

博士論文 (要約)

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

---

角田 毅

## 目次

第1章	研究の背景	4
1.1	生合成研究について	4
1.2	非リボソームペプチド (NRP) の生合成	5
1.2.1	NRPS の組み立てライン	6
1.2.2	非タンパク質性のアミノ酸の生合成	14
1.2.3	NRPS のダイナミクス	17
1.2.4	NRPS のモジュール間相互作用	19
1.3	NRPS の生合成改変	23
1.4	本研究の目的	29
第2章	Py-Gly の生合成に関する研究	30
2.1	序論	30
2.2	Py-Gly 生合成の推定	33
2.2.1	JBIR-126 の生合成経路の推定	33
2.3	<i>In vitro</i> 反応系を用いた検証	40
2.3.1	PgpA2, PgpA3, PgpA4, PgpA5 の取得と基質特異性の検証	40
2.3.2	PgpK, PgpL, PgpN, PgpO の調製と <i>in vitro</i> での環化の再構築	44
2.4	総括と考察、展望	50
2.5	実験項	52
2.5.1	使用菌株、ベクター培地及び装置	52
2.5.2	個別の操作	52
第3章	NRPS のモジュール間での相互作用に関する研究	57
3.1	背景	57
3.2	モジュール間での SPR 解析	60
3.2.1	FmoA2 と PgpA3、PgpA2 と FmoA3 を用いた <i>in vitro</i> 反応	60
3.2.2	SPR の原理	63
3.2.3	モジュール間での SPR 解析	64
3.3	CP ドメインを入れ替えたキメラ酵素の作製とそれを用いた <i>in vitro</i> 解析	66
3.3.1	キメラ酵素の設計と取得	66
3.3.2	キメラ酵素を用いた反応	68
3.4	CP ドメインはモジュール全体の相互作用に寄与するか	70
3.4.1	トランケート体の作製と活性保持の確認	70
3.4.2	SPR 解析	71
3.5	総括、討論、今後の展望	72
3.6	実験項	74

第4章	NRPSの構造変化が相互作用に及ぼす影響.....	77
4.1	序論.....	77
4.2	Indol-3-carboxylic acid-amino (dethia)-PgpA2, Ser-amino (dethia)-PgpA3の調製.....	78
4.3	総括、今後の展望.....	84
4.4	実験項.....	85
4.4.1	NMRチャート.....	89
第5章	総括.....	99
5.1	総合討論.....	99
5.2	引用文献.....	102

## 略語表

略称	正式名称	略称	正式名称
NRP	非リボソームペプチド	LC	液体クロマトグラフィー
NRPS	NRP 合成酵素	MS	質量分析計
ORF	Open reading frame	BPC	Base peak chromatography
A ドメイン	Adenylation ドメイン	IPTG	イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド
CP ドメイン	Carrier protein ドメイン	FAD	フラビンアデニンジヌクレオチド
PPant	4-ホスホパンテテイン	FDLA	<i>N</i> $\alpha$ -(5-Fluoro-2,4-dinitrophenyl)-leucinamide
C ドメイン	Condensation ドメイン	IMAC	金属アフィニティクロマトグラフィー
TE ドメイン	Thioesterase ドメイン	PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
ATP	アデノシン-3 リン酸	HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
AMP	アデノシン-1 リン酸	BAC	Bacterial artificial chromosome
MLP	Mbt-like prorein	SPR	表面プラズモン共鳴
MT ドメイン	Methyltransferase ドメイン	SDS	ドデシル硫酸ナトリウム
SAM	S-アデノシルメチオニン	PAGE	ポリアクリルアミド電気泳動
FMN	フラビンモノヌクレオチド	PMB	<i>p</i> -メトキシベンジル
NADPH	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリニン酸	Bn	ベンジル
$\alpha$ -KG	$\alpha$ -ケトグルタル酸	Boc	<i>tert</i> -ブトキシカルボニル
PKS	ポリケタイド合成酵素	Fmoc	9-フルオレニルメチルオキシカルボニル
DD	Docking domain		
EM	電子顕微鏡		
COM	Communication-mediating		
CDA	Calcium - dependent antibiotics		
mTHF	5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸		
Py-Gly	Pyrrolidyl glycine		
CoA	補酵素 A		

