

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年8月11日(11.08.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/168952 A1

(51) 国際特許分類:
C40B 40/10 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
C12P 13/10 (2006.01) *C12N 9/10* (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/004501

(22) 国際出願日: 2022年2月4日(04.02.2022)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2021-017504 2021年2月5日(05.02.2021) JP

(71) 出願人: 国立大学法人北海道大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 Hokkaido (JP).

(72) 発明者: 脇本 敏幸(WAKIMOTO, Toshiyuki); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 沖野 龍文(OKINO, Tatsufumi); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 松田 研一(MATSUDA, Kenichi); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). パン チン スン(PHAN, Chin Soon); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP).

(74) 代理人: 山尾 憲人, 外(YAMAO, Norihito et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町8番1号梅田阪急ビルオフィスタワー 青山特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,

EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告(条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(54) Title: NOVEL PRENYLATION ENZYME

(54) 発明の名称: 新規プレニル化酵素

(57) Abstract: The present invention provides: an enzyme that transfers a prenyl group to an arginine residue or an arginine analog residue in a peptide, or to arginine or an arginine analog, wherein the enzyme includes an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or a mutant sequence thereof; a peptide that can be used as a substrate for the enzyme; and a prenylated peptide.

(57) 要約: 本発明は、ペプチド中のアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基、あるいはアルギニンまたはアルギニン類縁体にプレニル基を転移する酵素であって、配列番号: 1 で示されるアミノ酸配列またはその変異配列を含む酵素、ならびに該酵素の基質として使用しうるペプチド、およびプレニル化された該ペプチドを提供する。



WO 2022/168952 A1

明 細 書

発明の名称：新規プレニル化酵素

技術分野

[0001] 本発明は、ペプチド類およびアミノ酸類のプレニル化修飾酵素および該酵素の基質等に関する。詳細には、本発明は、ペプチド中のアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基、あるいはアルギニンまたはアルギニン類縁体にプレニル基を転移する酵素、および該酵素の基質として使用しうるペプチド等に関する。

背景技術

[0002] 藍藻類の産生するペプチド化合物シアノバクチン類はしばしば位置選択的なプレニル化修飾が見られる。これまでに複数のプレニル基転移酵素が発見されており（特許文献1、非特許文献1～3）、試験管内でいずれも高い位置選択性および寛容な基質選択性を示す。これらは環状ペプチドに対して作用するため、合成終盤における多様性創出ツールとして有用である。しかしこれらの酵素のプレニル化部位は、トリプトファン、チロシン、セリン、スレオニン残基の側鎖および直鎖ペプチドのN-、C-末端のみであり、これによって創出される構造多様性は限定的である。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：米国特許出願公開公報US2010/0209414A1

非特許文献

[0004] 非特許文献1：McIntosh, J. A.; Donia, M. S.; Nair, S. K.; Schmidt, E. W. Enzymatic basis of ribosomal peptide prenylation in cyanobacteria. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 13698-13705.
非特許文献2：Parajuli, A.; Kwak, D. H.; Dalponte, L.; Leikoski, N.; Galica, T.; Umeobika, U.; Trembleau, L.; Bent, A.; Sivonen, K.; Wahlsten, M.; Wang, H.; Rizzi, E.; De Bellis, G.; Naismith, J.; Jaspars, M.

; Liu, X.; Houssen, W.; Fewer, D. P. A unique tryptophan C-prenyltransferase from the kawaguchipectin biosynthetic pathway. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, 55, 3596-3599.

非特許文献3: Dalponte, L.; Parajuli, A.; Younger, E.; Mattila, A.; Jokela, J.; Wahlsten, M.; Leikoski, N.; Sivonen, K.; Jarmusch, S. A.; Houssen, W. E.; Fewer, D. P. N-prenylation of tryptophan by an aromatic prenyltransferase from the cyanobactin biosynthetic pathway. *Biochemistry* 2018, 57, 6860-6867.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0005] 多様な構造や機能を有するペプチドを創出する必要がある。そのためには、従来のプレニル基転移酵素とは異なる特性を有する酵素を見出す必要がある。また、そのような酵素の基質となるペプチド類やアミノ酸類を見出す必要もある。

課題を解決するための手段

- [0006] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、ペプチド中のアルギニン残基にプレニル基を転移する新規酵素および該酵素の基質として使用しうるペプチドを藍藻類中に見出し、本発明を完成させるに至った。

- [0007] したがって、本発明は以下のものを提供する：

(1) 下記アミノ酸配列を含む、ペプチド中のアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基、あるいはアルギニンまたはアルギニン類縁体にプレニル基を転移する酵素：

(a) 配列番号：1 のアミノ酸配列、

(b) 配列番号：1 のアミノ酸配列に対して58%以上の同一性を有するアミノ酸配列、または

(c) 配列番号：1 に示すアミノ酸配列において1ないし数個のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列。

(2) 下記塩基配列を含む核酸：

(a) 配列番号：1 のアミノ酸配列をコードする塩基配列、

(b) 配列番号：1 のアミノ酸配列に対して58%以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列、

(c) 配列番号：1 に示すアミノ酸配列において1ないし数個のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列、または

(d) 配列番号：1 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列に対して相補的な塩基配列にストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列。

(3) (2) に記載の核酸によりコードされる、ペプチド中のアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基、あるいはアルギニンまたはアルギニン類縁体にプレニル基を転移する酵素。

(4) (2) に記載の核酸を含むベクター。

(5) 下記工程を含む、ペプチド中のアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基、あるいはアルギニンまたはアルギニン類縁体にプレニル基を転移する酵素の製造方法：

(a) (2) に記載の核酸または(4) に記載のベクターを細胞に導入する工程、

(b) 工程(a) で得られた細胞を培養する工程、および

(c) 工程(b) で得られた培養物からペプチド中のアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基、あるいはアルギニンまたはアルギニン類縁体をプレニル化する酵素を得る工程。

(6) 下記(i) および(ii)：

(i) アルギニン残基またはアルギニン類縁体残基を含むペプチド、あるいはアルギニンまたはアルギニン類縁体

(ii) プレニル基含有化合物

に(1) または(3) に記載の酵素を作用させることを含む、アルギニン残

基またはアルギニン類縁体残基がプレニル化されたペプチド、あるいはプレニル化されたアルギニンまたはアルギニン類縁体の製造方法。

(7) ペプチドが環状ペプチドである、(6) 記載の方法。

(8) ペプチドにおいて、プロリン残基がアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基に隣接しており、プロリン残基がそのカルボキシル基を介してアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基のアミノ基に結合している、(6) または (7) 記載の方法。

(9) 酵素が、配列番号：1 に示すアミノ酸配列のN末端から167番目のアミノ酸残基がヒスチジン以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列を含むものであるか、あるいは配列番号：1 に示すアミノ酸配列のN末端から167番目のアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基がヒスチジン以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列を含むものであり、プレニル化がモノプレニル化である、(6) ~ (8) のいずれかに記載の方法。

(10) ヒスチジン以外のアミノ酸がアラニンである、(9) 項記載の方法。

(11) アルギニン残基またはアルギニン類縁体残基を含むペプチド、あるいはアルギニンまたはアルギニン類縁体を含む化合物ライブラリーに請求項1または3に記載の酵素を作用させることを含む、アルギニン残基またはアルギニン類縁体残基がプレニル化されたペプチド、あるいはプレニル化されたアルギニンまたはアルギニン類縁体を含む化合物ライブラリーの製造方法。

(12) ペプチドが環状ペプチドである、(11) 記載の方法。

(13) ペプチドにおいて、プロリン残基がアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基に隣接しており、プロリン残基がそのカルボキシル基を介してアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基のアミノ基に結合している、(11) または (12) 記載の方法。

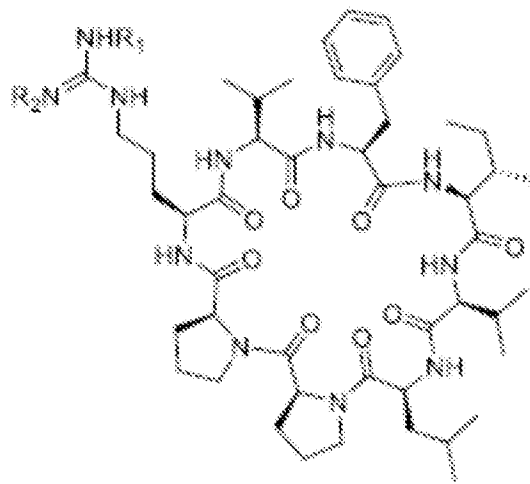
(14) 酵素が、配列番号：1 に示すアミノ酸配列のN末端から167番目のアミノ酸残基がヒスチジン以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列を含

むものであるか、あるいは配列番号：1に示すアミノ酸配列のN末端から167番目のアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基がヒスチジン以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列を含むものであり、プレニル化がモノプレニル化である、(11)～(13)のいずれかに記載の方法。

(15) ヒスチジン以外のアミノ酸がアラニンである、(14)項記載の方法。

(16) 式(1)：

[化1]



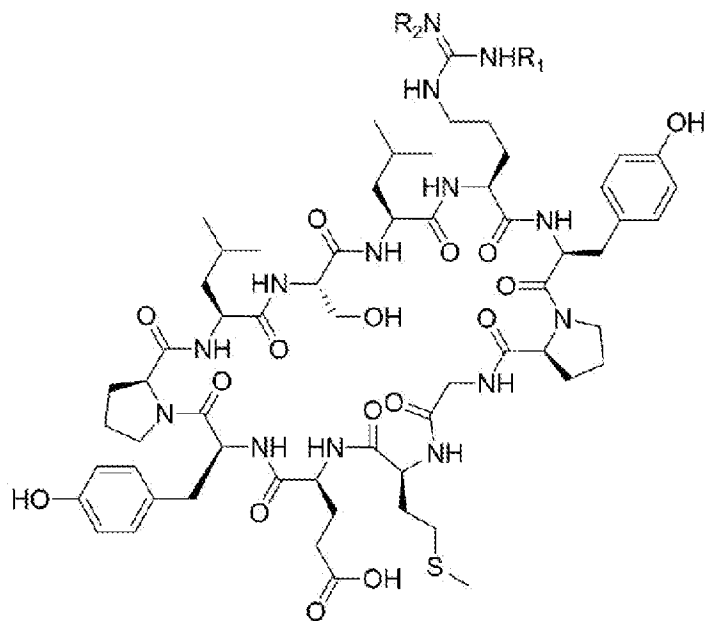
(1)

[式中、R₁は水素またはプレニル基であり、R₂は水素またはプレニル基である]

で示される化合物。

(17) 式(11)：

[化2]



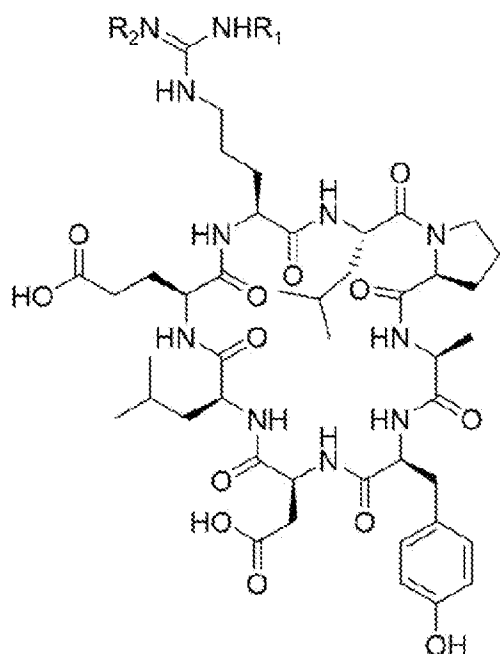
(11)

[式中、R₁は水素またはプレニル基であり、R₂は水素またはプレニル基である]

で示される化合物。

(18) 式 (111) :

[化3]



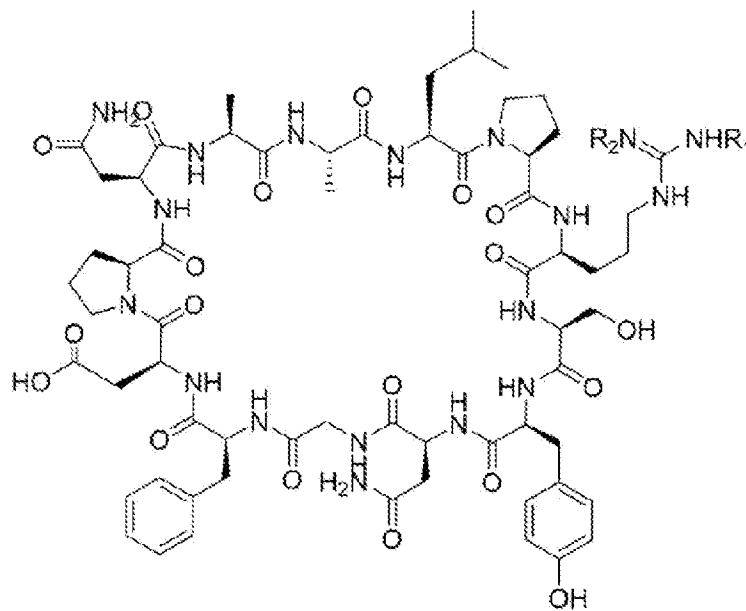
(I I I)

[式中、 R_1 は水素またはプレニル基であり、 R_2 は水素またはプレニル基である]

で示される化合物。

(19) 式 (IV) :

[化4]



(I V)

[式中、 R_1 は水素またはプレニル基であり、 R_2 は水素またはプレニル基である]

で示される化合物。

発明の効果

[0008] 本発明によれば、ペプチド中のアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基、あるいはアルギニンまたはアルギニン類縁体にプレニル基を転移する酵素が提供される。該酵素を用いて、多様な構造および機能を有するペプチド類やアミノ酸類を創出することができる。さらに本発明によれば、該酵素の基質として使用しうるペプチドも提供される。様々なペプチド類やアミノ酸類に該酵素を作用させて、多様な構造および機能を有する新たなプレニル化ペプチド類およびプレニル化アミノ酸類を創出することができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]図1は、*Microcystis aeruginosa* NIE-88から単離されたアルギシクラミドC（3）（上段）、化学合成されたアルギシクラミドC（3）（中段）、および両者の混合物（下段）のLC-MSのチャートと比較した図である。

[図2]図2は、*Microcystis aeruginosa* NIE-88から単離されたアルギシクラミドC（3）（上段）および化学合成されたアルギシクラミドC（3）（下段）の ^1H NMRのチャートと比較した図である。

[図3]図3は、*Microcystis aeruginosa* NIE-88から単離されたアルギシクラミドC（3）（上段）および化学合成されたアルギシクラミドC（3）（下段）の ^{13}C NMRのチャートと比較した図である。

