

はじめに

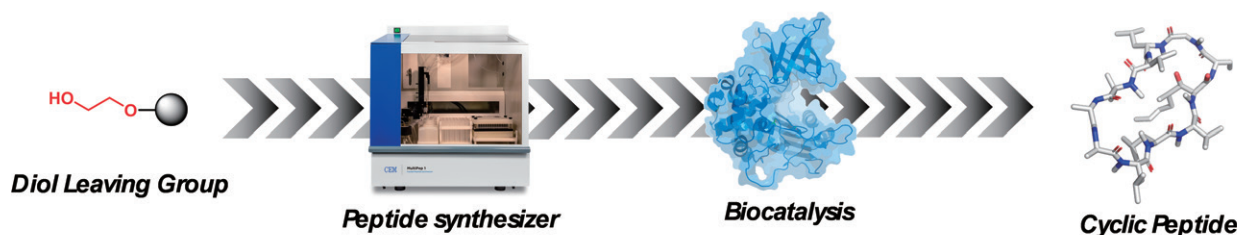
天然物合成酵素は生体内という温和な条件下、高度に選択的な化学反応を触媒して複雑な分子を効率的に組み上げる。これらをフラスコ内で触媒として利用できれば、複雑分子を少ない環境負荷で効率よく合成できる有用な手法となりうる。本発表では、非リボソームペプチド環化酵素を利用した環状ペプチドの効率的な化学-酵素合成法の開発、および藍藻由来ペプチドプレニル化酵素に関する研究を紹介する。

非リボソームペプチド環化酵素を利用した環状ペプチドの化学-酵素合成

環状ペプチドはこれまで標的化が困難と考えられてきた細胞内のタンパク質間相互作用を狙える重要な創薬モダリティである。ペプチド主骨格の環状化は、分子の標的特異性、膜透過性、分解酵素への耐性を向上しうる有用な修飾であるが、制御の難しい反応であり、競合する分子間反応を抑制するために大量の有機溶媒を消費する。また位置選択的な環構造の構築には後々廃棄物となる保護基が必要になる。さらに化学両論量が必要な高価な縮合剤や、副生成物として生じる立体異性体の除去も問題となる。一方で、天然にみられる環状ペプチドの生合成ではペプチド環化酵素が温和な条件下、保護基を用いることなく位置・化学・立体選択的な環化を効率よく触媒する。

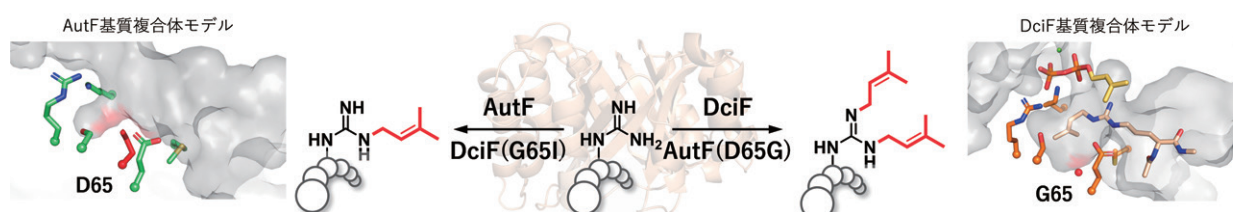
放線菌の産生する非リボソームペプチドsurugamide類は、合成酵素に融合した一般的なチオエステラーゼドメイン(TE)ではなく、合成酵素から独立した新規ペプチド環化酵素SurEによって環状骨格が形成される^[1,2]。本酵素は既存のペプチド環化酵素とは配列類似性を示さない一方、ペプチドグリカン生合成においてペプチド架橋反応を担うペニシリン結合タンパク質(PBP)に配列類似性を示すことから、我々は本酵素ファミリーを「ペニシリン結合タンパク質型チオエステラーゼ(PBP-type TE)」として位置づけてきた^[1]。SurEは鎖長や配列の異なる2種類の環状ペプチドの生合成に同時に関与する二機能性の酵素であり、基質配列・鎖長に対して寛容な基質選択性を示す^[3,4]。本酵素は触媒セリン残基の近傍に疎水的なポケットを有し、これにより基質C末端に疎水的なD-アミノ酸残基をもつ基質を選択的に受け入れ環化する^[4]。