## 第1章 研究の背景

### 1.1 生合成研究について

生物はその体内において様々な物質を生産、分解しながら生きている。外部よりある化学物質を得て、その生物自身の持つ力で新たな物質へ変換していく。この物質の生産は生合成と呼ばれ、古くからその原理を解明しようと多くの科学者により研究されてきている。

これまでの先人達による同位体を用いた研究を通して、様々な天然物のそれぞれの部分は何に由来するのかということはかなり部分において解明されてきた。現在ではそれらに加え、ゲノム解読の技術や遺伝子工学の発展と相まって、その化学変換を担う酵素や遺伝子までが明らかになりつつある。このように生合成を酵素や遺伝子の視点から解明し分子レベルで理解することは天然物化学においても重要であり興味を持たれる。

生合成により生産される物質は非常に多種多様であり、その生物自身を形作り、生命の維持や増殖に必要な一次代謝産物だけでなく、必ずしもその生物の生命維持にとって必要でない、微生物の生産する抗生物質のような二次代謝産物もあげられる。抗生物質は「微生物由来の、他の微生物の発育や代謝を阻害する化学物質」と Waksman により定義・位置づけられていたが、現代では合成技術の発展により半合成や人工合成の抗菌剤、更には抗ウイルス剤や抗真菌剤、抗ガン剤までもがその範囲に含まれる。

また近年、生合成に関する知見の蓄積や遺伝子工学技術の発展を背景に、抗生物質の生産性向上や新規抗生物質の創製、有用な物質を生物に効率的に作らせることを目指した研究が盛んに行われている。これらの分野は合成生物学や生合成工学とよばれ、その有用性を工業ベースで示した例もある。このような微生物生産や酵素を利用した、あるいはこれらと有機合成を組み合わせた新たな物質生産法は既に可能なものとなりつつあり、これらの可能性を更に広げるため新たな機能を持つ酵素やその遺伝子の特定は非常に有用であると考えられる。

## 1.2 非リボソームペプチド (NRP) の生合成

NRP はその名の通りリボソームを介さずに生合成されるペプチドの一群であり、リボソームを介さないため様々なタンパク質性/非タンパク質性アミノ酸やカルボン酸をその構成単位に用いることができる (Walsh et al. 2013)。そのため広い構造多様性を持ち、抗菌、抗真菌、抗ガン、免疫抑制等様々な生物活性を有し医薬品として用いられているものも多い (Süssmuth & Mainz 2017, 図 1-1)。