[図4]図4は、本発明の酵素（AgcF）によるアルギシクラミドC（3）からアルギシクラミドA（1）への変換反応における、基質および生成物の経時的消長（0分～120分）を示す逆相HPLCチャートである。Boiled AgcFは反応前に熱失活した本発明の酵素を用いた反応物のチャートである。1（std）はアルギシクラミドA（1）標品、2（std）はアルギシクラミドB（2）標品、3（std）はアルギシクラミドC（3）標品のチャートである。

[図5]図5右パネルは、アルギシクラミドCの配列に含まれるアミノ酸残基を1つずつアラニンに置換した環状ペプチドにAgcFを作用させてプレニル化反応を行って、生成したモノプレニル化体およびビスプレニル化体の割合を調べた結果を示す。図中のスキームは、AgcFによるアルギシクラミドCのプレニル化反応の進行を示す。

[図6]図6は、AgcF_H167AによるアルギシクラミドCのモノプレニル化反応を調べたHPLCのチャートを示す。図中のスキームは、AgcF_H167AによるアルギシクラミドCのモノプレニル化反応を示す。

[図7]図7Aは、AgcFホモログである組換えUHCCO183PTによる基質、 $[\text{MEYPLSLRYPG}]$ のプレニル化反応物のUPLCクロマト

グラムを示す（210nmのUV吸収をモニター）。iは組換えUHCCO183PTを含む反応液のクロマトグラムを示す。iiは組換えUHCCO183PTを含まない反応液のクロマトグラムである。図7Bは、UHCCO183PTを含む反応液のUPLC-MS分析（ポジティブモード）の結果を示す。iは、ビスプレニル化体に相当する m/z 1443、0の抽出イオンクロマトグラムを示す。iiは、モノプレニル化体に相当する m/z 1375、0の抽出イオンクロマトグラムを示す。iiiは、基質に相当する m/z 1307、0の抽出イオンクロマトグラムを示す。

発明を実施するための形態

[0010] 本明細書にて使用される用語は、特に断らない限り、生物学、生化学、化学、薬学、医学等の分野において通常に理解されている意味を有する。本明細書におけるアミノ酸の表記は公知の1文字法または3文字法による。

[0011] 本発明は、1つの態様において、ペプチド中のアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基、あるいはアルギニンまたはアルギニン類縁体にプレニル基を転移する酵素を提供する。該酵素は、

(a) 配列番号：1のアミノ酸配列、

(b) 配列番号：1のアミノ酸配列に対して58%以上の同一性を有するアミノ酸配列、または

(c) 配列番号：1に示すアミノ酸配列において1ないし数個のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列を含む。

[0012] 本発明の酵素は、アルギニンまたはアルギニン類縁体を含むペプチド、あるいはアルギニンまたはアルギニン類縁体（プレニル基受容体）、およびプレニル基含有化合物（プレニル基供与体）を基質として、ペプチド中のアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基、あるいはアルギニンまたはアルギニン類縁体にプレニル基を転移する反応を触媒する。詳細には、本発明の酵素は、ペプチド中のアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基の側鎖の窒素原子、あるいはアルギニンまたはアルギニン類縁体の窒素原子にプレニル

基を転移する（ただし、上記窒素原子はペプチド結合を構成しているものではない）。プレニル基受容体がプレニル基結合可能な窒素原子を複数個含む場合、それらの1つにプレニル基が転移されてもよく、2つ以上にプレニル基が転移されてもよい。例えば、アルギニン残基を含むペプチドをプレニル基受容体とする本発明の酵素によるプレニル基転移反応において、アルギニン残基のグアニジンの1つの窒素にプレニル基が結合してもよく、2つの窒素にプレニル基が結合してもよい。

[0013] プレニル基受容体ペプチドの構造に特に制限はなく、直鎖、分枝または環状であってもよい。また例えばペプチドは直鎖状ペプチドと環状ペプチドが結合したペプチドであってもよい。好ましくは、ペプチドは環状ペプチドである。ペプチドは天然に存在するペプチドであってもよく、人工的に作成されたペプチドであってもよい。ペプチドのサイズは特に制限はなく、例えば数個のアミノ酸からなるものであってもよく、数十個のアミノ酸からなるものであってもよく、あるいはそれ以上のサイズであってもよい。本明細書において、ペプチドはオリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質であってもよい。本発明の酵素を用いてオリゴペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質のプレニル化を行うことができる。

[0014] アルギニン残基またはアルギニン類縁体残基はペプチドのいずれの位置に存在していてもよい。アルギニン残基またはアルギニン類縁体残基がペプチドのN末端、C末端、またはその両方に存在していてもよく、ペプチドの内部に存在していてもよい。

[0015] ペプチドにおいて、プロリン残基がアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基に隣接していることが好ましい。プロリン残基がそのカルボキシル基を介してアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基のアミノ基に結合することにより、プロリン残基がアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基に隣接していることが好ましい。本発明の酵素によるプレニル化にとり好ましいペプチドは、環状ペプチドであって、その中で上記の様式にてプロリン残基がアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基に隣接しているペプチドで

ある。

[0016] ペプチドを構成するアミノ酸は、通常は、タンパク質を構成しているアミノ酸であり、L-体であるが、タンパク質を構成していないアミノ酸であってもよく、D-体であってもよい。例えば、ペプチドを構成するアミノ酸は、 β -アラニン、 γ -アミノ酪酸、 ε -アミノカプロン酸などであってもよく、また例えばアルキル化、ハロゲン化、エステル化、アミノ化、カルボキシル化、ニトロ化、スルホン化、リン酸化、アセチル化、糖付加、脂質付加など、あるいは公知の保護基によって修飾されたアミノ酸であってもよい。これらの修飾されたアミノ酸を含むペプチドは、公知の方法にて得ることができる。

[0017] ペプチド中のアミノ酸の結合は、通常はペプチド結合であるが、エステル結合などの他の結合が含まれていてもよく、アミノ酸残基間にメチレン基などのスペーサーが存在していてもよい。

[0018] 本発明の酵素は、アルギニンまたはアルギニン類縁体をプレニル基受容体とすることもできる。本明細書において、アルギニン類縁体は、アルギニンの誘導体、ならびにアルギニンと類似構造を有するアミノ酸およびその誘導体を包含する。ここで、誘導体は修飾体を包含し、例えば、アルキル化、ハロゲン化、エステル化、アミノ化、カルボキシル化、ニトロ化、スルホン化、リン酸化、アセチル化、糖付加、脂質付加などが施された化合物であってもよい。また誘導体は、公知の保護基が付されたものであってもよい。誘導体は上例に限定されない。アルギニンの類縁体は、公知の方法により得ることができる。アルギニンの類縁体の典型例としては、限定するものではないが、オルニチン、シトルリン、およびアルギニノコハク酸、ならびにそれらの誘導体などが挙げられる。ペプチド中のアルギニンの類縁体残基についても上の説明が当てはまる。

[0019] 本発明の酵素により転移されるプレニル基は、いずれのプレニル基であってもよく、例えばジメチルアリル基、ゲラニル基、ファルネシル基、ゲラニルゲラニル基、ゲラニルファルネシル基、ヘキサプレニル基、オクタプレニ

ル基、デカプレニル基などが挙げられるが、これらに限定されない。本発明の酵素により転移されるプレニル基のサイズは、好ましくは炭素数が20以下、より好ましくは15以下である。

[0020] プレニル基含有化合物（プレニル基供与体）は特に限定されず、いずれの種類の化合物であってもよい。プレニル基含有化合物の例としては、限定するものではないが、ジメチルアリルニリン酸（DMA P P）、ゲラニルニリン酸（G P P）、ファルネシルニリン酸（F P P）などが挙げられる。

[0021] 本発明の酵素は、ペプチド中のアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基、あるいはアルギニンまたはアルギニン類縁体にプレニル基を転移するという点で新規な酵素である。本発明の酵素は、従来の酵素では不可能であった多様な構造および機能を持った新たなペプチドを創出するペプチド修飾ツールとして有用である。

[0022] 本発明の酵素はあらゆる生物に由来するものであってもよい。本発明の酵素は、好ましくは細菌、より好ましくは藍藻類由来である。本発明の酵素は、例えばMicrocystis属、Aphanizomenon属、Dolichospermum属などの藍藻に由来するものであってもよい。本発明の酵素は、例えば配列番号：1に示すアミノ酸配列を含むもの（A g c F）であってもよい。

[0023] 本発明の酵素はその変異体を包含しうる。本明細書において、特に断らない限り、本発明の酵素という場合は、本発明の酵素およびその変異体を包含するものとする。

[0024] 本発明の酵素の変異体は、配列番号：1に示すアミノ酸配列の変異配列を含んでいてもよい。

[0025] 例えば、本発明の酵素の変異体は、配列番号：1に示すアミノ酸配列に対して50%以上、例えば58%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、92%以上、94%以上、96%以上または98%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含んでいてもよい。アミノ酸配列の同一性は、FASTA検索やBLAST検索等の公知の手段を用いて調べることができる。

[0026] また例えば、本発明の酵素の変異体は、配列番号：1に示すアミノ酸配列において1ないし数十個の、好ましくは1ないし数個のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列を含んでいてもよい。配列番号：1において欠失、置換、挿入または付加されるアミノ酸残基の数は1ないし数個に限定されることはなく、1個ないし数十個、好ましくは1個ないし40個、より好ましくは1個ないし20個、さらに好ましくは1個ないし数個であってもよい。数十個とは、例えば20個、30個、40個、50個、60個、70個、80個、90個、またはこれらの値の間の数であってもよい。数個とは、例えば2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個または9個であってもよい。タンパク質のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基の欠失、置換、挿入または付加は当業者に公知である。例えば部位特異的突然変異法や公知の化学的手法を用いて、本発明の酵素のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基の欠失、置換、挿入または付加を生じさせてもよい。アミノ酸残基の置換の場合、同族アミノ酸同士の置換が好ましい。同族アミノ酸は当業者に公知である。保存的アミノ酸置換も好ましい。保存的アミノ酸置換の例としては以下のものが挙げられる：置換されるアミノ酸が芳香族アミノ酸である場合には、P h e、T r p、T y r間での置換、置換されるアミノ酸が疎水性アミノ酸である場合には、L e u、I l e、V a l間での置換、置換されるアミノ酸が極性アミノ酸である場合には、G l n、A s n間での置換、置換されるアミノ酸が塩基性アミノ酸である場合には、L y s、A r g、H i s間での置換、置換されるアミノ酸が酸性アミノ酸である場合には、A s p、G l u間での置換、置換されるアミノ酸がヒドロキシル基を持つアミノ酸である場合には、S e r、T h r間での置換。

[0027] 好ましい本発明の酵素の変異体の例として、配列番号：1に示すアミノ酸配列のN末端から67番目のグリシン、133番目のグリシン、219番目のシステイン、267番目のシステイン、および289番目のロイシンに対応するアミノ酸残基が、これらと同じあるか、これらの同族アミノ酸であるか、あるいはこれらと保存的アミノ酸置換されるアミノ酸であるアミノ酸配

列を含む酵素が挙げられる。好ましくは、このような変異体酵素のアミノ酸配列は、配列番号：1に示すアミノ酸配列に対して50%以上、例えば58%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、92%以上、94%以上、96%以上または98%以上の同一性を有する。このような好ましい本発明の酵素の変異体の例として、配列番号：1に示すアミノ酸配列のN末端側から67番目のグリシン、133番目のグリシン、219番目のシステイン、267番目のシステイン、および289番目のロイシンに対応するアミノ酸残基がそれぞれグリシン、グリシンまたはアラニン、システイン、システイン、およびロイシンであり、配列番号：1に示すアミノ酸配列に対して58%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、92%以上、94%以上、96%以上または98%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む酵素が挙げられるが、このような酵素に限定されるものではない。酵素の変異体のアミノ酸配列中の「対応するアミノ酸残基」については、N末端から数えた位置およびその近傍のアミノ酸配列、コンピューターによる構造予測などを考慮して見つけることができる。

[0028] 本発明の酵素の変異体は、天然由来のものであってもよく、例えば遺伝子工学的手法を用いて人工的に作出されたものであってもよい。本発明の酵素の変異体はいずれの生物に由来するものであってもよい。本発明の酵素の変異体は、好ましくは細菌、より好ましくは藍藻類由来である。本発明の酵素の変異体は、例えばMicrocystis属、Aphanizomenon属、Dolichospermum属などの藍藻に由来するものであってもよい。

[0029] 本発明の酵素の変異体の例として、AgcFのホモログであるUHCCO183PTおよびPCC9443PTが挙げられるが、これらに限定されない。UHCCO183PTのアミノ酸配列を配列番号：6に、それをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号：7に示す。PCC9443PTのアミノ酸配列を配列番号：9に、それをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号：10に示す。UHCCO183PTのアミノ酸配列（配列番号：6）は、AgcFのアミノ酸配列（配列番号：1）に対して59.86%の同一性を有

している。PCC9443PTのアミノ酸配列（配列番号：9）は、AgcFのアミノ酸配列（配列番号：1）に対して58.54%の同一性を有している。

[0030] 本発明の酵素を公知の方法を用いて得ることができる。例えば、PCRを用いてAgcF遺伝子をクローニングし、発現ベクターにライゲーションし、発現ベクターを宿主細胞に導入し、宿主細胞を培養することによって、AgcFを得てもよい。本発明の酵素の変異も公知の方法を用いて得ることができる。例えば、AgcFのホモログもしくはオースログをクローニングし、発現ベクターにライゲーションし、発現ベクターを宿主細胞に導入し、宿主細胞を培養することによって、AgcFの変異体を得てもよい。AgcFホモログの公開配列を参考にして遺伝子を合成し、これを宿主細胞に導入し、宿主細胞を培養することによりAgcFホモログを得てもよい。部位特異的突然変異法などの公知の方法を用いてAgcFをコードする遺伝子の塩基配列を改変し、改変遺伝子を宿主細胞に導入し、宿主細胞を培養することによりAgcFの変異体を得てもよい。化学合成や化学修飾などの化学的方法などにより本発明の酵素の変異体を得てもよい。

[0031] あるいは本発明の酵素の変異体は、タンパク質を構成していないアミノ酸、D-体アミノ酸、修飾されたアミノ酸などを含んでいてもよい。

[0032] 本発明の酵素の変異体は、配列番号：1に示すアミノ酸配列を含む本発明の酵素の30%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、最も好ましくは90%以上のプレニル基転移活性を有する。

[0033] 配列番号：1に示すアミノ酸配列のN末端から167番目のアミノ酸残基がヒスチジン残基であるアミノ酸配列を含む酵素、あるいは配列番号：1に示すアミノ酸配列のN末端から167番目のアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基がヒスチジン残基であるアミノ酸配列を含む酵素を用いた場合に、ペプチド中のアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基、あるいはアルギニンまたはアルギニン類縁体のビスプレニル化が促進される。

