

ペプチドに D 体アミノ酸を導入する新規異性化酵素の精密解析とその応用

北海道大学大学院 工学研究院 小笠原 泰志

【略歴】

- 2005年9月 東京工業大学大学院 理工学研究科 化学専攻 博士後期課程修了
- 2005年10月 Postdoctoral fellow at College of Pharmacy, The University of Texas at Austin
- 2012年1月 Research Assistant Professor at Department of Chemistry and Chemical Biology, The University of New Mexico
- 2014年4月 北海道大学大学院 工学研究院 応用化学部門 助教
- 2021年1月 北海道大学大学院 工学研究院 応用化学部門 准教授

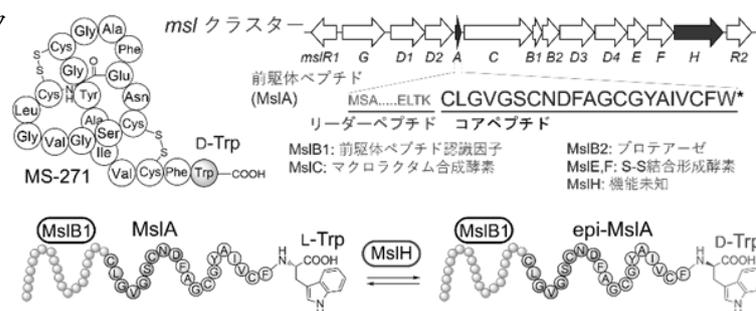
はじめに

ペプチドは、シグナル分子や抗生物質などとして生命活動における様々な役割を担っている。一般に生体を構成するアミノ酸はL体であるが、D体アミノ酸も細菌や動植物を問わず広く分布している。例えば、細菌の細胞壁であるペプチドグリカンには、D-アラニンや D-グルタミン酸 (Glu) が構成成分として含まれている。また、納豆菌が生産するポリ- γ -グルタミン酸 (PGA) やペプチド天然物のバンコマイシンなどにも D-アミノ酸が含まれている。これら D-アミノ酸含有ペプチドの生合成機構としては、①非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) が触媒し、ペプチド鎖の伸長と L→D 体への異性化が逐次的に進む機構、②アミノ酸ラセマーゼによる D-アミノ酸の生成後にアミノ酸リガーゼの触媒によりペプチド結合が形成される機構が知られている。これに対して、L-アミノ酸からなるペプチド鎖が生成した後のエピメリ化により D-アミノ酸残基を導入する例は、ラジカル反応でエピメリ化を触媒する PoyD や、 α - β -ヒドロラーゼタイプ酵素でイミンの α 位エピメリ化を触媒する BotH など少数しか報告されてなかった。最近我々は、これらとは全く別の2種類の新規ペプチドエピメラーゼを見出した。D-アミノ酸は、生体内安定性 (ペプチダーゼ耐性) や生理活性の発現に寄与することから、ペプチドエピメリ化酵素は、ペプチドの安定化や新規有用天然物創製への応用が期待できる。本研究では、その検証と詳細な生化学的解析を目的とした。

MS-271 生合成に関わる新規エピメラーゼ

ラッソペプチド (投げ縄構造を持つリボソーム翻訳ペプチドの一群) の MS-271 は、C 末端に D-Trp 残基を持つ。ラッソペプチドはリボソームで生合成されることから、C 末 D-Trp 残基の導入機構に興味を持たれた。そこで、生産菌のドラフトゲノム解析で見出した生合成遺伝子クラスター (*msl*) を解析した結果、前駆体ペプチド (MslA) は MS-271 の C 末 Trp までを含んでおり、エピメリ化により D-Trp 残基が導入されることが示された。クラスター中には既知の異性化酵素と相同性を有する遺伝子は見出せなかったが、機能未知遺伝子が一つ (*mslH*) 存在したことから、MslH が Trp のエピメリ化に関与することが推定された。そこで、大腸菌で発現した組換え酵素を用いた *in vitro* 実験で検証したところ、推定通り MslH が新規エピメラーゼであり、MslA を基質として epi-MslA を生成することを実証できた。本酵素はペプチドの C 末端をエピメリ化する初のエピメラーゼである [1,2]。

MslH は既知の保存領域やモチーフを持たないまったく新規な異性化酵素であることから、次に、MslH と基質類縁体の共結晶の X 線構造解析で反応機構解析を行った。その結果、Ca²⁺ の近傍に存在し、基質の C 末 Trp 部位を挟んで位置する 2 つの His 残