従来、非リボソームペプチド環化酵素の機能解析に用いられてきたチオエステル基質は合成が非常に煩雑であり、副生成物の除去にも多大な労力がかかるため、基質の大量合成や並列多検体合成は困難であった。一方でPBP-type TEは脱離基に対して寛容な選択性を示し、一般的なチオエステルだけでなく、オキシエステルも脱離基として許容した^[4]。そこで、脱離基としてエチレングリコールを採用し、これをあらかじめ担持した固相上でペプチドを伸長することで、副生成物が生じる液相での縮合工程を省略した新たな基質合成法を開発した^[5]。これにより酵素基質の合成収率は30%から80%以上に改善した。得られたペプチド基質は純度が高く、LC精製を介さずそのまま酵素反応により環化できるため、酵素反応までの時間と手間が大幅に短縮された。SurEは基質配列と鎖長に対して非常に寛容な選択性を示し、本来の生合成産物と全く関連のない配列や、内部に非ペプチド性オリゴマーを含有する基質も効率的に環化した^[5]。さらにホモログ酵素の活用や論理的な酵素改変により、合成可能な環状ペプチド配列の拡張が可能であった^[5-8]。合成産物は主鎖末端同士が結合したhead-to-tail型の環状ペプチドにとどまらず、基質配列を工夫することで二環性ペプチド^[7]やラリアット型環状ペプチドの合成も可能であった。EGを脱離基とする化学-酵素合成法は一部の従来型のTEにも適用可能である^[5]。本手法は、今後、非リボソームペプチド環化酵素の触媒応用のさらなる発展に貢献すると考えられる。



藍藻由来ペプチドビスプレニル化酵素

ペプチドのプレニル化を触媒するシアノバクチンプレニル基転移酵素は、修飾部位に対する厳密な選択性と、修飾部位以外に対する寛容な選択性を兼ね備えるため、ペプチド修飾のための生体触媒としての利用可能性がある。我々はこれまで環状ペプチド中のArgを選択的に修飾するArg-*N,N'*-bisprenyltransferase AgcFを見出した^[9]が、その2連続プレニル化の反応メカニズムは不明であった。本研究では、新たなホモログ酵素DciFを発見し、そのタンパク質構造解析を通じてプレニル化の回数を決定する構造的要因を明らかにした。DciFは、多様な環状/直鎖状ペプチド中のArg残基を選択的に修飾可能であり、ペプチドビスプレニル化生体触媒としての有用性が示唆された。



謝 辞

本研究は北海道大学 大学院薬学研究院 天然物化学研究室で行われたものです。ご指導賜りました脇本敏幸先生に深く感謝申し上げます。また共同研究者の東京大学 阿部郁朗先生、森貴裕先生、翟睿博士、東京大学 松永茂樹先生、北里大学 池田治生先生、高田健太郎先生、北海道大学 沖野龍文先生に厚く御礼申し上げます。また共に研究を進めてくれた学生諸氏に心より感謝申し上げます。

参考文献

- [1] Matsuda, K., Wakimoto, T. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2024**, *80*, 102465.
- [2] Kuranaga, T. *et al.*, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 9447-9451.
- [3] Matsuda, K. *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 1058-1061.
- [4] Matsuda, K. *et al.*, *Nat. Catal.* **2020**, *3*, 507-515.
- [5] Kobayashi, M. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145*, 3270-3275.
- [6] Matsuda, K. *et al.*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *48*, kuab023.
- [7] Kobayashi, M. *et al.*, *Commun. Chem.* **2024**, *7*, 67.
- [8] Matsuda, K. *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* **2024**, *22*, 6713-6717.
- [9] Phan, C. S. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 10083-10087.