[0034] 配列番号：1に示すアミノ酸配列のN末端から167番目のアミノ酸残基がヒスチジン以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列を含む酵素、あるいは配列番号：1に示すアミノ酸配列のN末端から167番目のアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基がヒスチジン以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列を含む酵素を用いた場合に、ペプチド中のアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基のビスプレニル化が抑制され、モノプレニル化が促進される。ヒスチジン以外のアミノ酸残基としてはアラニン残基が例示されるが、これに限定されない。

[0035] プレニル基転移活性は公知の方法にて測定することができる。例えば、アルギニン残基を含むペプチドおよびプレニル基を含む化合物を含む反応液に本発明の酵素を添加して、単位酵素量および単位時間あたりのプレニル化ペプチドの生成量を、本発明の酵素のプレニル基転移活性の指標としてもよい。プレニル化ペプチドの生成の確認および生成量の測定は、NMR、MS、HPLC、LC-MS等の公知の手段および公知の方法を用いて行うことができる。

[0036] 本発明は、もう1つの態様において、下記塩基配列：

(a) 配列番号：1のアミノ酸配列をコードする塩基配列、

(b) 配列番号：1のアミノ酸配列に対して58%以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列、

(c) 配列番号：1に示すアミノ酸配列において1ないし数十個、好ましくは1ないし数個のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列、または

(d) 配列番号：1に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列に対して相補的な塩基配列にストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含む核酸を提供する。

[0037] アミノ酸配列の同一性については上で説明したとおりである。欠失、置換、挿入または付加されるアミノ酸残基の数についても上で説明したとおりで

ある。

[0038] ストリンジェントな条件は当業者に公知であり、例えば下記条件が挙げられる：

0.25 M Na_2HPO_4 、pH 7.2、7% SDS、1 mM EDTA、1×デンハルト溶液を含む緩衝液中で温度が60～68℃、好ましくは65℃、さらに好ましくは68℃の条件下で16～24時間ハイブリダイズさせ、さらに20 mM Na_2HPO_4 、pH 7.2、1% SDS、1 mM EDTAを含む緩衝液中で温度が60～68℃、好ましくは65℃、さらに好ましくは68℃の条件下で15分間の洗浄を2回行う条件；あるいは、

25%ホルムアミド、より厳しい条件では50%ホルムアミド、4×SSC（塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム）、50 mM HEPES pH 7.0、10×デンハルト溶液、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 変性サケ精子DNAを含むハイブリダイゼーション溶液中、42℃で一晩プレハイブリダイゼーションを行った後、1×SSC、0.1% SDSを含む緩衝液中で37℃において、より厳しい条件としては0.5×SSC、0.1% SDSを含む緩衝液中で42℃において、さらに厳しい条件としては0.2×SSC、0.1% SDSを含む緩衝液中で65℃において洗浄を行う条件。

ストリンジェントな条件は上例に限定されないことはいうまでもない。

[0039] 本明細書において、核酸は、記載されたDNA、該DNAに相補的なDNA、およびこれらのDNAに相補的なRNAを包含しうる。

[0040] 本明細書において、塩基配列は、目的のアミノ酸配列をコードする縮重配列を包含する。

[0041] 本発明は、もう1つの態様において、

(e) 配列番号：2に示す塩基配列、または

(f) 配列番号：2に示す塩基配列に対して相補的な塩基配列にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含む核酸を提供する。

[0042] 上記塩基配列(e)は、配列番号：1で示されるアミノ酸配列をコードす

る塩基配列（a）の一例である。上記塩基配列（f）は、配列番号：1に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列に対して相補的な塩基配列にストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする塩基配列（d）の一例である。

[0043] ストリンジেন্টな条件および核酸については上で説明したとおりである。

[0044] 上記核酸は当業者に公知の方法によって得ることができる。本発明の酵素をコードする遺伝子またはそのホモログもしくはオーソログをクローニングすることによって上記核酸を得てもよい。クローニングの手法は当業者に公知である。上記核酸の源となる生物は特に限定されないが、好ましくは細菌、より好ましくは藍藻類である。上記核酸の源となる藍藻類の例としては、Microcystis属、Aphanizomenon属、Dolichospermum属の藍藻が挙げられるが、これらに限定されない。あるいは上記核酸を人工合成によって得てもよい。

[0045] 本発明は、もう1つの態様において、上記核酸によりコードされる酵素であって、ペプチド中のアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基、あるいはアルギニンまたはアルギニン類縁体にプレニル基を転移する酵素を提供する。

[0046] 本発明は、もう1つの態様において、上記核酸を含むベクターを提供する。ベクターとしては発現ベクターが好ましい。様々な発現ベクターが公知であり、適宜選択して用いることができる。本発明のDNAのベクターへの組み込み方法も公知である。

[0047] 上記核酸は本発明の酵素をコードするものである。また、上記ベクターは当該核酸を含むものである。ゆえに、上記核酸または上記ベクターを用いて、遺伝子工学的手法により本発明の酵素を製造することができる。

[0048] したがって、本発明は、もう1つの態様において、ペプチド中のアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基、あるいはアルギニンまたはアルギニン類縁体にプレニル基を転移する酵素の製造方法を提供する。該方法は下記工程：

（a）上記核酸または上記ベクターを細胞に導入する工程、

(b) 工程 (a) で得られた細胞を培養する工程、および

(c) 工程 (b) で得られた培養物から、ペプチド中のアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基、あるいはアルギニンまたはアルギニン類縁体にプレニル基を転移する酵素を得る工程を含む。

[0049] 例えば、上記核酸を発現ベクターに組み込んで細胞に導入し、細胞を培養して得られる培養物から本発明の酵素を得てもよい。また例えば、PEG法、エレクトロポレーションあるいはパーティクルガン法等の公知の方法を用いて上記核酸または上記ベクターを細胞に導入し、細胞を培養して得られる培養物から本発明の酵素を得てもよい。

[0050] 上記方法に使用する細胞は特に限定されず、細菌、酵母、糸状菌、放線菌などの微生物細胞、植物細胞、動物細胞、昆虫細胞であってもよい。この方法に使用する好ましい細胞としては、大腸菌や枯草菌などの微生物細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

[0051] 細胞の培養は公知の方法にて行うことができる。細胞および培養条件の選択は当業者が通常行いうることである。

[0052] 本発明の酵素を菌体内に生産する細胞の場合は、超音波、ミル、ホモジナイザー等の公知の手段によって菌体を破碎して抽出液を得て、硫酸沈殿、クロマトグラフィー等の公知の手段によって抽出液から本発明の酵素を得ることができる。本発明の酵素を菌体外に生産する細胞の場合は、培養液を硫酸沈殿、クロマトグラフィー等の公知の手段に付すことによって、本発明の酵素を得ることができる。

[0053] 上記の遺伝子工学的方法のほかに、生物体、例えば細菌、好ましくはMicrocystis属、Aphanizomenon属、Dolichospermum属などの藍藻類の菌体から抽出・精製することにより本発明の酵素を得てもよい。菌体破碎、硫酸沈殿、クロマトグラフィー等の公知の酵素精製手段・方法を用いることができる。

[0054] 本発明は、さらなる態様において、下記 (i) および (ii) :

(i) アルギニン残基またはアルギニン類縁体残基を含むペプチド、ある

いはアルギニンまたはアルギニン類縁体（プレニル基受容体）

（i i）プレニル基含有化合物（プレニル基供与体）

に本発明の酵素を作用させることを含む、アルギニン残基またはアルギニン類縁体残基がプレニル化されたペプチド、あるいはプレニル化されたアルギニンまたはアルギニン類縁体の製造方法を提供する。

[0055] アルギニン残基またはアルギニン類縁体を含むペプチド、アルギニンまたはアルギニン類縁体、プレニル基含有化合物、および該化合物に含まれるプレニル基については上で説明したとおりである。

[0056] プレニル基受容体およびプレニル基供与体を含む反応液に本発明の酵素を添加し、適当な条件下でインキュベーションすることにより、アルギニン残基またはアルギニン類縁体残基がプレニル化されたペプチド、あるいはプレニル化されたアルギニンまたはアルギニン類縁体を得ることができる。インキュベーションの条件は、酵素の特性や量、基質の種類や濃度などに応じて、当業者が適宜決定しうる。適当な条件としては、例えば室温～37℃、pH 6～9において、数時間反応させる条件が挙げられるが、これらの条件に限定されない。本発明の酵素を担体に固定化して用いてもよい。

[0057] 各種クロマトグラフィー等の公知の手法を用いて、アルギニン残基またはアルギニン類縁体残基がプレニル化されたペプチド、あるいはプレニル化されたアルギニンまたはアルギニン類縁体を反応液から精製、単離することができる。

[0058] これらのプレニル化された化合物の生成は公知の手段にて確認することができる。例えば、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて反応液を分析することにより確認を行ってもよい。質量分析を用いて、プレニル基受容体がプレニル化された場合の分子量を有する生成物を確認してもよい。NMRを用いて生成物の構造を詳細に決定してもよい。生成物の確認は、プレニル化された化合物の標品と比較することにより行うことが好ましい。プレニル化された化合物の標品は市販品であってもよく、化学合成によって得られたものであってもよく、天然界から単離されたものであってもよい。

- [0059] 本発明は、さらなる態様において、アルギニン残基またはアルギニン類縁体残基を含むペプチド、あるいはアルギニンまたはアルギニン類縁体を含む化合物ライブラリーに本発明の酵素を作用させることを含む、アルギニン残基またはアルギニン類縁体残基がプレニル化されたペプチド、あるいはプレニル化されたアルギニンまたはアルギニン類縁体を含む化合物ライブラリーの製造方法を提供する。
- [0060] アルギニン残基またはアルギニン類縁体残基を含むペプチド、あるいはアルギニンまたはアルギニン類縁体を含む化合物ライブラリーは、原料の一部にアルギニンまたはアルギニン類縁体を用いて公知の方法により得ることができる。そのような公知の方法としては、コンビナトリアルースプリット合成法、ペプチドアレイ法、ビーズディスプレイ法、ファージディスプレイ法などが挙げられるが、これらに限定されない。
- [0061] 上記のアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基がプレニル化されたペプチド、あるいはプレニル化されたアルギニンまたはアルギニン類縁体の製造方法、ならびに化合物ライブラリーの製造方法において、ペプチドをプレニル基受容体として用いる場合は、環状ペプチドが好ましい。
- [0062] ペプチドにおいて、プロリン残基がアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基に隣接していることが好ましい。プロリン残基がそのカルボキシル基を介してアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基のアミノ基に結合することにより、プロリン残基がアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基に隣接していることが好ましい。上記のアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基がプレニル化されたペプチド、あるいはプレニル化されたアルギニンまたはアルギニン類縁体の製造方法、ならびに化合物ライブラリーの製造方法において、好ましいペプチドは、環状ペプチドであって、その中で上記の様式にてプロリン残基がアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基に隣接しているペプチドである。
- [0063] 上記のアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基がプレニル化されたペプチド、あるいはプレニル化されたアルギニンまたはアルギニン類縁体の製

造方法、ならびに化合物ライブラリーの製造方法において、ビスプレニル化生成物を多く得たい場合は、配列番号：1に示すアミノ酸配列のN末端から167番目のアミノ酸残基がヒスチジン残基であるアミノ酸配列を含む酵素、あるいは配列番号：1に示すアミノ酸配列のN末端から167番目のアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基がヒスチジン残基であるアミノ酸配列を含む酵素を用いることが好ましい。

[0064] 上記のアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基がプレニル化されたペプチド、あるいはプレニル化されたアルギニンまたはアルギニン類縁体の製造方法、ならびに化合物ライブラリーの製造方法において、モノプレニル化生成物を多く得たい場合は、配列番号：1に示すアミノ酸配列のN末端から167番目のアミノ酸残基がヒスチジン以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列を含む酵素、あるいは配列番号：1に示すアミノ酸配列のN末端から167番目のアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基がヒスチジン以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列を含む酵素を用いることが好ましい。ヒスチジン以外のアミノ酸残基としてはアラニン残基が例示されるが、これに限定されない。例えば、A g c F ホモログ U H C C O 1 8 3 P T における配列番号：1に示すアミノ酸配列のN末端から167番目のアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基は、配列番号：6に示すアミノ酸配列のN末端から49番目のグルタミン酸残基である。また例えば、A g c F ホモログ P C C 9 4 4 3 P T T における配列番号：1に示すアミノ酸配列のN末端から167番目のアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基は、配列番号：9に示すアミノ酸配列のN末端から49番目のグルタミン酸残基である。

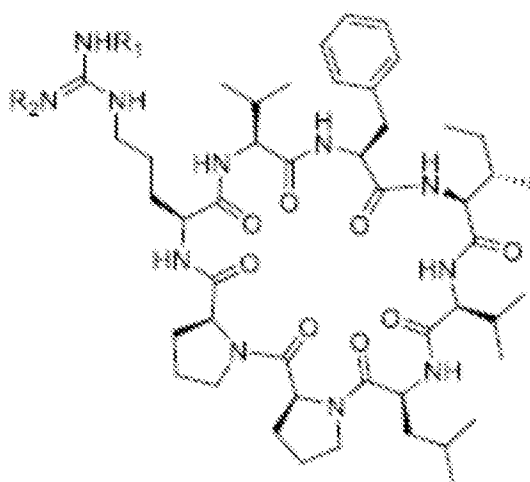
[0065] アルギニン残基またはアルギニン類縁体残基を含むペプチド、あるいはアルギニンまたはアルギニン類縁体を含む化合物ライブラリーに本発明の酵素を作用させる方法は、アルギニン残基またはアルギニン類縁体残基がプレニル化されたペプチド、あるいはプレニル化されたアルギニンまたはアルギニン類縁体の製造方法に関して述べた方法に準じたものであってよい。

[0066] 得られた化合物ライブラリーをスクリーニングすることにより、目的に応

じたプレニル化ペプチド類やプレニル化アミノ酸類を検索、取得することができる。

[0067] 本発明は、もう1つの態様において、式(1)：

[化5]



(1)

[式中、 R_1 は水素またはプレニル基であり、 R_2 は水素またはプレニル基である]

で示される化合物を提供する。

[0068] R_1 および R_2 がともに水素である式(1)の化合物はアルギシクラミドCである(実施例参照)。アルギシクラミドCは、藍藻類の1種である*Microcystis aeruginosa* NIE-88から単離、同定されたものであり、本発明の酵素の基質として使用しうる化合物である。この化合物を*Microcystis aeruginosa* NIE-88から得てもよく、あるいは公知の合成法(化学合成法、酵素合成法など)により得てもよい。