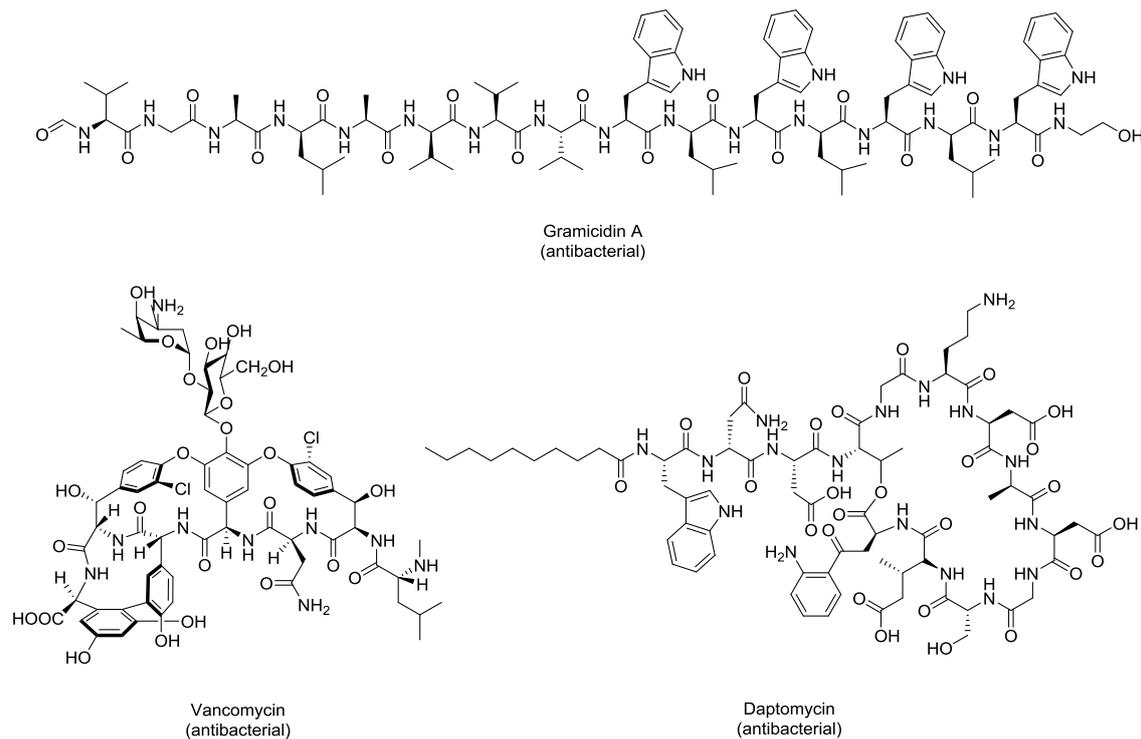


図 1-1 代表的な NRP の化学構造

NRP の生合成は非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) が担っており NRPS は大腸菌などのグラム陰性細菌や放線菌などのグラム陽性菌、カビなどの真核生物にも存在する。以下、NRPS について概説する。

### 1.2.1 NRPS の組み立てライン

NRPS は複数のドメインから成るモジュール型の酵素であり、各ドメインはその役割に応じた機能を有する。多くの NRPS は複数のモジュールが一つのポリペプチド上に連なって機能するが、今回の博士論文で扱う NRPS は1つのモジュールが1つの ORF に対応するような NRPS (本博士論文では"単モジュール型 NRPS"と呼称する) である。そこで、まず、単モジュール型の NRPS を例にとり、NRPS のペプチド鎖伸長の戦略を簡単に述べる (図 1-2)。まず基質 (基本的にはアミノ酸) は adenylation ドメイン (A ドメイン) によりそのカルボン酸部位が AMP 化され活性化される。次に、(peptidyl) carrier protein ドメイン ((P)CP ドメイン) または、thiolation ドメイン (T ドメイン) と呼ばれる基質運搬専用のドメインに活性化されたアミノ酸が結合する(図 1-2 (i))。なお、CP ドメイン中に保存されている Ser 残基は CoA 由来の 4-ホスホパンテテイン (PPant) により翻訳後修飾を受けており、この先端にチオエステル結合を介してアミノ酸が結合する。通常開始モジュールは A ドメインと CP ドメインのみを持つ。伸長モジュールでは更に condensation ドメイン (C ドメイン) を有する。各モジュールで CP ドメインに基質が結合し、その後、C ドメインにより、下流のモジュールに結合したアミノ酸のアミノ基から上流のモジュールに結合したアミノ酸のチオエステル結合に対する求核攻撃が起こることでペプチド結合が形成される (図 1-2 (ii))。従って、生成したペプチドは下流のモジュールに結合することになる。このような一連の反応を繰り返すことで NRPS はペプチド鎖を生成する (図 1-2 (iii))。最終モジュールには thioesterase ドメイン (TE ドメイン) が一般的に存在し、このドメインによりチオエステルの加水分解が起きることによりペプチドが NRPS から切り離される (図 1-2 (iv))。また、TE ドメインによる酵素からの生成物切り離しの際に大環状化することもある。

