

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 27 年度博士課程入学  
氏名 角田 毅  
指導教員名 大西 康夫

### 論文題目

## 非リボソームペプチド生合成におけるピロリジルグリシン生合成と モジュール間相互作用に関する研究

### 第一章 序論

非リボソームペプチド (NRP) は、リボソームを介さずに、NRP 合成酵素 (NRPS) によって合成されるペプチドであるため、非タンパク質性のアミノ酸を構造中に含むことができる。一般的な NRPS では、特定の機能をもった複数のドメインから構成されるモジュールが機能単位であり、1つのモジュールが1つのペプチド結合形成を担う。NRPS はまず、A (adenylation) ドメインが基質アミノ酸のカルボキシル基を AMP 化することで活性化し、CP (carrier protein) ドメインが活性化されたアミノ酸を自身のもつ 4-ホスホパンテテインのチオール部位に結合させる。通常、開始モジュールは A ドメインと CP ドメインだけからなるが、伸長モジュールは、これらに加え C (condensation) ドメインをもち、C ドメインは前モジュールの CP ドメインに結合したペプチド鎖と当該モジュールの CP ドメインに結合したアミノ酸との間でアミド結合を形成する。この一連の反応がモジュールの数だけ起こりペプチド鎖が伸長し、最終モジュールに存在する TE (thioesterase) ドメインにより、ペプチド鎖は NRPS から切り離される。複数のモジュールによって合成される NRP では、一定の順序でアミノ酸が結合していかなければならず、特に複数の単モジュール NRPS から合成される NRP の場合、各モジュール間の相互作用が NRPS の組み立てラインの正確性の担保に重要であると考えられるが、その詳細な機構はわかっていない。

JBIR-126 (tambromycin) は放線菌 *Streptomyces* sp. NBRC111228 や他のいくつかの *Streptomyces* 属放線菌から単離された NRP である (図 1)。その化学構造中には pyrrolidyl glycine (Py-Gly, 図 1) が存在するが、Py-Gly を有する NRP は JBIR-126 以外には発見されていない。そこで、Py-Gly の生合成機構に興味をもち研究に着手した。また、通常、NRPS は巨大なタンパク質であり、組換えタンパク質として取得できる例は多くない。しかしながら、JBIR-126 と化学構造が類似した JBIR-34, -35 のペプチド鎖合成を担う 4

つの単モジュール NRPS (FmoA2-A5) は組換えタンパク質として取得可能であるため、JBIR-126 の生合成に関わる NRPS も取得可能であると考えられた。そこでこれらを用いて、NRPS 組立てラインが正確に駆動する分子機構の解明を試みることにした。

## 第二章 Py-Gly の生合成研究

これまでに *pgp* クラスタと名付けられた JBIR-126 の生合成遺伝子クラスターが同定されていた。JBIR-34, -35 と JBIR-126 の化学構造中の大きな差異は Py-Gly の有無であるため、それぞれの生合成遺伝子クラスターを比較し、Py-Gly の生合成に関与する酵素をコードする遺伝子を探索した。その結果、2つの acyl-CoA 脱水素酵素 (*pgpL, N*) と stand-alone な C ドメイン様のタンパク質 (*pgpK*)、アセチル基転移酵素 (*pgpO*) が *pgp* クラスタにのみ存在することから、これらを候補として考えた。また、他グループによって行われた安定同位体取り込み実験の結果、Py-Gly は Lys から生合成されることが明らかになっている。これらの情報より、以下の2つの生合成経路を推定した。(1) Lys が PgpL/N により脱水素され  $\alpha,\beta$  不飽和 Lys が生成した後、PgpK による立体選択的な 1,4-付加型の環化反応が進行し Py-Gly が生成する。(2) Lys が PgpL/N による還元型フラビンをを用いた  $\beta$  位の水酸化を受け、続いて、導入された水酸基への PgpO によるアセチル化、脱水が起きることで  $\alpha,\beta$  不飽和 Lys が生じ、PgpK による前述のような環化反応が進行し Py-Gly が生成する。

また、非タンパク質性のアミノ酸の生合成を解明する際に問題となるのは修飾が起きるタイミングである。Py-Gly の場合では以下の3つが考えられる。(i) 遊離の Lys の状態で環化する。(ii) NRPS に結合した後に NRPS 上で環化する。(iii) NRPS から切り離さ