[0069] R_1 、 R_2 のいずれか一方がプレニル基である式(1)の化合物はモノプレニル化体である。 R_1 および R_2 がともにプレニル基である式(1)の化合物はビスプレニル化体である。

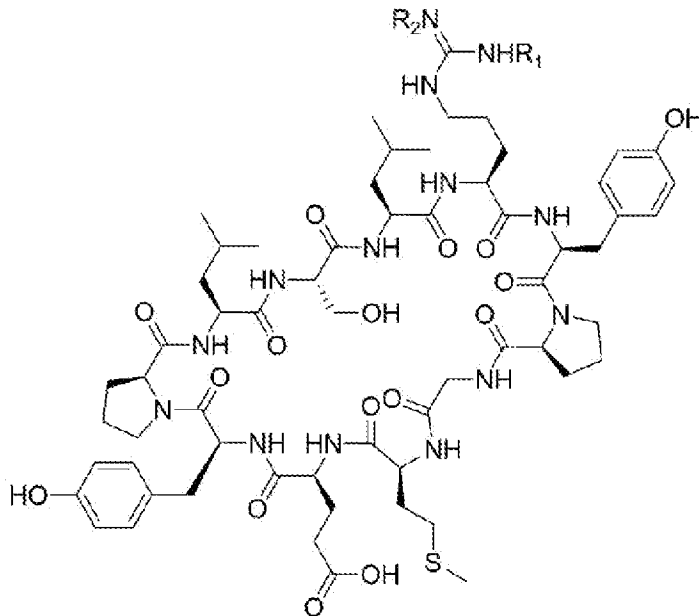
[0070] これらのモノプレニル化体およびビスプレニル化体は、 R_1 および R_2 がともに水素である式(1)で示される化合物に本発明の酵素を作用させることにより得てもよく、あるいは公知の合成法(化学合成法、酵素合成法など)

により得てもよい。

[0071] 式(1)で示される化合物は今回新たに単離、同定、合成されたものである。

[0072] 本発明は、もう1つの態様において、式(11)：

[化6]



(11)

[式中、R₁は水素またはプレニル基であり、R₂は水素またはプレニル基である]

で示される化合物を提供する。

[0073] R₁およびR₂がともに水素である式(11)の化合物は本発明の酵素の基質として使用しうる。

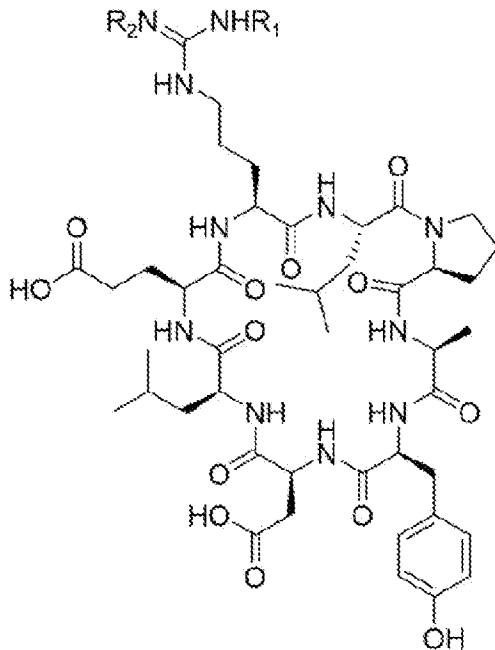
[0074] R₁、R₂のいずれか一方がプレニル基である式(11)の化合物はモノプレニル化体である。R₁およびR₂がともにプレニル基である式(11)の化合物はビスプレニル化体である。

[0075] これらのモノプレニル化体およびビスプレニル化体は、R₁およびR₂がともに水素である式(11)で示される化合物に本発明の酵素を作用させることにより得てもよく、あるいは公知の合成法(化学合成法、酵素合成法など)により得てもよい。

[0076] 式(11)で示される化合物は今回新たに合成、同定されたものである。

[0077] 本発明は、もう1つの態様において、式(111)：

[化7]



(111)

[式中、 R_1 は水素またはプレニル基であり、 R_2 は水素またはプレニル基である]

で示される化合物を提供する。

[0078] R_1 および R_2 がともに水素である式(111)の化合物は本発明の酵素の基質として使用しうる。

[0079] R_1 、 R_2 のいずれか一方がプレニル基である式(111)の化合物はモノプレニル化体である。 R_1 および R_2 がともにプレニル基である式(111)の化合物はビスプレニル化体である。

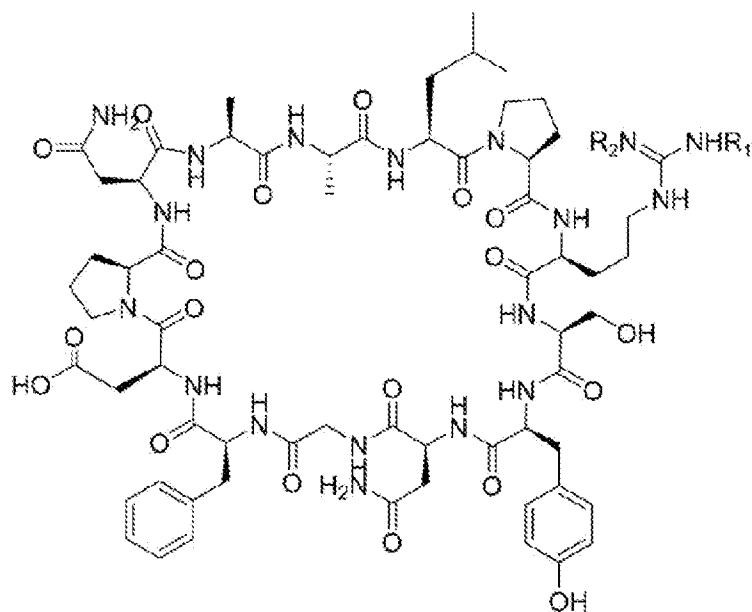
[0080] これらのモノプレニル化体およびビスプレニル化体は、 R_1 および R_2 がともに水素である式(111)で示される化合物に本発明の酵素を作用させることにより得てもよく、あるいは公知の合成法(化学合成法、酵素合成法など)により得てもよい。

[0081] 式(111)で示される化合物は今回新たに合成、同定されたものである

。

[0082] 本発明は、もう1つの態様において、式(ⅠⅤ)：

[化8]



(ⅠⅤ)

[式中、 R_1 は水素またはプレニル基であり、 R_2 は水素またはプレニル基である]

で示される化合物を提供する。

[0083] R_1 および R_2 がともに水素である式(ⅠⅤ)の化合物は本発明の酵素の基質として使用しうる。

[0084] R_1 、 R_2 のいずれか一方がプレニル基である式(ⅠⅤ)の化合物はモノプレニル化体である。 R_1 および R_2 がともにプレニル基である式(ⅠⅤ)の化合物はビスプレニル化体である。

[0085] これらのモノプレニル化体およびビスプレニル化体は、 R_1 および R_2 がともに水素である式(ⅠⅤ)で示される化合物に本発明の酵素を作用させることにより得てもよく、あるいは公知の合成法(化学合成法、酵素合成法など)により得てもよい。

[0086] 式(ⅠⅤ)で示される化合物は今回新たに合成、同定されたものである。

[0087] 以下に実施例を示して本発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、実施

例は本発明の範囲を限定するものではない。

実施例

[0088] (1) 実験全般

^1H および ^{13}C NMRスペクトルは、JEOL ECA 500 (^1H NMRの場合は500MHz)、JEOL ECX 400 P (^1H NMRの場合は400MHz)、JEOL ECS 400 (^1H NMRの場合は400MHz)、またはBuruka AVANCE Neo (^1H NMRの場合は500MHz)で測定した。化学シフトは、内部標準(DMSO-d₆, ^1H d 2.50, ^{13}C d 39.5)としての残留溶媒ピークに対する δ (ppm)で表す。ESI-MSスペクトルは、Thermo Scientific Exactive質量分析計またはSHIMADZU LCMS-2020分光光度計で測定した。旋光度はJASCO P-1030旋光計で測定した。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は、LC-20ADインテリジェントポンプを備えた島津HPLCシステムを用いて実施した。LC-MS実験はamaZon SL-NPC (Bruker Daltonics)を用いて実施した。前駆体イオンのフラグメンテーションは、ヘリウムガスを使用して振幅値1.0VにてamaZon SL-NPCを用いて実施した。GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma)を使用してプラスミド抽出を行った。

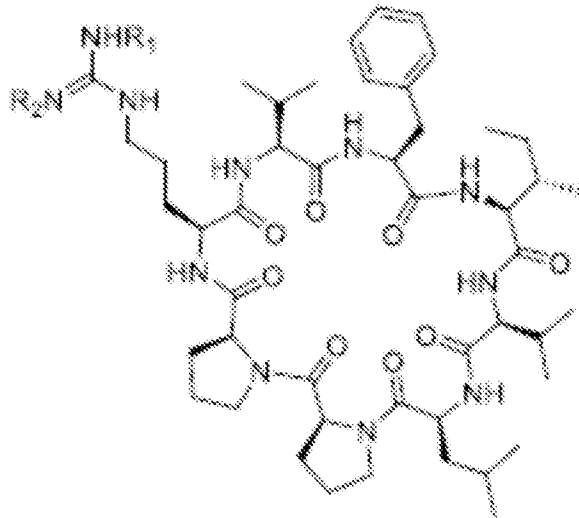
[0089] (2) Microcystis aeruginosa NIES-88の培養、DNA抽出、およびゲノムシーケンシング

Microcystis aeruginosa NIES-88を国立研究開発法人国立環境研究所から得た。Microcystis aeruginosa NIES-88は、BG-11培地中、通気しながら(フィルターを通した空気、0.3L/分)、25℃で、250 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ の照明下、12L:12Dサイクルにて培養した。4~5週間培養後、細胞を連続フロー遠心分離(10000rpm)にて集めた。まず、乳鉢と乳棒を用いて、凍結した細胞を破碎することにより高分子DNAを抽出した。次いで、細胞粉末をCTABバッファー(3% CTAB, 1.4M

NaCl, 0.2% β -メルカプトエタノール, 20mM EDTA, 100mM Tris pH8, RNase A) に溶解し、50℃で30分インキュベーションした。その後、750 μ Lのクロロホルムを添加し、おだやかに倒置し、15000 rpmにて5分間遠心分離した。得られた上層を、200 μ Lのイソプロパノールを入れた遠心チューブにゆっくりと移した。白色糸状物（沈殿DNA）が出現した後、沈殿DNAを集めてゲノムシーケンスに使用した。

[0090] (3) *Microcystis aeruginosa* NIES-88からのアルギシクラミドA (1)、B (2)、およびC (3) の単離

[化9]



アルギシクラミドA (1) : $R_1 = R_2 =$ ジメチルアリル

アルギシクラミドB (2) : $R_1 =$ ジメチルアリル、 $R_2 = H$

アルギシクラミドC (3) : $R_1 = R_2 = H$

(アルギシクラミドは本発明者らによる命名)

凍結乾燥した細胞（4～5週間培養物50Lから10.2g）をホモジナイズし、メタノール（200mL x 3）にて抽出した。濃縮した抽出物を水と酢酸エチルに分配させ、酢酸エチル層を、さらにメタノールとヘキサンに分配させた。水粗抽出物（533.0mg）および酢酸エチル粗抽出物（55.6mg）の両方を、水性メタノール溶出システムを備えたODS（YM

C-Gel、150ミクロン) にアプライした。メタノール溶出フラクションを、C18 (Wakosil-II 5C18 AR, 20×250mm, UV検出波長215nm, 流速4.0mL/分) を用いるHPLC (0.1% TFAを含む40% MeCNにて0-12分、次いで、0.1% TFAを含む57% MeCNにて12-50分) にて精製して、1 (23.0mg)、2 (2.9mg) および3 (2.6mg) を得た。

アルギシクラミドA (1): 無色油状物質; $[\alpha]_D^{25} -53.8$ (c 0.26, MeOH); HRESI(+)MS m/z 1058.7128 [M + H]⁺; calcd. for C₅₇H₉₂N₁₁O₈ + 1058.7125.

アルギシクラミドB (2): 無色油状物質; $[\alpha]_D^{25} -49.9$ (c 0.20, MeOH); HRESI(+)MS m/z 990.6495 [M + H]⁺; calcd. for C₅₂H₈₄N₁₁O₈ + 990.6499.

アルギシクラミドC (3): 無色油状物質; $[\alpha]_D^{25} -49.3$ (c 0.19, MeOH); HRESI(+)MS m/z 922.5873 [M + H]⁺; calcd. for C₄₇H₇₆N₁₁O₈ + 922.5873.

