

審査の結果の要旨

氏名 角田 毅

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り、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という特徴をもつ。JBIR-126 (tambromycin) は *Streptomyces* sp. NBRC111228 をはじめとした複数の *Streptomyces* 属放線菌から単離された NRP である。JBIR-126 の構造中には pyrrolidyl glycine (Py-Gly) 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。通常、NRPS は複数のモジュールが連結した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 も同様に取得可能であると考えられた。このような背景のもと、Py-Gly の生合成経路の解明と、NRPS 組立てラインが正確に駆動する分子機構の解明が試みられた。

研究背景を記した第一章に続く第二章では、まず、これまでに発見されていた JBIR-126 の生合成遺伝子クラスター (*pgp* クラスター) と JBIR-126 の化学構造を基に Py-Gly の生合成経路を予想し、生合成に関与する酵素をコードする遺伝子の探索が行われている。その結果、2 つの acyl-CoA 脱水素酵素 (*pgpL*, *N*) と NRPS の condensation (C) ドメイン様のタンパク質 (*pgpK*)、アセチル基転移酵素 (*pgpO*) が候補として絞り込まれた。次に、NRPS である PgpA2, A3, A4, A5 の *in vitro* 解析により、PgpA2, A3, A4, A5 はこの順にはたらくこと、環化は PgpA4 上の Lys に対して起こることが明らかにされている。最後に、PgpK, L, N, O と PgpA4 を用いた *in vitro* 解析から PgpL/N のいずれかもしくは両方が NAD(P)H と FAD, FMN を用いて環化に関与することが示唆されている。

第三章では、PgpAs/FmoAs を用いたモジュール間相互作用に関する研究が行われている。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、まず、同じドメイン構成を持ち、同じ反応を触媒する PgpA2, A3 と FmoA2, A3 が機能的に相補できるかどうかを、*in vitro* 酵素反応系により検証した。その結果、由来が異なる酵素同士ではジペプチドの生成反応が進行しないことが示された。一方、PgpA2 をリガンド、PgpA3 あるいは FmoA3 をアナライトとして用いた表面プラズモン共鳴 (SPR) 解析により、

FmoA3 は PgpA3 と同様に、PgpA2 と相互作用できることが示された。さらに、PgpA3 の carrier protein (CP) ドメインを FmoA3 の CP ドメインと入れ替えたキメラ酵素を作製し、これを用いた *in vitro* 試験により、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ことが示された。続いて、PgpA3 の CP ドメインを欠失したトランケート体と PgpA2 との SPR 解析が行われ、その解離定数が PgpA2 と PgpA3 間の相互作用と大きく変わらないことが示された。この結果は、PgpA3 のうち、cyclization ドメインと adenylation ドメインからなる部分が PgpA2 との相互作用に重要であることを示唆している。

第四章では NRPS への基質の結合がモジュール間相互作用に与える影響について調べている。具体的には、化学酵素的に NRPS へアミド結合を介して基質を結合させることで反応の各段階を安定的に模倣した NRPS を創製し、これらを用いてモジュール間相互作用を SPR により調べた。インドール-3-カルボン酸が結合した PgpA2 と L-Ser が結合した PgpA3 を用いた SPR 解析では、PgpA2 と PgpA3 を用いた際と解離定数に差は見られなかったが、センサーグラムの形状は大きく異なっていた。観察されたセンサーグラムの形状変化は PgpA2 と PgpA3 間の結合と解離が速くなるような変化が起きたことを示しており、基質アナログが結合したことで NRPS の構造が変化し、モジュール間相互作用が促進されたことが示唆された。

以上、本研究によって、JBIR-126 の生合成における Py-Gly の生合成経路がほぼ明らかになるとともに、NRPS 組立てラインが正確に駆動する分子機構の一端が解明された。したがって、本研究は学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。