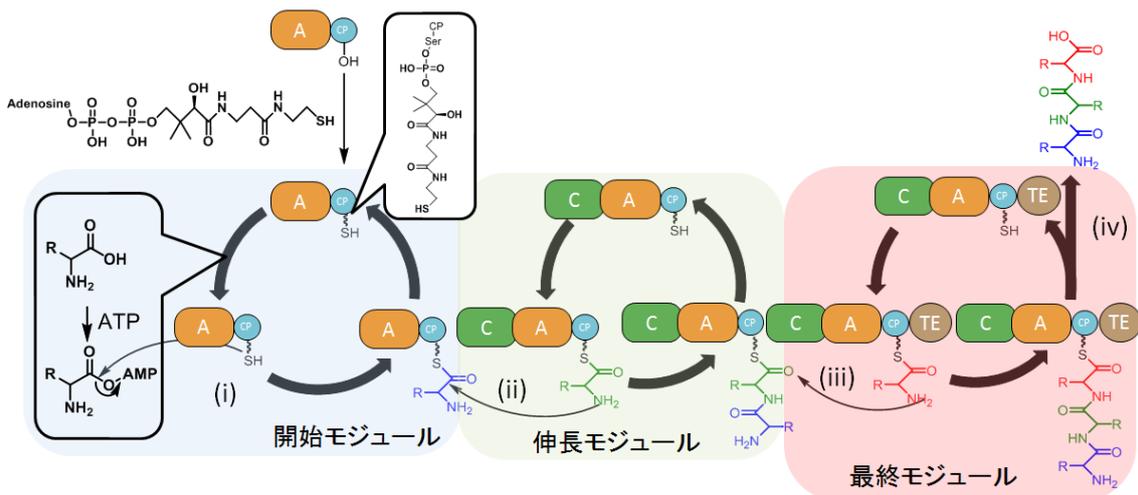


図 1-2 NRPS の組み立てラインの概要。一般には伸長モジュールは複数存在する。

このように A ドメイン、CP ドメイン、C ドメイン、TE ドメインが NRP 生成のための最少単位であるが、他にも epimerization (E)、formylation (F)、methyl transferase (MT)、cyclization (Cy)、Reduction (R)、Oxidation (Ox) ドメイン等が存在する。以下、各ドメインについて詳細を述べる。

## A ドメイン

A ドメインは 50 kDa 程の N 末端側の A<sub>core</sub> ドメインと 10 kDa 程度の C 末端側の A<sub>sub</sub> ドメインの 2 つのサブドメインから成る。A ドメインは基質であるアミノ酸やカルボン酸を厳密に認識し NRPS のゲートキーパーの役割を担っている。また、認識された基質は ATP を用いた AMP 化を受け、カルボン酸部が活性化され次の反応に利用される。副産物であるピロリン酸は NRPS 外に放出される。A<sub>core</sub> ドメインは実際の触媒機能を有しているドメインであり、A<sub>core</sub> ドメイン中の A<sub>sub</sub> ドメインとの界面に近い領域に Mg<sup>2+</sup> と ATP が結合する領域が存在する。A<sub>sub</sub> ドメインはヒンジのような役割を担っており、NRPS 全体の立体配置に重要である (Drake et al. 2016)。また、様々な A ドメインの結晶構造解析がなされており、その基質認識にいくつかのアミノ酸が重要であることがわかっている (Conti et al. 1997; Kudo et al. 2018)。例えば、A ドメイン中のある Lys 残基はかなり高度に保存されており、この残基はアミノ基とカルボン酸部位の安定化に寄与している。また、Asp 残基もよく保存されているがこの Asp 残基は基質にあわせて別の残基に置き換わっていたり、位置を変えていたりする (図 1-3)。これを応用することで A ドメインのアミノ酸配列からどのアミノ酸が認識されるかを予測する web ツール (NRPSpredictor2) も開発されている (Röttig et al. 2011)。

