

# 新規 His ゲラニル化酵素による擬天然プレニル化ペプチドの試験管内生成

東京大学大学院 理学系研究科 化学専攻 後藤 佑樹

## 【略歴】

2003年3月 京都大学工学部工業化学科 卒業  
2005年3月 京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻 修士課程 修了  
2008年3月 東京大学大学院工学系研究科先端学際工学専攻 博士課程 修了博士（工学）  
2008年4月 イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校化学科 Research Associate  
（日本学術振興会海外特別研究員）  
2009年10月 東京大学先端科学技術研究センター 助教  
2009年4月 東京大学大学院理学系研究科化学専攻 助教  
2011年12月 JST さきがけ「細胞機能の構成的な理解と制御」研究者 兼任  
2016年10月 東京大学大学院理学系研究科化学専攻 准教授

強い生物活性を示すペプチド性天然物には、通常のタンパク質には見られない特徴的な修飾構造が存在することが多い。これら天然物特有の局所骨格をもつ人工ペプチド（「擬天然ペプチド」と命名）を簡便に生産するべく、我々は人工改変翻訳系と多段階な化学的/酵素的翻訳後修飾とを組み合わせた試験管内人工生成系を開発してきた。これらの系では、遺伝子配列依存的に修飾構造含有ペプチドを発現合成できることから、薬剤候補ペプチドの大規模ライブラリーを簡便に構築し、新規生物活性ペプチドの開発に繋がれると期待している。本講演では、本アプローチの一環として、新規ペプチドゲラニル化酵素の発見・同定とこれを擬天然プレニル化ペプチドの試験管内生成に応用展開した例について紹介する。

## 新規ゲラニル化酵素 LimF の発見と同定

既存のシアノバクチンプレニル転移酵素 (PTase) の配列情報を基にしたゲノムマイニングおよび配列類似性ネットワーク解析により、既存の PTase 群が形成するクラスターには属さない、Limothrix sp. CACIAM 69d 由来のタンパク質に注目した。本タンパク質は、系統樹解析において既知の PTase 群とは独立したクレードを形成していることから、未知のプレニル化活性を持っていることを期待した (Fig. 1a)。LimF と名付けたこのタンパク質は、前駆体ペプチド・プロテアーゼ・大環状化酵素を含んだ典型的なシアノバクチン合成遺伝子クラスターにコードされている (Fig. 1b)。大腸菌で異種発現した LimF の試験管内酵素反応の結果、当該遺伝子クラスターにコードされた推定天然シアノバクチン limnothamide を提唱するとともに、LimF が His-C2-forward ゲラニル化を触媒する新規 PTase であることを見出した (Fig. 1c)。

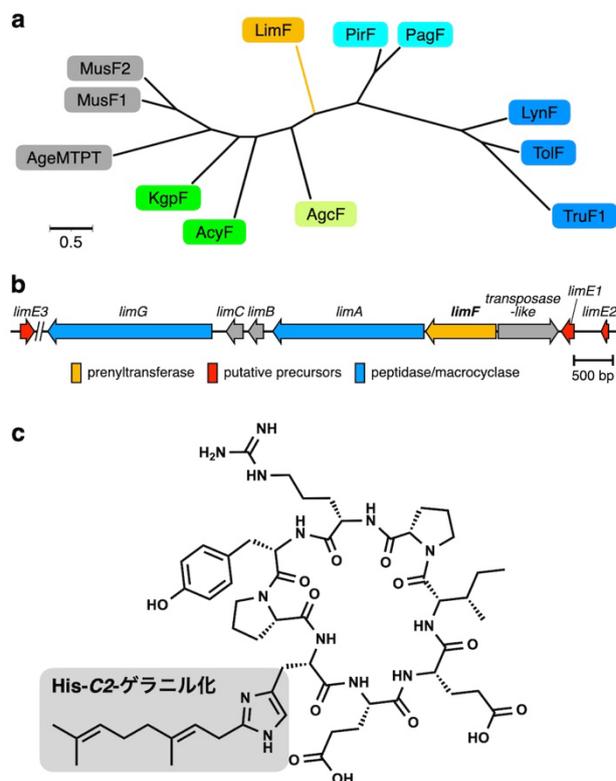


Figure 1. ゲノムマイニングによる新規プレニル化酵素LimFの発見

## LimF を用いた擬天然プレニル化ペプチドの生産

我々はこれまでに、チオエーテル閉環型大環状ペプチド (teMPs) をリボソーム合成可能な改変翻訳系 (flexible *in vitro* translation, FIT システム) を構築し、teMP ランダムライブラリーの試験管内分子選択による生物活性人工環状ペプチドの創製技術を確立している。そこで、FIT システムに LimF を組み合わせた FIT-LimF システムを構築し、翻訳合成した teMP をワンポットで LimF 修飾できるかどうかを検討した。その結果、ペプチド配列の長さ・配列組成・環サイズに関わらず、LimF が多彩な人工 teMP をゲラニル化できることを実証した (Fig. 2)。