[0091] (4) プラスミドの構築

設計したプライマー:

AgcF-F: cgcgatccccatatgttgaaaagcaacaaaaag (配列番号: 3)

AgcF-R: ccggaattcctagagcagataatatagattgagattc (配列番号: 4)

を用いて、KOD One (登録商標) PCR Master Mix (TOYOBO) によりMicrocystis aeruginosa NIES-88のゲノムDNAから本発明の酵素 (AgcFという) をコードするDNAフラグメントを増幅した。

AgcFをコードするDNAフラグメントを、BamHIおよびEcoRIを用いてpUC19のマルチクローニングサイトに挿入して、AgcF-pUC19を得た。配列を確認した後、AgcFのインサートフラグメントをpCold-IのNdeIおよびEcoRI部位にライゲーションして、AgcF-pCold-Iを得た。

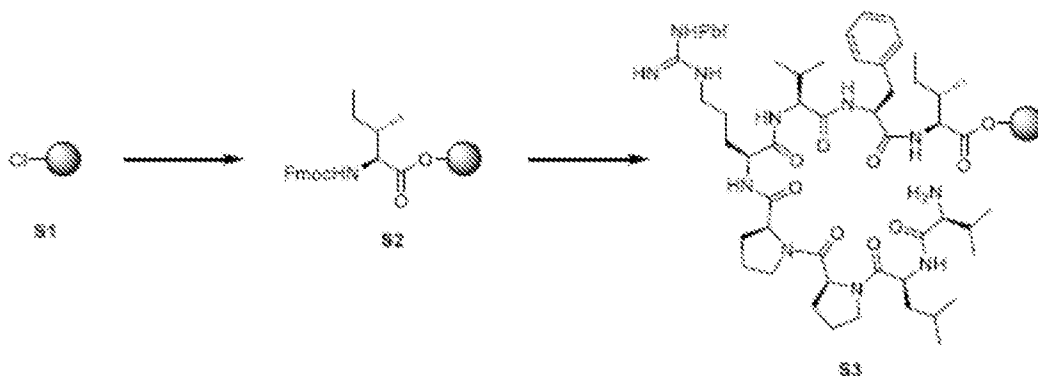
[0092] (5) 組換えAgcFの調製

シャペロン発現プラスミドpGro7を有するE. coli BL21にAgcF-

pC o l d - 1 1 を導入した。50 μ g/mL のカナマイシンおよび30 μ g/mL のクロラムフェニコールを含有する2 x Y T 培地にシングルコロニーを接種し、37℃で一晩増殖させた。50 μ g/mL のカナマイシンおよび30 μ g/mL のクロラムフェニコールおよび4 mg/mL のL - アラビノースを含有する200 mL の2 x Y T 培地に、一晩培養物の1%を移し、次いで、37℃で3時間培養した。最終濃度0.1 mM のIPTG を添加することによりA g c F 遺伝子の発現を誘導し、細胞を16℃で一晩培養した。遠心分離（3500 x g、10分）により細胞を集め、超音波ホモジナイザーで破碎した。遠心分離（17000 x g、10分）により残渣を除去した後、可溶性タンパク質を含むフラクションを、洗浄バッファー（20 mM Tris - HCl pH8.0, 150 mM NaCl, 20 mM イミダゾール）で平衡化したNi - NTAアフィニティーカラム（Merck Millipore）に供した。洗浄バッファーにてカラムを洗浄し、500 mM イミダゾールを含む洗浄バッファーで溶出を行った。カラムをAmicon Ultra 0.5 mL フィルター（Merck Millipore）に接続した。得られたタンパク質溶液の濃度をBio - Rad protein assay kitにより測定した。得られた組換えA g c F のアミノ酸配列を配列番号：5に示す。

[0093] （6）アルギシクラミドC（3）の全合成

[化10]



Libraチューブ中の2-クロロトリエチル樹脂S1（100mg、0

、160 mmol) を、 CH_2Cl_2 にて30分膨潤させ、次いで、過剰な溶媒を除去した。 CH_2Cl_2 (0.5 mL) 中のFmoc-L-Ile-OH (17.5 mg, 0.05 mmol) およびi-Pr₂NEt (26 μL , 0.15 mmol) の溶液に樹脂を添加し、37°Cで1時間攪拌した。反応混合物を濾過し、DMF (×3)、 CH_2Cl_2 (×3)、メタノールで洗浄し、 $\text{Ac}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (=1:4) で洗浄し、次いで、真空乾燥を1時間行ってFmoc-L-Ile-2-クロロトリチル樹脂S2を得た。

S2を CH_2Cl_2 中で2時間膨潤させ、7サイクル[Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Val-OH]の固相ペプチド合成プロトコール(下記工程1-4)に供して、樹脂に結合したオクタペプチドS3を得た。

固相ペプチド合成プロトコール

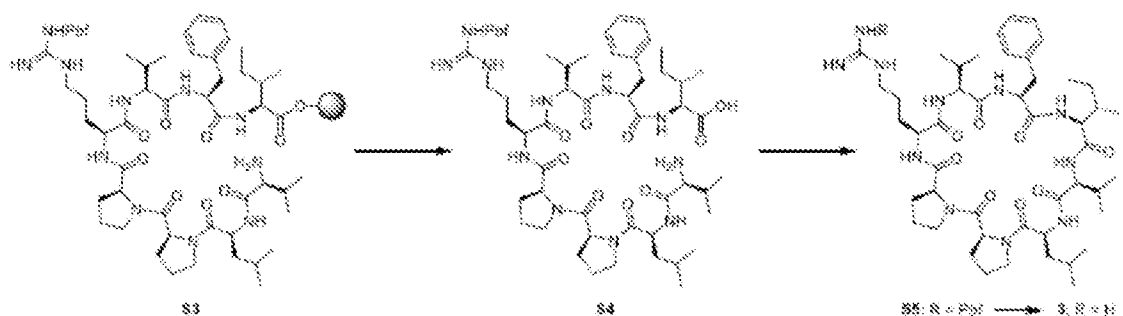
工程1: 20%ピペリジン/DMF溶液を用いることにより(10分間、室温)、固相に支持されたペプチドのFmoc基を除去した。

工程2: 反応容器中の樹脂をDMF (×3) および CH_2Cl_2 (×3) で洗浄した。

工程3: Fmocにて保護されたビルディングブロック(4 eq)の溶液に、NMP中のDIC(4 eq) およびOxyma (DMF中4 eq) を添加した。プレアクティベーションの2~3分後に、混合物を反応容器に注入した。得られた混合物を30分攪拌した。

工程4: 反応容器中の樹脂をDMF (×3) および CH_2Cl_2 (×3) で洗浄した。工程1-4を繰り返すことによりアミノ酸を固相支持体上に濃縮した。

[化11]



ペプチドS3に $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / (\text{CF}_3)\text{CHOH}$ (=70:30) (2.0 mL) を添加し、20分撹拌し、反応生成物を濾過した。この手順を2回繰り返した。濾液を減圧乾燥して粗ペプチドS4を得て、これをさらに精製せずに次工程に使用した。S4を $\text{DMF} / \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (=10:90) (50 mL) に溶解し、この溶液に2, 6-ジメチルピリジン (28 μL , 0.2 mmol)、HOAt (13.5 μL , 0.1 mmol) およびPyBOP (52.0 mg, 0.1 mmol) を添加した。40℃で一晩撹拌した後、反応混合物をEtOAc (×3) で抽出し、食塩水で洗浄し、 MgSO_4 にて乾燥させ、次いで濃縮して粗ペプチドS5を得た。S5残渣にTFA/フェノール/アニソール/DODT (=90:5:3:2) (2.0 mL) を添加し、30分撹拌し、次いで反応混合物を濾過した。濾液を Et_2O (12 mL) で希釈し、冷却し(-30℃)、次いで3500×gで10分間、4℃で遠心分離して粗ペプチド3を得た。逆相HPLC (Wakosil-I I 5C18 AR, 20 x 250 mm カラム) ($\text{MeCN} + 0.1\% \text{TFA} : \text{H}_2\text{O} + 0.1\% \text{TFA}$ (40:60) にて溶出) にて粗ペプチド3を精製して、ペプチド3 (19工程で収量4.3 mg, 収率9.3 %) を白色泡状物質として得た。

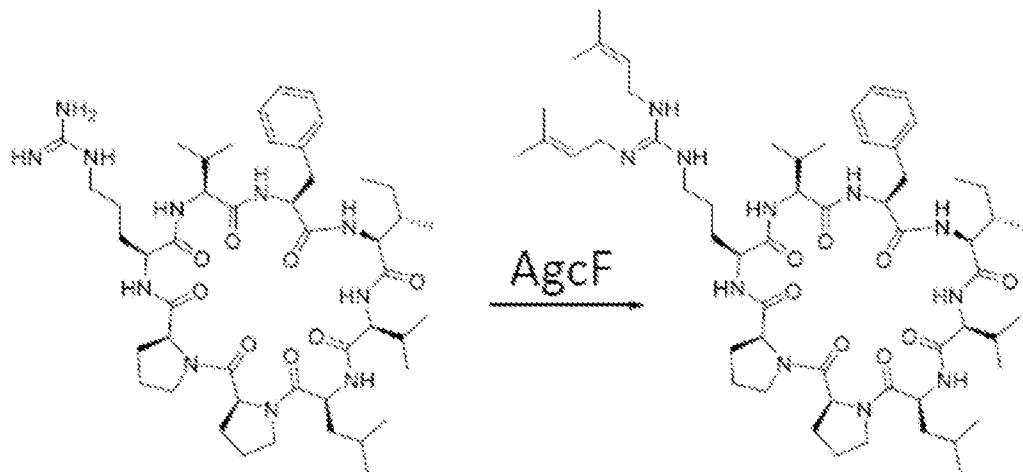
合成されたペプチド3、*Microcystis aeruginosa* NIES-88から単離されたアルギンクラミドC (上記(3) 参照) について、LC-MSの結果を比較した(図1)。両者のピークが同じ保持時間にて見られた。また、両者を混合した場合も、同じ保持時間にて1つのピークが見られた。

合成されたペプチド3、*Microcystis aeruginosa* NIES-88から単離されたアルギシクラミドC（上記（3）参照）について、 ^1H NMR（500 MHz, DMSO- d_6 ）および ^{13}C NMR（125 MHz, DMSO- d_6 ）の結果を比較した（それぞれ図2および図3）。 ^1H NMRおよび ^{13}C NMRの両方において、合成されたペプチド3と*Microcystis aeruginosa* NIES-88から単離されたアルギシクラミドCのチャートのパターンが一致した。

これらの結果から、合成されたペプチド3は、*Microcystis aeruginosa* NIES-88から単離されたアルギシクラミドCと同一物質であることが確認された。

[0094] （7）本発明の酵素（AgcF）によるアルギシクラミドC（3）からアルギシクラミドA（1）への変換（下スキーム）

[化12]



プレニル基供与体としてジメチルアリルニリン酸（DMAPP）を用い、プレニル基受容体としてアルギシクラミドC（上記合成品3）を用いて、上記（5）の手順で得られた組換えAgcFによるプレニル基転移反応についてインビトロにて確認した。反応液（50 μL ）は以下のものを含んでいた：50 mM Tris-HCl（pH 8.0）、200 μM アルギシクラミドC、1 mM DMAPP、1 mM ジチオスレイトール、500 mM NaCl、50 mM MgCl_2 。組換えAgcFを反応液に添加して37℃で2時間反応を行った。反応液を経時的にサンプリングし、逆相HPLCに

より分析した。

[0095] 基質および反応生成物の消長を図4に示す。反応時間の経過とともに基質3の消費とb i s－プレニル化体1の生成が確認された。反応前期（5～30分）にはモノプレニル化体2の生成も確認された。反応前に熱失活したA g c Fを用いて反応を行った場合は、基質3のピークのみが見られた。これらの結果から、A g c Fにより実際にプレニル基が3のアルギニン残基に転移され、1が生成したことが確認された。

[0096] （8）プレニル基受容体ペプチド中のアミノ酸に関する研究－本発明の酵素（A g c F）の基質選択性

上の実験結果からわかるように、A g c Fは、ペプチド中のアルギニン残基に対して2回作用することで、アルギニン残基のビスプレニル化を触媒する新規酵素である。A g c Fはペプチド中のリジン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン残基のプレニル化は触媒しないことも明らかになっている（データ示さず）。そこで、A g c Fのより詳細な基質選択性について研究した。本実験では、基質ペプチド中のアルギニン以外の配列に対する選択性を調べた。

[0097] アルギシクラミドCの配列に含まれるアミノ酸残基を1つずつアラニンに置換した環状ペプチドを合成し、各ペプチドについて（7）と同様の条件にて反応を行った。結果を図5に示す。大半の基質についてビスプレニル化が優位に進行し、中間体であるモノプレニル体の生成も確認された。しかし、アルギニンの隣に位置するプロリンをアラニンに置換した場合のみ、反応の進行が認められなかった。これらの結果から、アルギニンに隣接するプロリンがA g c Fの触媒活性に重要であること、プロリン以外の配列に関しては、A g c Fは寛容な選択性を有することがわかった。

[0098] （9）モノプレニル化を触媒する本発明の酵素（A g c F）の変異体

遺伝子組換え法を用いて、A g c FのN末端から167番目のヒスチジン残基（H167）をアラニン残基に置換したA g c Fの変異体（A g c F__H167A）を得た。この変異体を用いて、（7）と同様の条件にてアルギ

シクラミドCのプレニル化反応を行った。結果を図6に示す。酵素添加反応系のHPLCチャートにおいて、保持時間約6.4分のところに新たなピークの生成が認められた。質量分析(MS)により、この新たな生成物は、アルギシクラミドCのアルギニン残基がモノプレニル化体であることが明らかとなった。酵素添加反応系のHPLCチャートにおいて、ビスプレニル化体のピークは認められなかった。これらの結果から、AgcFのH167はアルギニン残基のビスプレニル化にとり重要な残基であること、AgcFのH167を他のアミノ酸に置換すると、ビスプレニル化が抑制され、モノプレニル化体が蓄積することがわかった。

[0099] (10) AgcFホモログUHCC0183PTによるプレニル化反応

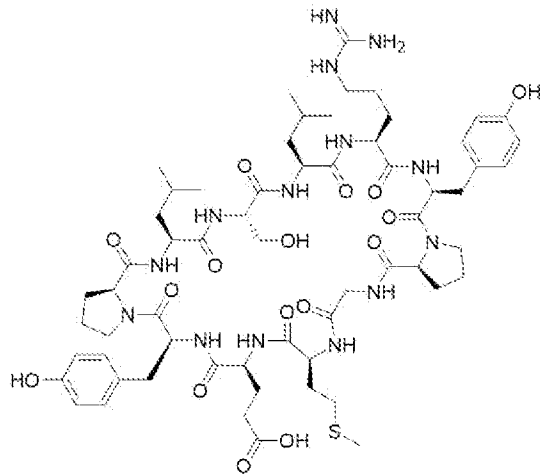
(i) 組換えUHCC0183PTの調製

Aphanizomenon sp. UHCC 0183の有するAgcFホモログの公開配列(WP_168465419.1)を参考にして、大腸菌用にコドン最適化した塩基配列を合成し、pColdIIのNdeI/HindIII部位に挿入してN末端Hisタグ融合タンパク質発現プラスミドUHCC0183PT-pColdIIを作製した。上記「(5)組換えAgcFの調製」と同様にして、組換えUHCC0183PTタンパク質を調製した。組換えUHCC018PTのアミノ酸配列を配列番号:8に示す。

(ii) 酵素反応基質

下式に示す基質(プレニル基受容体)を合成し、使用した。

[化13]



Chemical Formula: $C_{61}H_{90}N_{14}O_{16}S$
Exact Mass: 1306.64

UHCC0183
cyc[MEYPLSLRYPG]

基質の合成は、上記「(6) アルギシクラミドC (3) 全合成」と同様の手順で行った。

(i i i) UHCC0183PTによるプレニル化反応

組換えUHCC0183PT、上記基質およびDMAPPを用いて、「(7) 本発明の酵素(AgcF)によるアルギシクラミドC(3)からアルギシクラミドA(1)への変換」と同様の条件で酵素反応を行った。

反応物をUPLCにて分析した。図7AのUPLCクロマトグラムに示すように、酵素依存的にモノプレニル化体とビスプレニル化体が生成した。基質が4.7分、モノプレニル化体が5.3分、ビスプレニル化体が5.9分に溶出した。図7BのUPLC-MS分析の結果から、UPLCクロマトグラムの各ピークが基質、モノプレニル化体、およびビスプレニル化体に由来するものであることが確認された。