略 歴

2017年 3月 東京大学大学院 農学生命科学研究科 博士課程修了
2017年 4月 次世代天然物化学技術研究組合 特別研究職員
2017年 6月 北海道大学大学院 薬学研究院 特任助教
2017年 9月 北海道大学大学院 薬学研究院 助教
2021年 9月 北海道大学大学院 薬学研究院 講師
2024年 9月 北海道大学大学院 薬学研究院 准教授

Chemoenzymatic Synthesis of Complex Peptide Molecules Using Enzymes Derived from Specialized Metabolism

Kenichi Matsuda, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University

Introduction

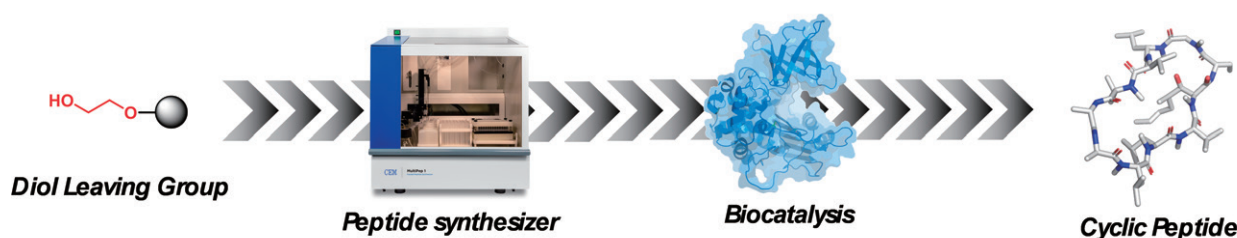
Natural product biosynthetic enzymes catalyze highly selective chemical reactions under mild biological conditions to efficiently assemble complex molecules, providing valuable opportunities for the efficient synthesis of complex molecules with minimal environmental costs. In this presentation, I will introduce the development of an efficient chemoenzymatic approach for cyclic peptides using non-ribosomal peptide cyclization enzymes, as well as research on peptide prenylation enzymes derived from cyanobacteria.

Chemoenzymatic Synthesis of Cyclic Peptides Using Non-Ribosomal Peptide Cyclization Enzymes

Cyclic peptides represent an important drug modality capable of targeting intracellular protein-protein interactions that have traditionally been considered difficult to address. Cyclization of the peptide backbone is a valuable modification that potentially enhances target specificity, membrane permeability, and resistance to degradative enzymes. However, peptide cyclization have remained challenging reaction and typically requires large quantities of organic solvents to suppress competing intermolecular reactions. Furthermore, regioselective construction of cyclic structures necessitates protective groups. Additional challenges include the requirement for stoichiometric amounts of expensive condensing agents and the removal of stereoisomeric byproducts. In contrast, natural biosynthesis of cyclic peptides employs peptide cyclases that efficiently catalyze regio-, chemo-, and stereoselective cyclization under mild conditions without protective groups.

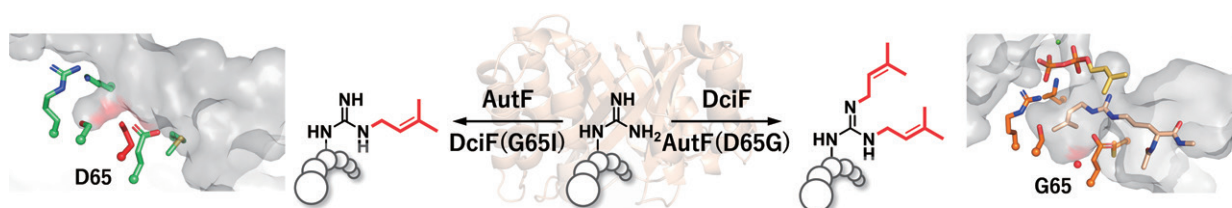
The non-ribosomal peptides surugamides, produced by *Streptomyces* spp., feature cyclic structures formed not by conventional thioesterase domains (TE) fused to synthetases, but by a novel independent peptide cyclization enzyme, SurE^[1,2]. While this enzyme shows no sequence similarity to existing peptide cyclization enzymes, it does share sequence similarity with penicillin-binding proteins (PBPs) involved in peptide cross-linking during peptidoglycan biosynthesis. Consequently, we have referred this enzyme family as “penicillin-binding protein-type thioesterases (PBP-type TE)”^[1]. SurE is a bifunctional enzyme simultaneously involved in the biosynthesis of two different cyclic peptides with varying chain lengths and sequences, demonstrating tolerant substrate selectivity^[3,4]. The enzyme possesses a hydrophobic pocket near its catalytic serine residue, allowing it to selectively accept and cyclize substrates with hydrophobic D-amino acid residues at their C-terminus^[4].