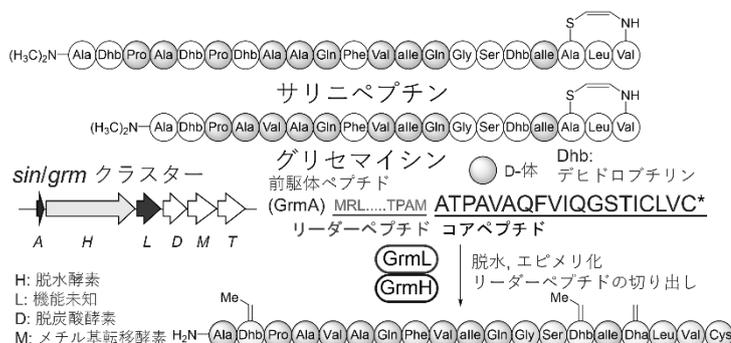


基 (His88, His295) とその外側にそれぞれ Asp 残基 (Asp91, Asp11) が見出された。さらに、それら 4 残基のアミノ酸置換実験で活性が完全に消失したことから、それらがエピメリ化に必要な脱プロトン化/プロトン化を担うアミノ酸残基であり、Ca²⁺依存の新規反応機構が示唆された^[3]。また、MslH の相同酵素の PgsA が PGA の生合成においてもエピメリ化反応を触媒することを安定同位体の取り込み実験と遺伝子交換実験で見出した^[4,5]。

リナリジンペプチドの生合成に関わる新規エピメラーゼ

サリニペプチンは、放線菌 *Streptomyces* sp. GSL-6C から単離されたリボソーム翻訳ペプチド天然物であり、22 アミノ酸残基中 9 残基が D 体である。サリニペプチンは、デヒドロアミノ酸、N 末 *N,N*-ジメチル基、アミノビニルシステイン (aviCys) を持ち、グリセマイシンと共にリナリジン系ペプチド天然物に分類される。報告されていた生合成遺伝子クラスター (*sin*) には、既知のエピメラーゼ遺伝子は見出せなかったが、前駆体ペプチド (SinA)、デヒドロアミノ酸と aviCys の生合成にそれぞれ必要な SinH、SinD、メチル基転移酵素 SinM に加えて機能未知酵素 (SinL) の遺伝子が存在した。グリセマイシンのアミノ酸残基の立体化学に関する報告はないが、興味深いことに、グリセマイシンの生合成遺伝子クラスターは *sin* クラスターと全く同じ遺伝子構成であることから、グリセマイシンもサリニペプチンと同様に複数の D-アミノ酸残基を有し、それらの生成には唯一の機能未知酵素である SinL が関与すると予想した。

その検証のため、グリセマイシンの遺伝子クラスター (*grm*) を近縁放線菌で異種発現した結果、グリセマイシンの生産が確認され、これが D-アミノ酸残基を複数含んでいたことから *grm* クラスターに未知のエピメラーゼ遺伝子が含まれることが強く示唆された。次に、各遺伝子の機能の検証のため、*grm* クラスター中の *grmH*, *grmD*, *grmM*, *grmL* をそれぞれ in-frame で欠失した結果、*grmL* を含めて 4 つの遺伝子が生合成に必須であることが明らかとなった。さらに、脱水酵素の GrmH と GrmL の機能について *in vivo* 実験で解析した結果、それぞれ単独酵素での修飾反応は起こらなかったが、両者の存在下で GrmH/GrmL 複合体が形成され、ペプチド基質 (GrmA) の脱水と異性化、リーダーペプチドの切り出し反応が進行することが示された。GrmH/GrmL 複合体はペプチドの複数のアミノ酸残基を D 体へと異性化する点で初の例である^[6,7]。



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において行われたものであり、ご指導賜りました大利徹教授に厚く御礼申し上げます。また、共同研究者や学生の皆様に深く感謝申し上げます。

参考文献

- [1] Z. Feng et al. ChemBioChem 19, 2045 (2018).
- [2] Z. Feng et al. Chem. Sci. 12, 2567 (2021).
- [3] Y. Nakashima and A. Kawakami et al. Nat. Commun. 14, 4752 (2023).
- [4] Y. Ogasawara et al. Org. Lett. 21, 3972, (2019).
- [5] H. Kato and M. Sakuta et al. Biomacromolecules 25, 349 (2024).
- [6] W. Xiao et al. ChemBioChem 23, e202100705 (2022).
- [7] W. Xiao et al. Biosci. Biotechnol. Biochem. 87, 1316 (2023).