さらに、LimF をペプチド医薬品のレートステージアルキル化に応用できるかどうかについても検証した。FDA に承認された 2 つの His 含有ペプチド医薬品 (性腺刺激ホルモン放出ホルモンのアナログである leuprorelin とアミリンアナログ pramlintide) を LimF で処理したところ、ほぼ定量的なゲラニル化を観測した。さらに、LimF が 4,5-ジアルキル化イミダゾール部位を持つ非ペプチド性低分子薬物 cimetidine を効率的にゲラニル化することも見出した。これらの実験から、様々な生理活性ペプチドや非ペプチド性イミダゾール誘導体を化学的・位置選択的にゲラニル化する生体触媒として、LimF を応用活用できる可能性が示唆された。

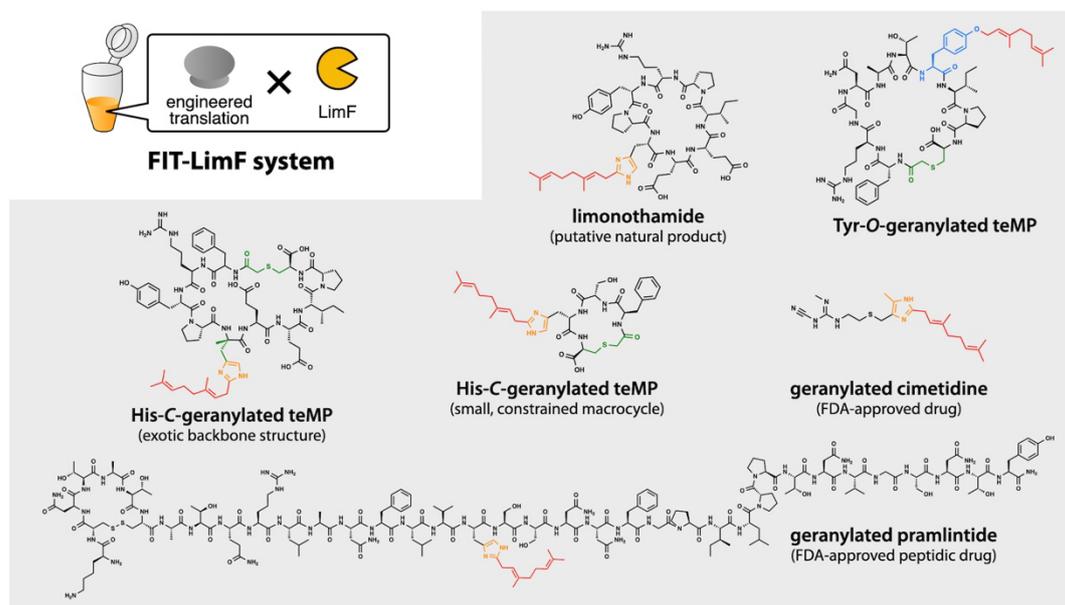


Figure 2. LimF を用いて生産可能な多彩な擬天然プレニル化ペプチドたち

## 今後の展望

LimF が広い配列許容性を示し、多彩なゲラニル化 teMP を生産できることを実証したことから、プレニル化 teMP のランダムライブラリーの構築の道が拓けた。我々が確立してきた teMP ライブラリーの試験管内分子選択技術を応用することで、将来的に望みの標的に作用する擬天然プレニル化ペプチドの創製技術に繋げることを目指している。また、LimF がイミダゾール含有小分子を修飾できたという知見を基盤として、本来ペプチド修飾酵素である LimF を各種小分子の化学修飾ツールとして流用する研究も展開する計画である。

## 謝辞

本研究は、東京大学大学院理学系研究科化学専攻の生物有機化学研究室 (菅研究室) で実施したものであり、また神奈川大学工学部の岡田正弘教授 (ゲノムマイニング) 及び横浜市立大学大学院医学研究科の仙石徹准教授 (結晶構造解析) との共同研究として行ったものです。貴重な助言を頂いた菅裕明教授はもちろん、Yuchen Zhang 博士・井上澄香氏・Dinh Thanh Nguyen 氏をはじめとした本研究に関する実験に貢献してくれた菅研メンバーに心より感謝致します。