[0100] (11) AgcFホモログPCC9443PTによるプレニル化反応

(i) 組換えPCC9443PTの調製

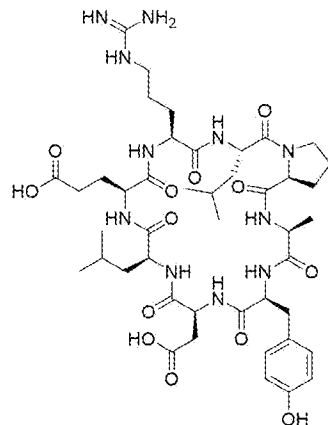
Microcystis aeruginosa PCC 9443の有するAgcFホモログの公開配列(WP_002767616)を参考にして、大腸菌用にコドン最適化した塩基配列を合成した。上で説明した組換えUHCC0183PTの調製と同様の方法にて

、組換え P C 9 4 4 3 P T を得た。組換え P C C 9 4 4 3 P T のアミノ酸配列を配列番号：11に示す。

(i i) 酵素反応基質

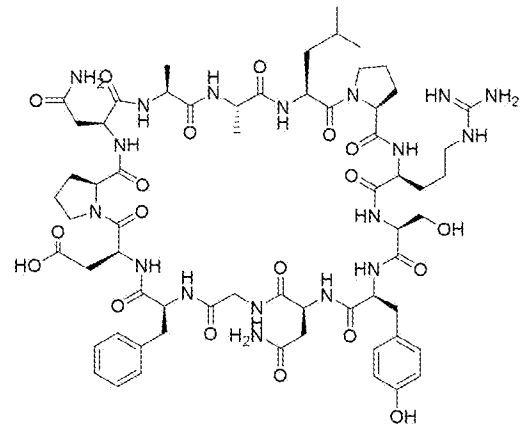
下式に示す基質（プレニル基受容体）を合成し、使用した。

[化14]



Chemical Formula: $C_{44}H_{67}N_{11}O_{13}$
Exact Mass: 957.49

PCC9443_2
cyc[DLERLPAY]



Chemical Formula: $C_{63}H_{90}N_{18}O_{19}$
Exact Mass: 1402.66

PCC9443_3
cyc[FDPNAAALPRSYNG]

基質の合成は、上記「(6) アルギシクラミド C (3) 全合成」と同様の手順で行った。

(i i i) P C C 9 4 4 3 P T によるプレニル化反応

組換え U H C C 0 1 8 3 P T、上記基質および D M A P P を用いて反応を行い、反応物を H P L C または U P L C にて分析し、プレニル化生成物を確認する。さらに、質量スペクトル分析にてプレニル化生成物を確認する。

産業上の利用可能性

[0101] 本発明は、創薬、機能性ペプチドの製造等の分野において有用である。

配列表フリーテキスト

[0102] 配列番号：1 は、A g c F（野生型）のアミノ酸配列を示す。

配列番号：2 は、A g c F（野生型）をコードする遺伝子の塩基配列を示す。

配列番号：3 は、A g c F をコードする D N A フラグメントを増幅するた

めのフォワードプライマーの塩基配列を示す。

配列番号：4は、A g c FをコードするDNAフラグメントを増幅するためのリバースプライマーの塩基配列を示す。

配列番号：5は、組換えA g c Fのアミノ酸配列を示す。

配列番号：6は、U H C C O 1 8 3 P T（野生型）のアミノ酸配列を示す。

配列番号：7は、U H C C O 1 8 3 P T（野生型）をコードする遺伝子の塩基配列を示す。

配列番号：8は、組換えU H C C O 1 8 3 P Tのアミノ酸配列を示す。

配列番号：9は、P C C 9 4 4 3 P T（野生型）のアミノ酸配列を示す。

配列番号：10は、P C C 9 4 4 3 P T（野生型）をコードする遺伝子の塩基配列を示す。

配列番号：11は、組換えP C C 9 4 4 3 P Tのアミノ酸配列を示す。

請求の範囲

- [請求項1] 下記アミノ酸配列を含む、ペプチド中のアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基、あるいはアルギニンまたはアルギニン類縁体にプレニル基を転移する酵素：
- (a) 配列番号：1のアミノ酸配列、
 - (b) 配列番号：1のアミノ酸配列に対して58%以上の同一性を有するアミノ酸配列、または
 - (c) 配列番号：1に示すアミノ酸配列において1ないし数個のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列。
- [請求項2] 下記塩基配列を含む核酸：
- (a) 配列番号：1のアミノ酸配列をコードする塩基配列、
 - (b) 配列番号：1のアミノ酸配列に対して58%以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列、
 - (c) 配列番号：1に示すアミノ酸配列において1ないし数個のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列、または
 - (d) 配列番号：1に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列に対して相補的な塩基配列にストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列。
- [請求項3] 請求項2に記載の核酸によりコードされる、ペプチド中のアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基、あるいはアルギニンまたはアルギニン類縁体にプレニル基を転移する酵素。
- [請求項4] 請求項2に記載の核酸を含むベクター。
- [請求項5] 下記工程を含む、ペプチド中のアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基、あるいはアルギニンまたはアルギニン類縁体にプレニル基を転移する酵素の製造方法：
- (a) 請求項2に記載の核酸または請求項4に記載のベクターを細胞に導入する工程、

(b) 工程 (a) で得られた細胞を培養する工程、および

(c) 工程 (b) で得られた培養物からペプチド中のアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基、あるいはアルギニンまたはアルギニン類縁体をプレニル化する酵素を得る工程。

[請求項6] 下記 (i) および (i i) :

(i) アルギニン残基またはアルギニン類縁体残基を含むペプチド、あるいはアルギニンまたはアルギニン類縁体

(i i) プレニル基含有化合物

に請求項 1 または 3 に記載の酵素を作用させることを含む、アルギニン残基またはアルギニン類縁体残基がプレニル化されたペプチド、あるいはプレニル化されたアルギニンまたはアルギニン類縁体の製造方法。

[請求項7] ペプチドが環状ペプチドである、請求項 6 記載の方法。

[請求項8] ペプチドにおいて、プロリン残基がアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基に隣接しており、プロリン残基がそのカルボキシル基を介してアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基のアミノ基に結合している、請求項 6 または 7 記載の方法。

[請求項9] 酵素が、配列番号：1 に示すアミノ酸配列の N 末端から 167 番目のアミノ酸残基がヒスチジン以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列を含むものであるか、あるいは配列番号：1 に示すアミノ酸配列の N 末端から 167 番目のアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基がヒスチジン以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列を含むものであり、プレニル化がモノプレニル化である、請求項 6～8 のいずれか 1 項記載の方法。

[請求項10] ヒスチジン以外のアミノ酸がアラニンである、請求項 9 項記載の方法。

[請求項11] アルギニン残基またはアルギニン類縁体残基を含むペプチド、あるいはアルギニンまたはアルギニン類縁体を含む化合物ライブラリーに

請求項 1 または 3 に記載の酵素を作用させることを含む、アルギニン残基またはアルギニン類縁体残基がプレニル化されたペプチド、あるいはプレニル化されたアルギニンまたはアルギニン類縁体を含む化合物ライブラリーの製造方法。

[請求項12] ペプチドが環状ペプチドである、請求項 1 1 記載の方法。

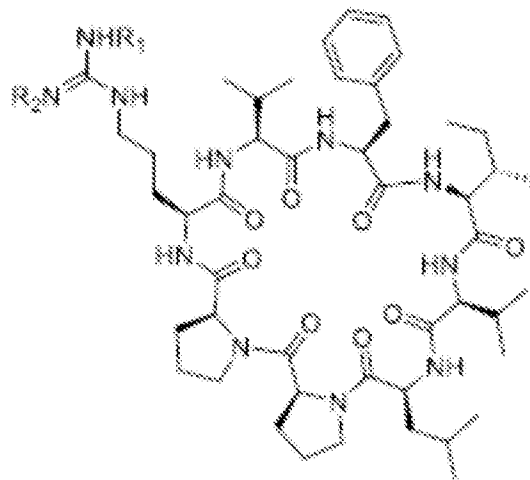
[請求項13] ペプチドにおいて、プロリン残基がアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基に隣接しており、プロリン残基がそのカルボキシル基を介してアルギニン残基またはアルギニン類縁体残基のアミノ基に結合している、請求項 1 1 または 1 2 記載の方法。

[請求項14] 酵素が、配列番号：1 に示すアミノ酸配列のN末端から167番目のアミノ酸残基がヒスチジン以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列を含むものであるか、あるいは配列番号：1 に示すアミノ酸配列のN末端から167番目のアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基がヒスチジン以外のアミノ酸残基であるアミノ酸配列を含むものであり、プレニル化がモノプレニル化である、請求項 1 1 ～ 1 3 のいずれか 1 項記載の方法。

[請求項15] ヒスチジン以外のアミノ酸がアラニンである、請求項 1 4 項記載の方法。

[請求項16] 式 (I) :

[化1]



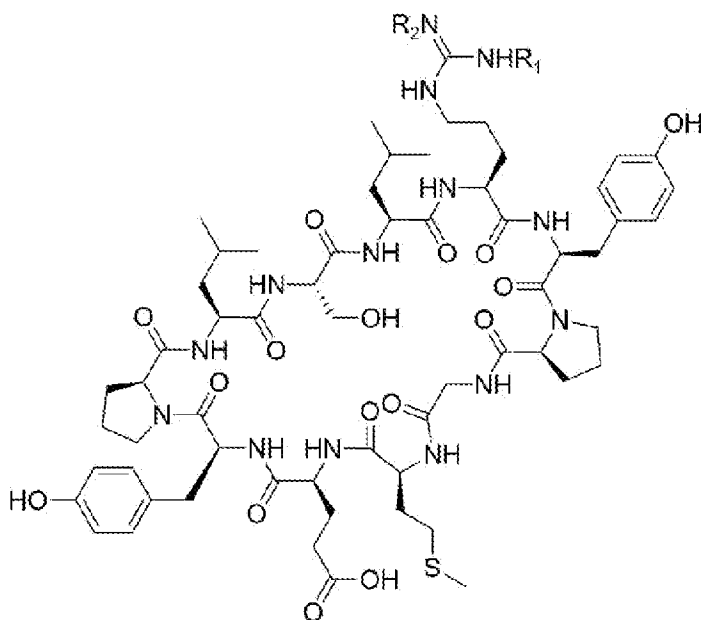
(I)

[式中、 R_1 は水素またはプレニル基であり、 R_2 は水素またはプレニル基である]

で示される化合物。

[請求項17] 式 (I I) :

[化2]



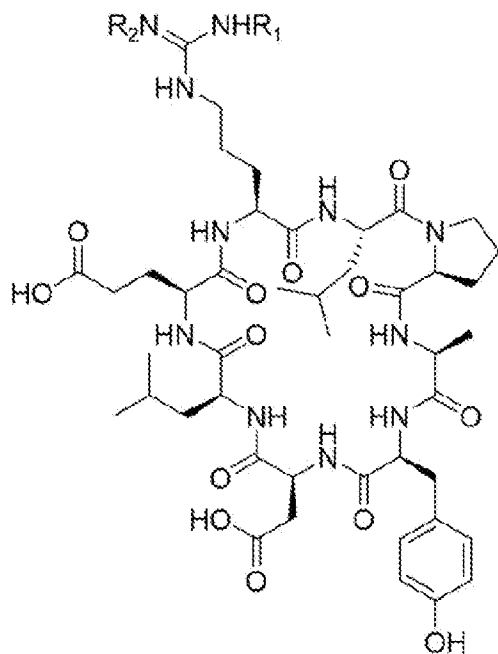
(I I)

[式中、 R_1 は水素またはプレニル基であり、 R_2 は水素またはプレニル基である]

で示される化合物。

[請求項18] 式 (I I I) :

[化3]



(I I I)

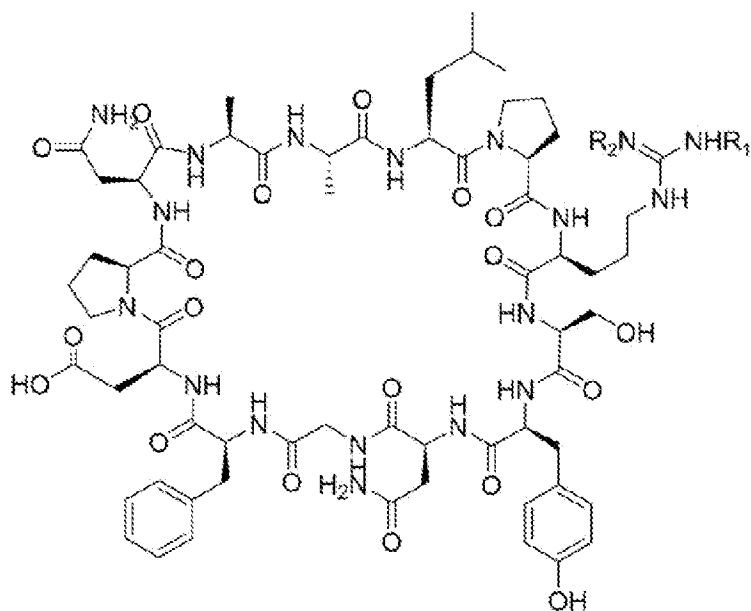
[式中、 R_1 は水素またはプレニル基であり、 R_2 は水素またはプレニル基である]

で示される化合物。

[請求項19]

式 (I V) :

[化4]