S-acetyl cysteine (SNAC) has traditionally been used as a low molecular pantetheine surrogate when reconstituting the activity of non-ribosomal peptide cyclases *in vitro*; however, it remains extremely tedious to synthesize, with byproduct removal requiring substantial effort, making large-scale or parallel multi-sample synthesis challenging. However, PBP-type TEs exhibit tolerant selectivity toward leaving groups, accepting not only conventional thioesters (SNAC) but also oxoesters^[4]. We therefore developed a new substrate synthesis method that employs ethylene glycol as a leaving group, which is pre-loaded on a solid phase before peptide elongation, thereby eliminating liquid-phase condensation steps that generate byproducts^[5]. This improved the synthesis yield of enzyme substrates from 30% to over 80%. The resulting peptide substrates are of high purity and can be directly cyclized by enzymatic reaction without LC purification, significantly reducing time and effort leading up to the enzymatic reaction. SurE demonstrates extremely tolerant selectivity toward substrate sequences and chain lengths, efficiently cyclizing sequences entirely unrelated to its natural biosynthetic products, as well as substrates containing non-peptidic oligomers^[5]. Furthermore, the range of synthesizable cyclic peptide sequences could be expanded through the utilization of homologous enzymes and rational enzyme modifications^[5-8]. The synthetic products were not limited to head-to-tail cyclic peptides where the backbone termini are linked; by designing appropriate substrate sequences, bicyclic peptides^[7] and lariat-type cyclic peptides could also be synthesized. The chemoenzymatic synthesis method using ethylene glycol as a leaving group is also applicable to some conventional TEs^[5].



Arginine-*N,N'*-bisprenyltransferases for Consecutive Guanidine-*N*-prenylation on Peptides

Cyanobactin prenyltransferases, which catalyze peptide prenylation, combine strict selectivity for modification sites with broad tolerance for remainder part of substrates, making them potentially useful as biocatalysts for site-selective peptide modification. We previously identified Arg*N,N'*-bisprenyltransferase AgcF, which selectively modifies Arg in cyclic peptides^[9]; however, its consecutive prenylation reaction mechanism remained unclear. In this study, we discovered a new homologous enzyme, DciF. Through structural analysis, we elucidated the structural factors dictating the number of prenylations. DciF can selectively modify Arg residues in various cyclic/linear peptides, suggesting its utility as a peptide bisprenylation biocatalyst.



Acknowledgements

This research was conducted at the Natural Products Chemistry Laboratory, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University. I would like to express my deep gratitude to Professor Toshiyuki Wakimoto for his guidance. I also extend my sincere thanks to collaborators: Professor Ikuro Abe, Professor Takahiro Mori, and Dr. Rui Zhai from the University of Tokyo; Professor Shigeki Matsunaga from the University of Tokyo; Professor Haruo Ikeda and Professor Kentaro Takada from Kitasato University; and Professor Ryufumi Okino from Hokkaido University. I would also like to express appreciation to all the students who contributed to this research.

References

- [1] Matsuda, K., Wakimoto, T. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2024, 80, 102465.
- [2] Kuranaga, T. *et al.*, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2018, 57, 9447-9451.
- [3] Matsuda, K. *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* 2019, 17, 1058-1061.
- [4] Matsuda, K. *et al.*, *Nat. Catal.* 2020, 3, 507-515.
- [5] Kobayashi, M. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2023, 145, 3270-3275.
- [6] Matsuda, K. *et al.*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2021, 48, kuab023.
- [7] Kobayashi, M. *et al.*, *Commun. Chem.* 2024, 7, 67.
- [8] Matsuda, K. *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* 2024, 22, 6713-6717.
- [9] Phan, C. S. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2021, 143, 10083-10087.

Brief Biography

March	2017	Completed Doctoral Program, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo
April	2017	Special Research Fellow, Organization for Next-Generation Natural Product Chemistry
June	2017	Project Assistant Professor, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University
September	2017	Assistant Professor, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University
September	2021	Lecturer, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University
September	2024	Associate Professor, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University