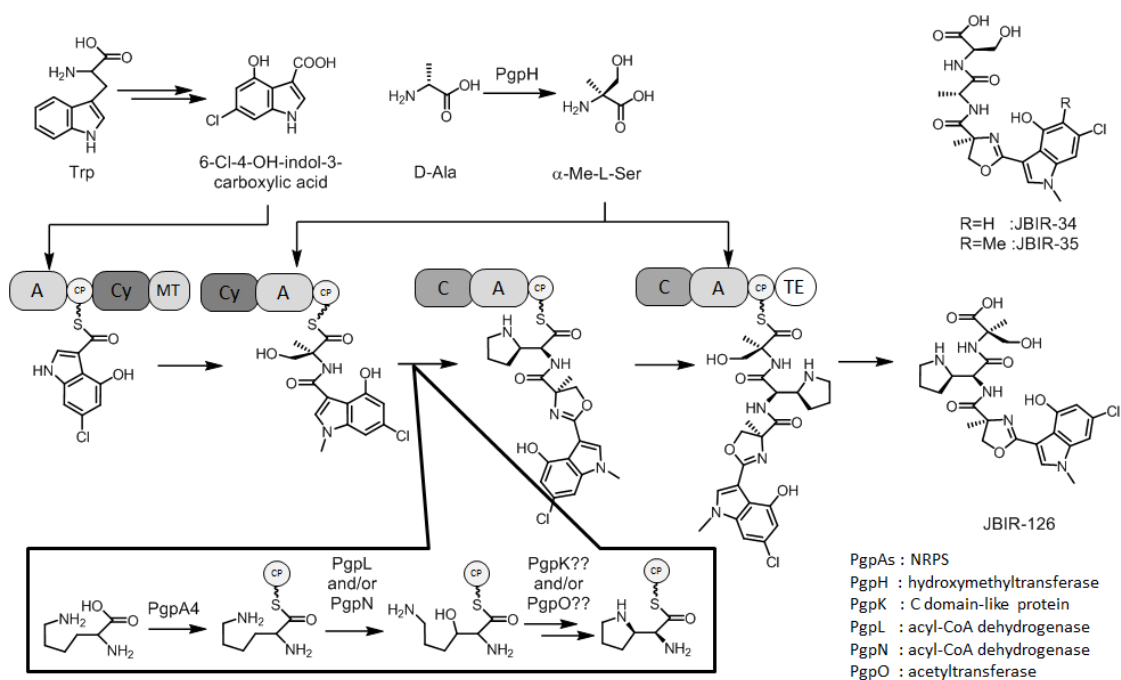


図1 JBIR-34, -35 と JBIR-126 の化学構造と JBIR-126 の推定生合成経路

れた後のペプチド鎖の状態で環化する。まず、環化のタイミングを明らかにするために、*pgp* クラスター中の NRPS であり、ペプチド合成に関与すると考えられる PgpA2-A5 の組換えタンパク質を取得した。それぞれの基質特異性を調べたところ、PgpA4 は Lys を認識した一方、Py-Gly はどの NRPS にも認識されなかった。これより (i) でなく (ii), (iii) であることが強く示唆された (図 1 枠内)。さらに、環化のタイミングを絞り込むために PgpA2-A5 を用いて Lys が環化していないトリ/テトラペプチドが生成されるかどうかを *in vitro* 酵素反応系で調べた。その結果、ジペプチドの生成は観測できたものの、環化していないトリ/テトラペプチドは全く検出されなかった。この結果より、環化のタイミングは(ii)であることが示唆された。続いて環化反応の検証を行うべく PgpK, L, N, O とフラビン還元酵素 (Fre) の組換えタンパク質の取得を試みた。PgpO, Fre は取得できたが、種々の条件検討を重ねたものの、PgpK, L, N の組換えタンパク質を取得することはできなかった。そこで、JBIR-126 の生合成遺伝子クラスター全体が保存されており、かつ、JBIR-126 の生産性が確認されている他の放線菌の中から、*Streptomyces virginiae* JCM 4425 と *Streptomyces sclerotialis* JCM4828 を選び、これらの放線菌のホモログを利用することとした。種々の検討を行った結果、3つのホモログ酵素に関して、大腸菌で生産・精製に成功した (SsPgpK, SvPgpL, SsPgpN)。これらを用いて PgpA4 上での環化反応を *in vitro* で再構築したところ、Py-Gly の生成が確認された。現在までに NADPH が反応に必須であることがわかっているため、経路 (2) で Py-Gly が合成されている可能性が高いと考えている (図 1 枠内)。

