

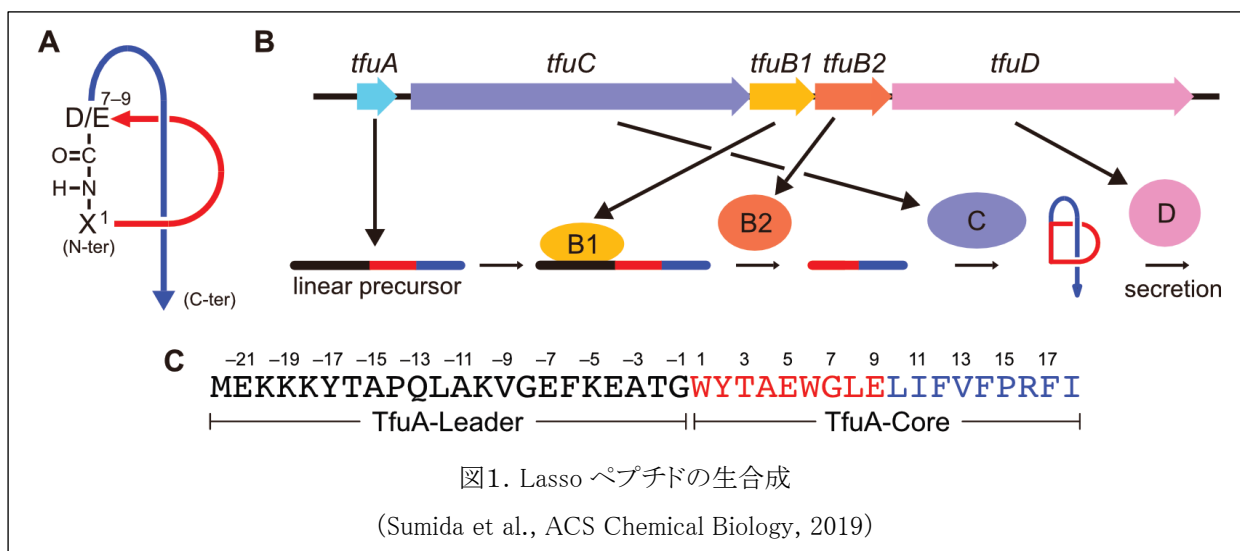
構造化ペプチド合成系の構造解析と創薬利用

理化学研究所 生命機能科学研究センター
田上 俊輔

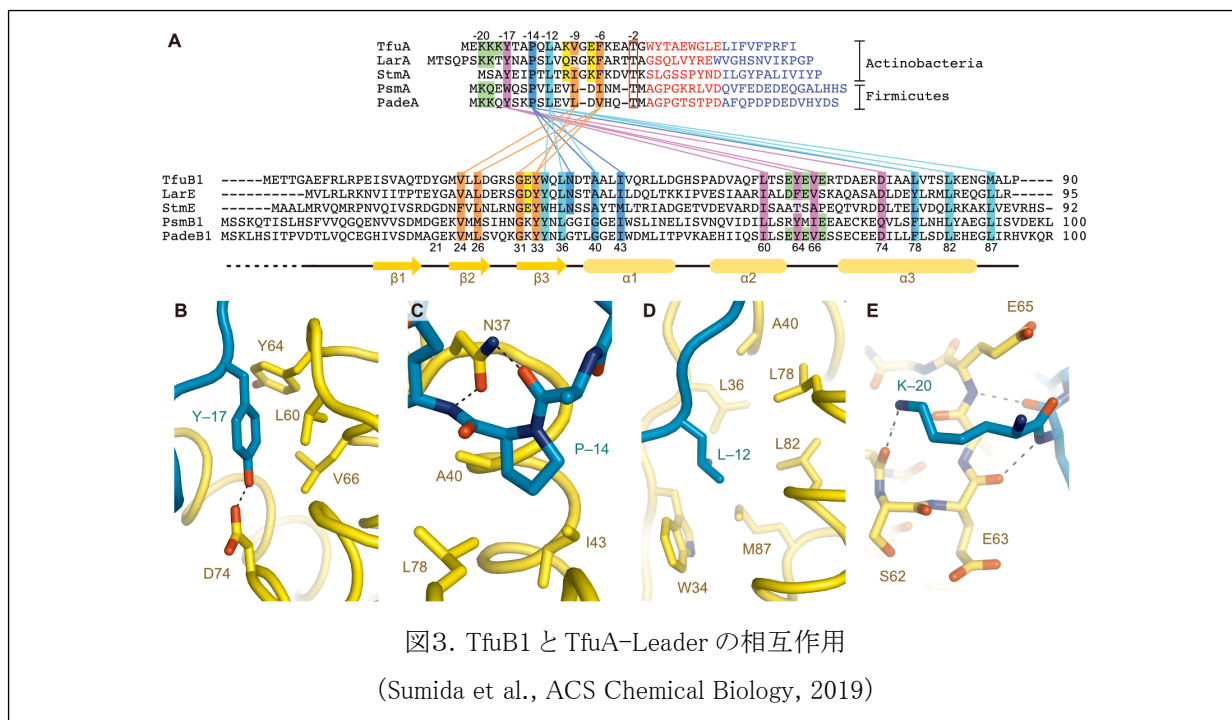
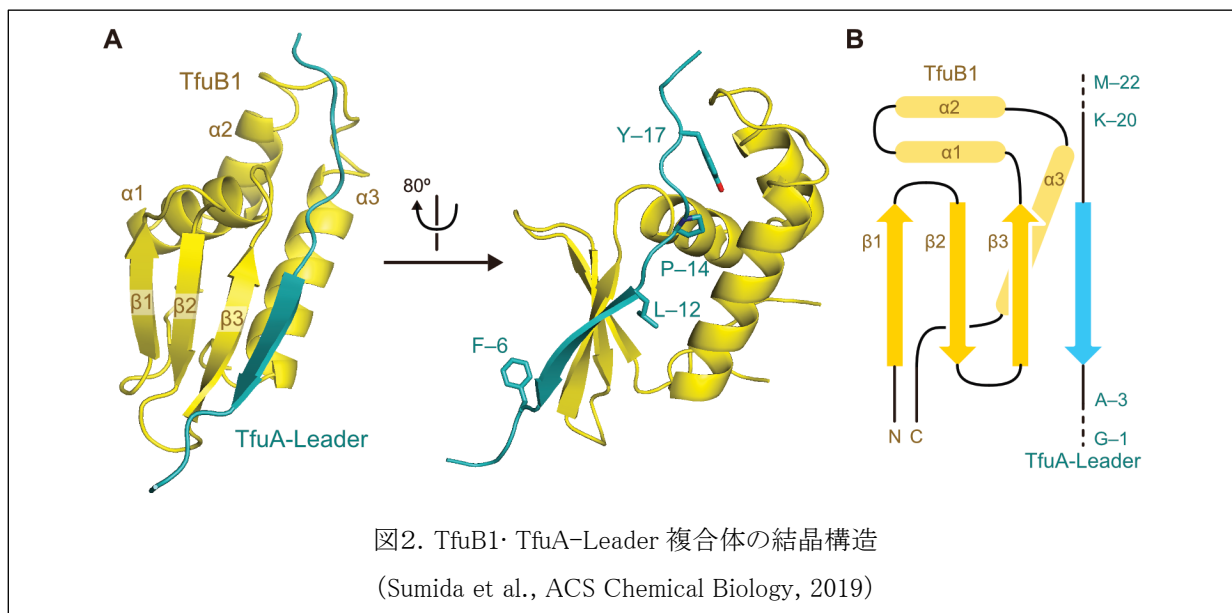
多くの微生物が翻訳後修飾によるペプチド構造の安定化を利用して機能性ペプチドを産出している (Arnison P. G., et al., Nat. Prod. Rep., 2013). このような微生物由来の構造化ペプチドは化学的な方法による構造化とは異なった立体的な特徴を持つものも多く、新たな機能ペプチドの開発に利用可能であると期待されている. その中でも、一部の細菌が産生するlassoペプチドと呼ばれる種類のペプチドは、特徴的な結び目状の構造を持っており(図1A), 細菌が他の細菌を攻撃するためなどに用いられることが報告されている(Maksimov M. O., et al., Nat. Prod. Rep., 2012). lassoペプチドはその構造から、熱安定・ペプチダーゼ耐性であり、中分子医薬としての高い可能性が期待されている. 実際にlassoペプチドMccJ25の一部をヒトのintegrin $\alpha v \beta 3$ に対する結合配列に組み替えて、integrin $\alpha v \beta 3$ 結合ペプチドとして使用するという試みもある (Hegemann J. D. et al., J. Med. Chem., 2014). 本研究ではlassoペプチド合成酵素群の立体構造をX線結晶構造解析を用いて明らかにし、特殊な結び目構造がどのように作られるのかを明らかにすることを目指して実験を行った. さらにlassoペプチド合成酵素群を改変することによって、より利用のしやすい変異体の作成も試みた.