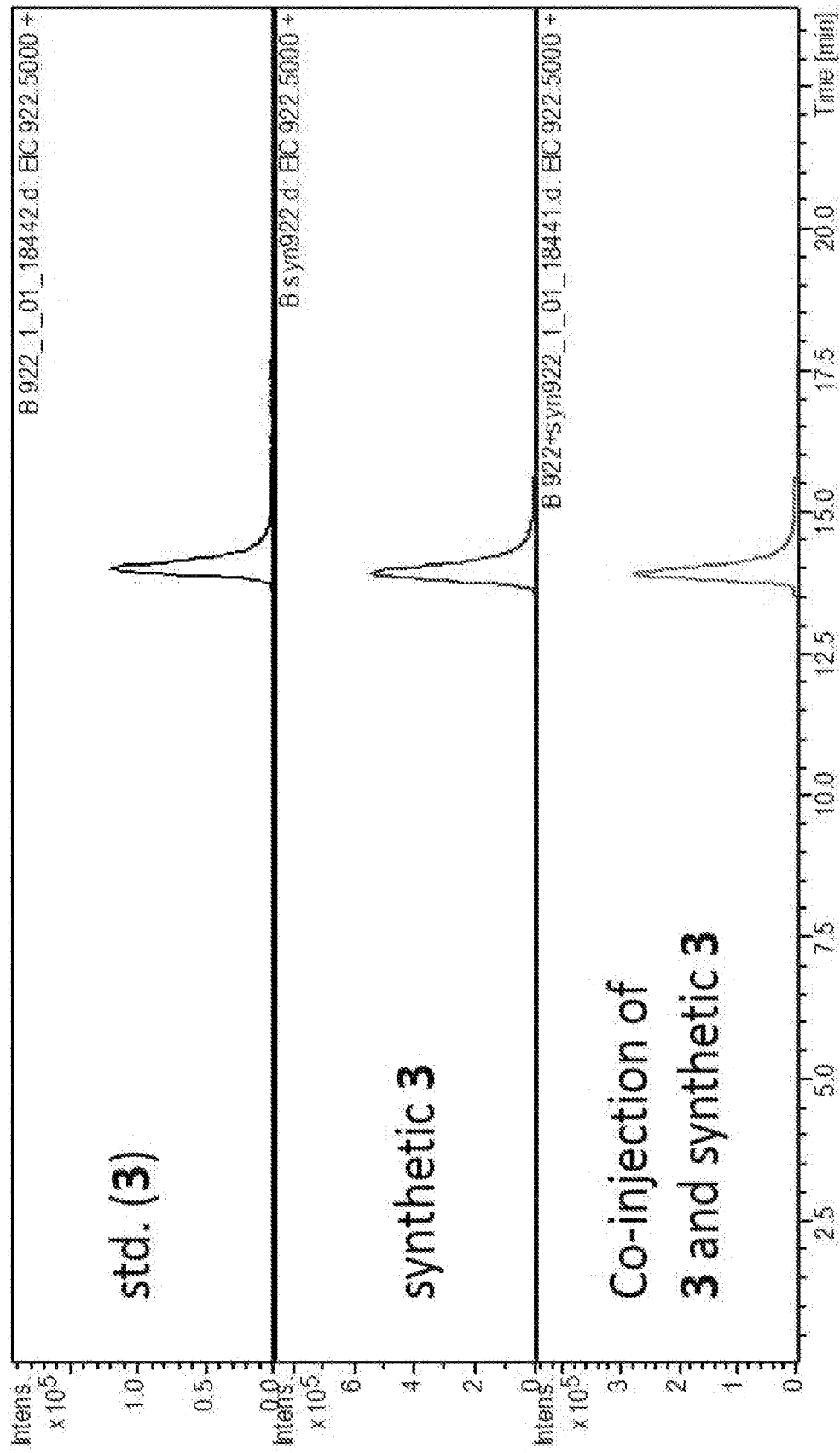


(I V)

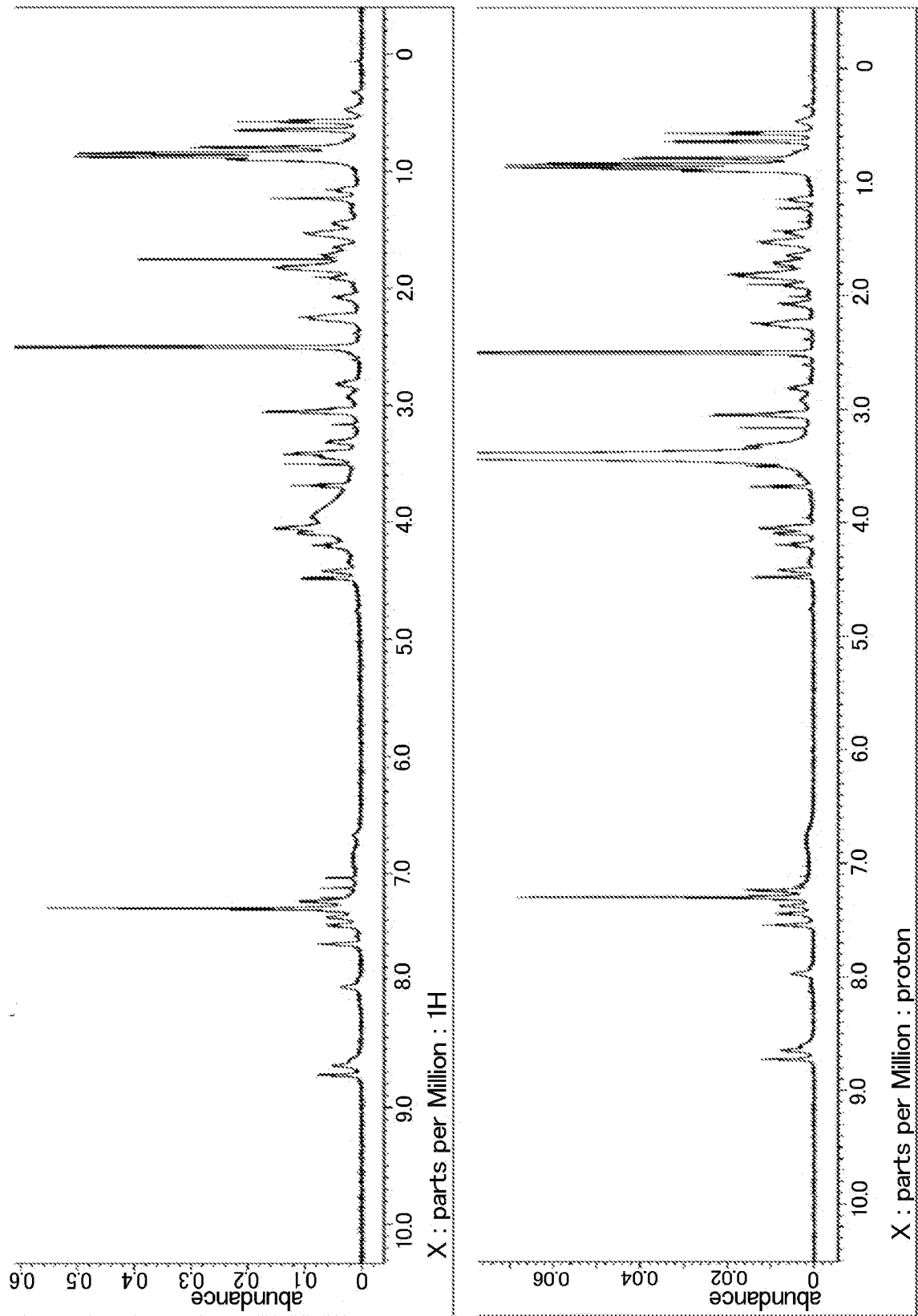
[式中、 R_1 は水素またはプレニル基であり、 R_2 は水素またはプレニル基である]

で示される化合物。

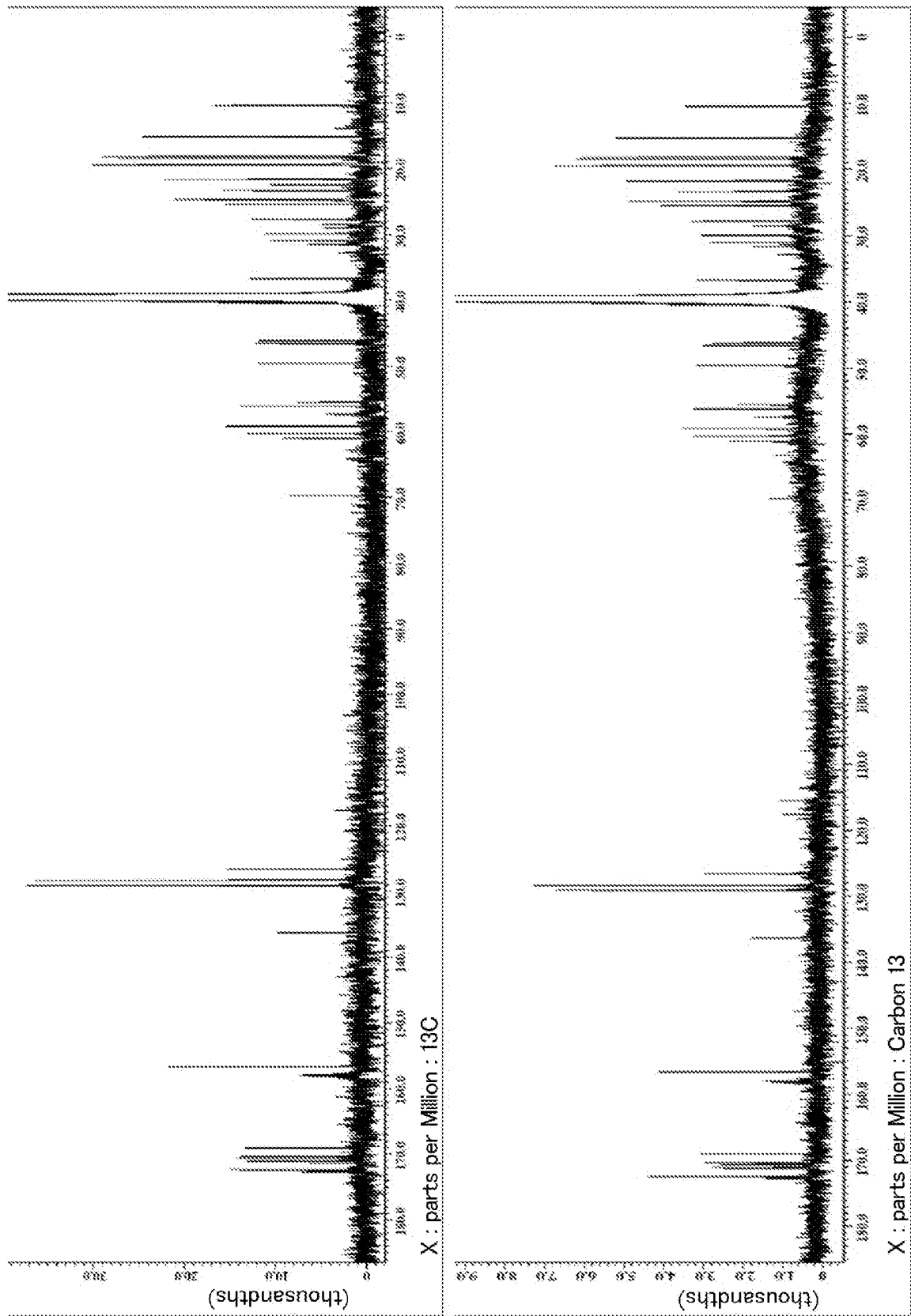
[1]



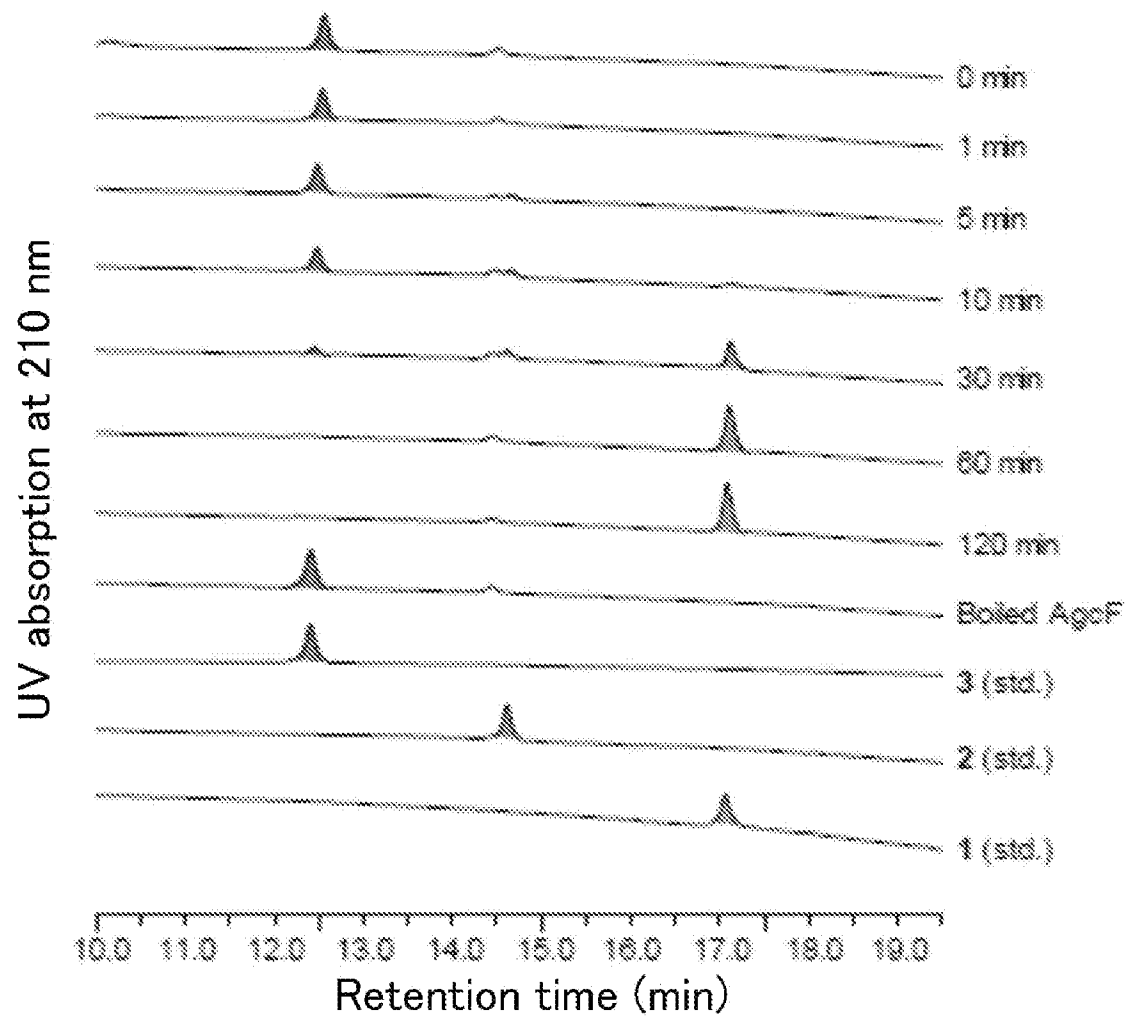
[図2]