### 第三章 NRPS のモジュール間での反応に関する研究

近年いくつかの NRPS においてモジュール全体での結晶構造解析がなされており、NRPS のモジュール内のダイナミクスが明らかになっている。しかしながら、連続したモジュールの生産、精製が必要となる NRPS 組立てラインの機構に関する研究はあまり進んでいない。そこで、連続したモジュールが取得可能な PgpAs/FmoAs を用いてこれの検証を行うこととした。なかでも、PgpA2, A3 および FmoA2, A3 は JBIR-126 と JBIR-34, -35 の化学構造を反映し全く同じドメイン構成である。また、これらの NRPS はその配列情報からモジュール間相互作用を担うドッキングドメインを持たないと推察された。そこで、これらのモジュール間相互作用の分子機構を明らかにすべく研究を開始した。

まず同じドメイン構成を持つ PgpA2, A3 と FmoA2, A3 が機能的に相補できるのかに興味を持った。PgpA2 と FmoA3、もしくは FmoA2 と PgpA3 を基質、補因子と反応させ、生成するジペプチドをアルカリ加水分解で NRPS 上から切り離し LC-MS を用いて解析した。その結果、どちらの組み合わせでもジペプチドはほぼ生成していなかった。この原因はモジュール間相互作用の大幅な低下であると推察し、PgpA2 をリガンド、PgpA3 あるいは FmoA3 をアナライトとして SPR 解析を行った。その結果、PgpA2 と PgpA3 間および PgpA2 と FmoA3 間の解離定数は、それぞれ  $22.53 \pm 9.38 \mu\text{M}$ 、 $52.1 \pm 35.4 \mu\text{M}$

と両者に大きな差はなく、ジペプチドが生成しない原因はモジュール間相互作用の問題ではないことが強く示唆された。そこで、ドメイン間の局所的な相互作用がジペプチドの生成に重要であると考え、PgpA3のCPドメインをFmoA3のCPドメインと入れ替えたキメラ酵素 (PgpA3-CP<sub>FmoA2</sub>) を作製した。このキメラ酵素とFmoA2とを反応させ、先と同様にジペプチドの生成を観察した結果、FmoA2/PgpA3の組み合わせでは見られなかったジペプチド生産がFmoA2/PgpA3-CP<sub>FmoA2</sub>では3割程度まで回復した。一方、PgpA2/PgpA3-CP<sub>FmoA2</sub>の組み合わせではPgpA2/PgpA3の組み合わせに比べ、7割程度生産が減少した。これらの結果から、この系ではNRPS全体構造が相互作用に重要であり、CPが触媒機能に対して大きな影響を与えることがわかった。

#### 第四章 NRPSの構造変化が相互作用に及ぼす影響

上述したように、NRPSの結晶構造解析は進んでおり、反応の各段階でモジュール内の各ドメインの位置が変化することが明らかになっている。しかしながら、溶液中でのNRPSの挙動やそれがモジュール間相互作用にどのような影響を与えるかについてはあまり研究が進んでいない。そこで反応の各段階を模倣したNRPSを創製し、全体構造の変化がモジュール間の相互作用に影響するかどうかを調べることにした。

最もモジュール間の相互作用が大きくなるのは縮合が起きる段階であると考えられるため、この段階での相互作用と *holo* 体同士での相互作用を比べることとした。天然ではアミノ酸はチオエステル結合を介してNRPSと結合しており、この結合の適度な不安定性により縮合反応が進行する。そこで、縮合が起きる段階の相互作用を検出するためにはこの段階を安定に維持できるNRPSアナログが必要となる。これを解決するためにチオエステル結合より安定性の高いアミド結合を介してアミノ酸がNRPSと結合しているアナログを既知の方法を用いて化学-酵素合成的に構築することとした。現在までに必要な酵素 (CoaA, D, E, Sfp) の取得とパントテン酸アナログの有機合成を完了している。また、*one-pot* 反応が進行することを確認するため、クマリン骨格を有するパントテン酸アナログを用い反応を行った結果、NRPSが蛍光ラベルされ、問題なく反応が進行することを確認している。今後、各NRPSアナログの大量調製を行い、SPR解析に供する予定である。

#### 第五章 総括

本博士論文研究ではNRPの構造多様性創出を指向し、これまで生合成機構が未知であったPy-Glyの生合成機構の解明を試み、その一端を明らかにすることに成功した。また、NRPSの組み立てラインの正確性を発揮する分子機構の解明を目指して *in vitro* 実験を行い、モジュール間相互作用にはNRPSの全体構造が、触媒機構にはCPドメインと他のドメイン間の相互作用が重要であることが示唆された。これらの情報はNRPSのエンジニアリングにおいて重要であると考えられる。