lassoペプチドではN末端のアミノ基と約8残基目の酸性アミノ酸の側鎖の間でペプチド結合が形成され、環状構造が形成されている(図1A). さらに、C末端側の直鎖構造が環状構造の中を通ることでlassoペプチドに特徴的な三次元構造が実現されている. このような構造はリボソームによって翻訳されたlassoペプチド前駆体がlassoペプチド合成酵素群によって修飾反応を受けることによって実現されている(図1B). lassoペプチド合成酵素群(A, B1, B2, C, D)は通常ひとつのオペロンとして転写されるが、このうちAタンパク質はlassoペプチド前駆体そのものであり、lasso構造の成熟を行うのはB1, B2及びCタンパク質である. B1・B2タンパク質が前駆体ペプチドのリーダーペプチドを切断し、続いてCタンパク質が環状構造の形成を触媒して、特異的な三次元構造が形成される (Yan K. P., et al., ChemBioChem, 2012). Dタンパク質はlassoペプチドの分泌を行うトランスポーターである.

本研究において、我々はまず様々な細菌から安定なlasso合成酵素群を探索し、B1タンパク質については大量調整を行い、B1タンパク質と前駆体タンパク質のリーダーペプチド部位の複合体の結晶構造解析にも成功した. 図2に好熱性放線菌 *Thermobifida fusca* (TfuB1) のB1タンパク質とリーダーペプチド (TfuA-Leader) との複合体結晶構造を示す. この構造から、B1タンパク質によるリーダーペプチド認識の詳細なメカニズムを明らかにすることが出来た.



TfuB1は、N末側の β シートとC末端の3本の α ヘリックスで構成されているが、TfuB1・TfuA-Leader複合体構造中ではTfuA-LeaderはTfuB1のN末側 β シートの端に追加の β ストランドとしてドッキングしていた。リーダーペプチドの3つの保存されたアミノ酸残基(TfuA Tyr-17、Pro-14、およびLeu-12)は、TfuB1の β シートと隣接するヘリックス間の疎水性の裂け目によくはまり込んでおり、これによってリーダーペプチドとB1タンパク質の強固な相互作用が保たれているのだと考えられた(図3)。さらに、生化学的分析によって、これらの保存された残基がTfuB1とTfuA-Leader間の結合に不可欠であることも示された。



