・福島道広先生ならびにご支援賜りました諸先生方に厚く御礼申し上げます。