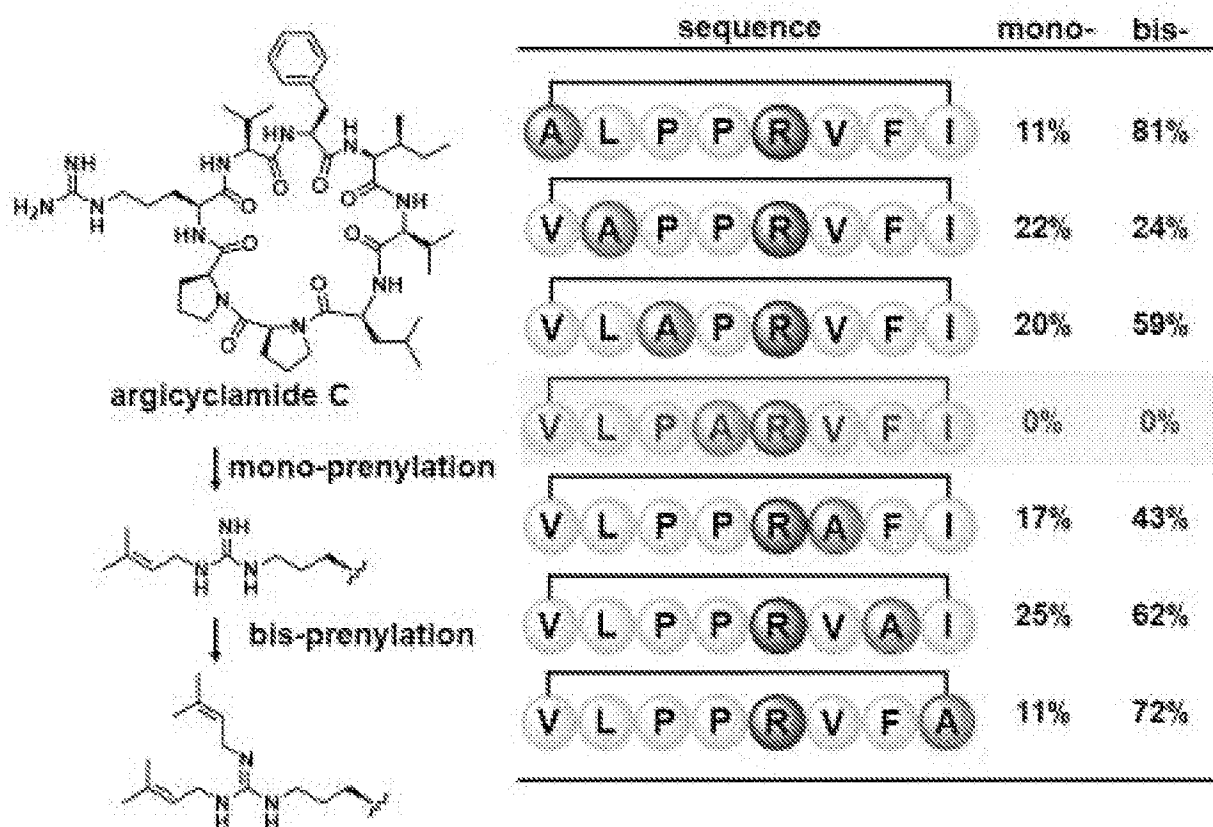
[図3]



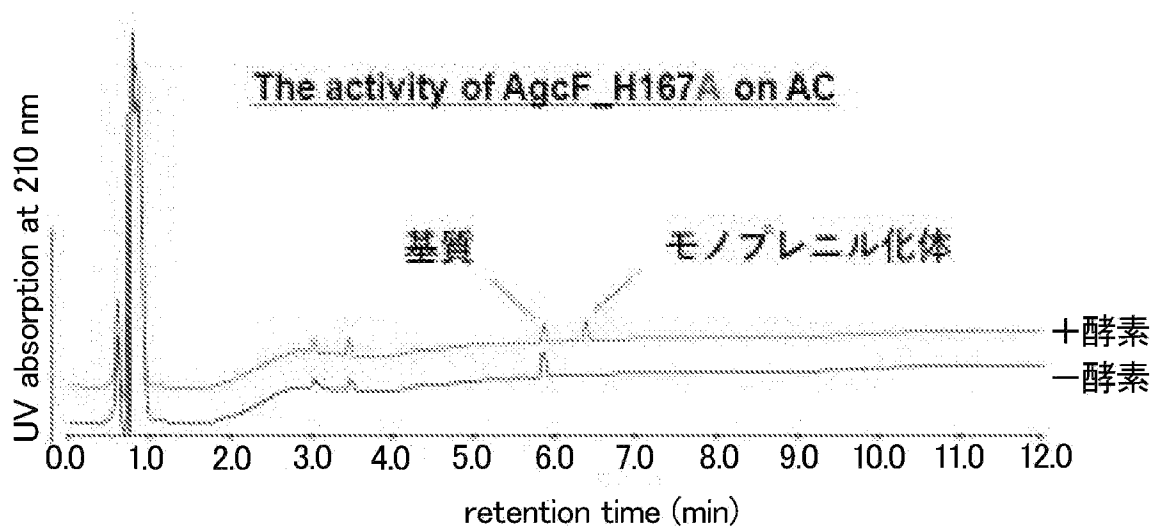
[図4]



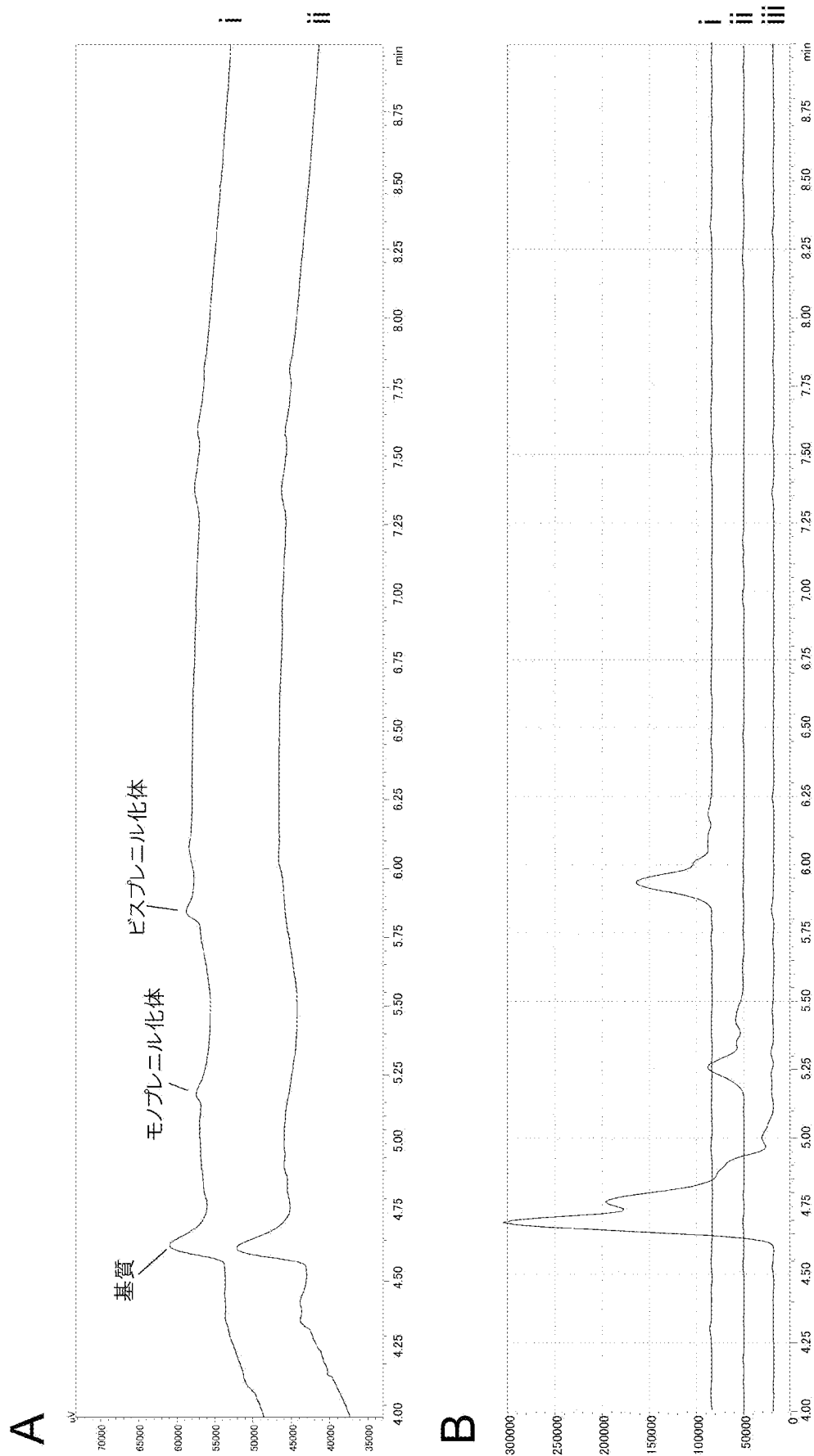
[図5]



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/004501

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C40B 40/10</i> (2006.01)i; <i>C12P 13/10</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/54</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/63</i> (2006.01)i; <i>C12N 9/10</i> (2006.01)i FI: C12N15/54 ZNA; C12N15/63 Z; C12N9/10; C12P13/10 B; C40B40/10 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C40B40/10; C12P13/10; C12N15/54; C12N15/63; C12N9/10 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DBJ/ GeneSeq; UniProt/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/080490 A1 (UNIV TOKYO) 23 April 2020 (2020-04-23) table 4, SEQ ID NO: 8	1, 3
Y	table 4, SEQ ID NO: 8	2, 4, 5
A	table 4, SEQ ID NO: 1, 8	6-19
X	UniProtKB/TrEMBL. Accession No. A0A139GIA2. https://www.uniprot.org/uniprot/A0A139GIA2.txt?version=9 , 16 March 2022 [retrieval date], 02 December 2020 in particular, sequence, line 7	1, 3
Y	in particular, sequence, line 7	2, 4, 5
A	in particular, sequence, line 7	6-19
X	UniProtKB/TrEMBL. Accession No. A0A551YQI4. https://www.uniprot.org/uniprot/A0A551YQI4.txt?version=4 , 16 March 2022 [retrieval date], 02 December 2020 in particular, sequence	1, 3
Y	in particular, sequence	2, 4, 5
A	in particular, sequence	6-19
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 08 April 2022		Date of mailing of the international search report 19 April 2022
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/004501**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PARAJULI, A. et al. A Unique Tryptophan C-Prenyltransferase from the Kawaguchipectin Biosynthetic Pathway. Angew. Chem. Int. Ed. 07 March 2016, vol. 55, no. 11, pp. 3596-3599 abstract, table 1	1-19
A	OKADA, M. et al. Stereospecific prenylation of tryptophan by a cyanobacterial post-translational modification enzyme. Org. Biomol. Chem. 12 October 2016, vol. 14, no. 40, pp. 9639-9644 abstract, table 1	1-19
P, X	PHAN, C. S. et al. Argicyclamides A-C Unveil Enzymatic Basis for Guanidine Bis-prenylation. J. Am. Chem. Soc. 28 June 2021, vol. 143, no. 27, pp. 10083-10087 abstract, etc.	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/004501

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1-19 set forth a compound having a peptide skeleton represented by SEQ ID NO: 1, formula (I), formula (II), formula (III), or formula (IV). However, these compounds do not have a homology to each other, and thus do not share a common structure, that is, an important structural element. The peptide skeleton is shared by all peptide molecules, and is thus not considered to be an important structural element. Accordingly, the five compounds do not share an important structural element, and are not considered to share a same or corresponding technical feature.

Therefore, the claims are classified into the following five inventions.

(Invention 1) Claims 1-15: An enzyme which transfers a prenyl group and is represented by SEQ ID NO: 1, a nucleic acid encoding the enzyme, a vector including the nucleic acid, a method for producing the enzyme, and a method for producing a compound library including prenylated arginine or arginine using the enzyme

(Invention 2) Claim 16: A compound represented by formula (I)

(Invention 3) Claim 17: A compound represented by formula (II)

(Invention 4) Claim 18: A compound represented by formula (III)

(Invention 5) Claim 19: A compound represented by formula (IV)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/004501

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2020/080490	A1	23 April 2020	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C40B 40/10(2006.01)i; C12P 13/10(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 9/10(2006.01)i FI: C12N15/54 ZNA; C12N15/63 Z; C12N9/10; C12P13/10 B; C40B40/10		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C40B40/10; C12P13/10; C12N15/54; C12N15/63; C12N9/10		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2022年 日本国実用新案登録公報 1996-2022年 日本国登録実用新案公報 1994-2022年		
国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DBJ/ GeneSeq; UniProt/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2020/080490 A1 (国立大学法人東京大学) 23.04.2020 (2020-04-23)	1, 3
Y	表4、配列番号8	2, 4, 5
A	表4、配列番号1, 8	6-19
X	UniProtKB/TrEMBL, Accession No. A0A139GIA2, https://www.uniprot.org/uniprot/A0A139GIA2.txt?version=9 , 2022年3月16日[検索日], 2020.12.02	1, 3
Y	特に配列、7行	2, 4, 5
A	特に配列、7行	6-19
X	UniProtKB/TrEMBL, Accession No. A0A551YQI4, https://www.uniprot.org/uniprot/A0A551YQI4.txt?version=4 , 2022年3月16日[検索日], 2020.12.02	1, 3
Y	特に配列	2, 4, 5
A	特に配列	6-19
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献	
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの		
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）		
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献		
国際調査を完了した日 08.04.2022	国際調査報告の発送日 19.04.2022	
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 小金井 悟 4B 3961 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	PARAJULI A. et al., A Unique Tryptophan C-Prenyltransferase from the Kawaguchipectin Biosynthetic Pathway, Angew. Chem. Int. Ed., 2016.03.07, Vol.55, No.11, pp.3596-3599 要約、表1	1-19
A	OKADA M. et al. , Stereospecific prenylation of tryptophan by a cyanobacterial post-translational modification enzyme, Org. Biomol. Chem., 2016.10.12, Vol.14, No.40, pp.9639-9644 要約、表1	1-19
P, X	PHAN C. S. et al., Argicyclamides A-C Unveil Enzymatic Basis for Guanidine Bis-prenylation, J. Am. Chem. Soc., 2021.06.28, Vol.143, No.27, pp.10083-10087 要約等	1-19

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、P C T規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(P C T規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式 (P C T規則13の3.1(b)及びP C T実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求項1－19には、配列番号1、式（I）、式（II）、式（III）又は式（IV）で示されるペプチド骨格を有する化合物が記載されている。しかし、これらの化合物は互いに相同性がないから、共通の構造、即ち、重要な構造要素を共有していない。ペプチド骨格は、全てのペプチド分子で共有しているので、重要な構造要素であるとは認められない。よって、上記5の化合物は、重要な構造要素を共有しておらず、同一の又は対応する技術的特徴を持っているとはみなされない。

よって、請求の範囲には、以下の5つの発明に区分される。

（発明1）請求項1－15：配列番号1で示されるプレニル基を転移する酵素、該酵素をコードする核酸、該核酸を含むベクター、該酵素の製造方法、該酵素を用いるプレニル化されたアルギニン又はアルギニンを含む化合物ライブラリーの製造方法

（発明2）請求項16：式（I）で示される化合物

（発明3）請求項17：式（II）で示される化合物

（発明2）請求項18：式（III）で示される化合物

（発明3）請求項19：式（IV）で示される化合物

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の
申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/004501

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
W0	2020/080490	A1	23.04.2020	(ファミリーなし)	