さらに我々は、TfuB1・TfuA-Leader複合体構造中で、TfuB1とリーダーペプチドがその β シート上に疎水性パッチを共同で形成することを発見した(図4)。この疎水性パッチは高度に保存されたTfuA Phe-6およびTfuB1 Tyr33を含んでおり、何らかの機能をもつことが予想された。しかし、生化学的解析ではこの疎水性パッチ上に保存されたアミノ酸残基のTfuB1・TfuA-Leader相互作用への寄与はほとんどないことが明らかにされた。ファームキユート *Bacillus pseudomycoides* (PsmB1) のB1タンパク質のホモロジーモデリングと変異解析をもちいた実験を共同研究者 (Skoltech, ロシア) と共同で行ったところ、この疎水性パッチは広範囲の種で保存され、むしろB2タンパク質の切断活性に関与していることが明らかになりました。この結果から、本結晶構造中で観察された疎水性パッチはB2タンパク質または前駆体ペプチドのコア部分との結合に寄与していると考えられた。

以上の結果は、本研究期間中にACS Chemical Biology誌上において発表することができた (Sumita T et al., ASC Chemical Biology, 2019)

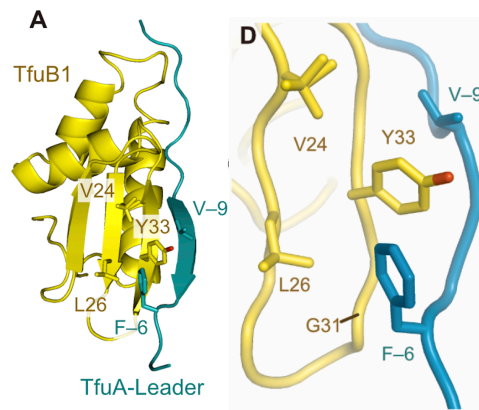


図4. Tfub1 と Tfua-Leader による疎水性パッチの形成
(Sumida et al., ACS Chemical Biology, 2019)

本研究ではさらにB2, Cタンパク質の構造解析のために、その大量発現を試みたが、B2, Cタンパク質は不溶性で、精製が困難であった。そこで現在、B2, Cタンパク質の配列に変異を導入することによって可溶性・安定性の高い変異体を獲得するための実験を進めている。通常のタンパク質にはいくつか不溶化を引き起こしやすい配列が含まれており、そのような配列に変異を加えることによって、タンパク質の可溶性を向上できることが報告されている (Ganesan A. et al., Nat. commun., 2016)。さらに、ホモログのコンセンサス配列に含まれるアミノ酸を利用することでタンパク質の安定性が向上することも報告されている (Porebski B. T., Protein Eng. Des. Sel., 2015)。そこで本研究では、無細胞翻訳系を用いたB2タンパク質の活性測定系を立ち上げ、そこで様々なB2タンパク質変異体の活性を確認しつつ、より可溶性の(さらに活性も)高い変異体のデザインを推し進めている。これまでの実験により、いくつかの疎水性アミノ酸を親水性アミノ酸に入れ替えることで、より活性の高いB2タンパク質変異体の取得に成功している (図5)。今後はこのような親水性変異体をCタンパク質についてもデザインし、B2・Cタンパク質の構造解析をすすめる。

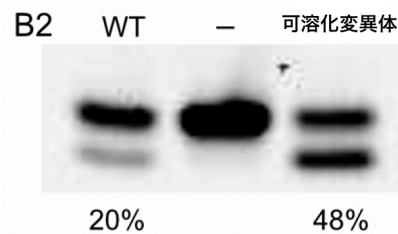


図4. Tfub2 変異体による前駆体ペプチドの切断
(Unpublished)

今後構造解析によってlassoペプチド合成酵素による基質認識メカニズムを明らかにすることができれば、さらに基質特性を変化させる変異をデザイン・導入することで多様な基質を認識するlassoペプチド合成酵素の改変を試みる。特に前述のコンセンサスデザイン法では、基質に対する特異性の減少が報告されており、広範な基質を認識するlassoペプチド合成酵素の作成に利用できると期待される。このようにして様々な基質を認識するlassoペプチド合成酵素が得られれば、lasso構造を持つ人工的なペプチドライブラリーの作成に利用できると期待できる。