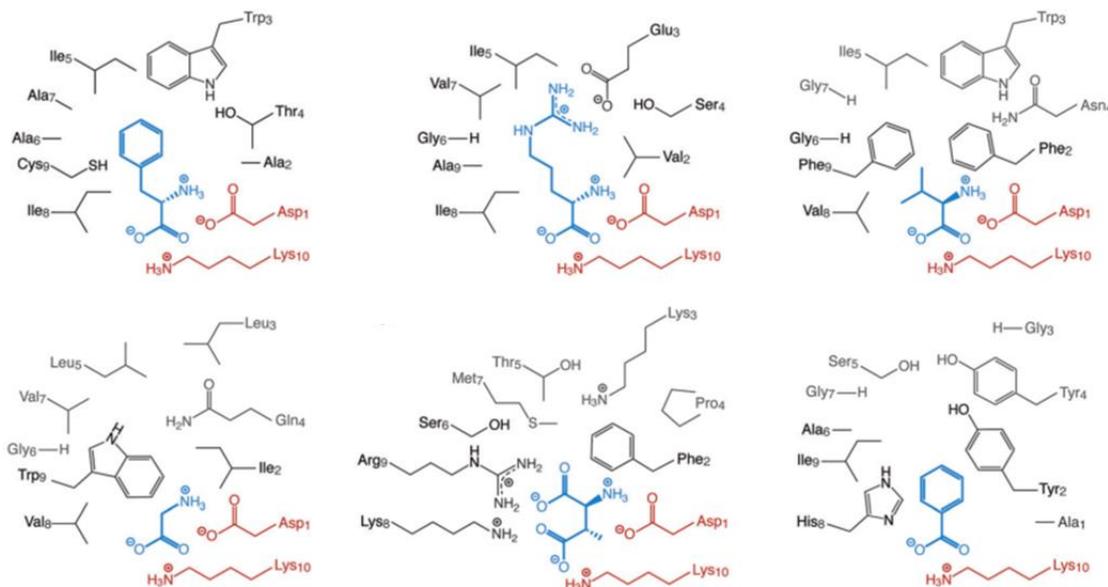


図 1-3 結晶構造が解かれた A ドメインの基質認識機構のまとめ (図は Süssmuth & Mainz 2017 より引用)

いくつかのAドメインは単体では機能しない、もしくは機能が弱いことが知られており、MbtH-like protein (MLP) という8 kDa程度の小さいタンパク質とAドメインが複合体を形成することが活性に重要であることが知られている (Baltz 2011)。また、MLPは単独のタンパク質として存在することもあれば、NRPSとのfusionタンパク質として存在することもある (Baltz 2011)。MLPの遺伝子破壊実験によりいくつかの例ではNRPSの生産そのものにMLPが必要なことも報告されている (Wolpert et al. 2007)。これまでにMLP単独の構造だけでなく、MLPとAドメインのダイドメインタンパク質の結晶構造解析がなされている (Herbst et al. 2013)。さらに、最近の研究では単独のMLPとAドメインとの複合体の結晶構造解析がなされている (Miller et al. 2016)。

### Cドメイン

50 kDa程度であるCドメインはアミノアシル基同士またはアミノアシル基とペプチド中間体を縮合する。Cドメインは擬二量体構造を有し、N末端側のドメインとC末端側のドメインに分けることができる (Keating et al. 2002)。N末端ドメインとC末端ドメインの界面はV字型を形成しており、そこが自身のCPドメインや上流のモジュールのCPドメインの接触面となる (図1-4)。また、この部分にはCドメインに高度に保存されているモチーフであるHHxxxDGが存在する (Rausch et al. 2007)。このモチーフの2番目のHisはペプチド結合形成時の求核攻撃を促進する、もしくは、四面体遷移状態の安定化に重要であると考えられている。His残基の触媒能に与える影響はCドメインにより異なるためCドメインの触媒メカニズムは未だに議論がある (Bergendahl et al. 2002; Roche & Walsh 2003; Marshall et al. 2002)。また、Cドメインは縮合するアミノ酸の立体配置から<sup>L</sup>C<sub>L</sub>と<sup>D</sup>C<sub>L</sub>に分けられる。前者はL体のアミノ酸同士を縮合し、後者はD体のアミノ酸のカルボキシ基とL体のアミノ酸を縮合する。どちらのCドメインもHHxxxDGを有する。Cドメインのような擬二量体構造は他のNRPSのドメイン (e.g. E, Cy, etc) にもみられ、これらはCドメインから派生して誕生したと考えられている (Rausch et al. 2007)。Cドメインから派生したドメインの機能に関しては別に述べる。

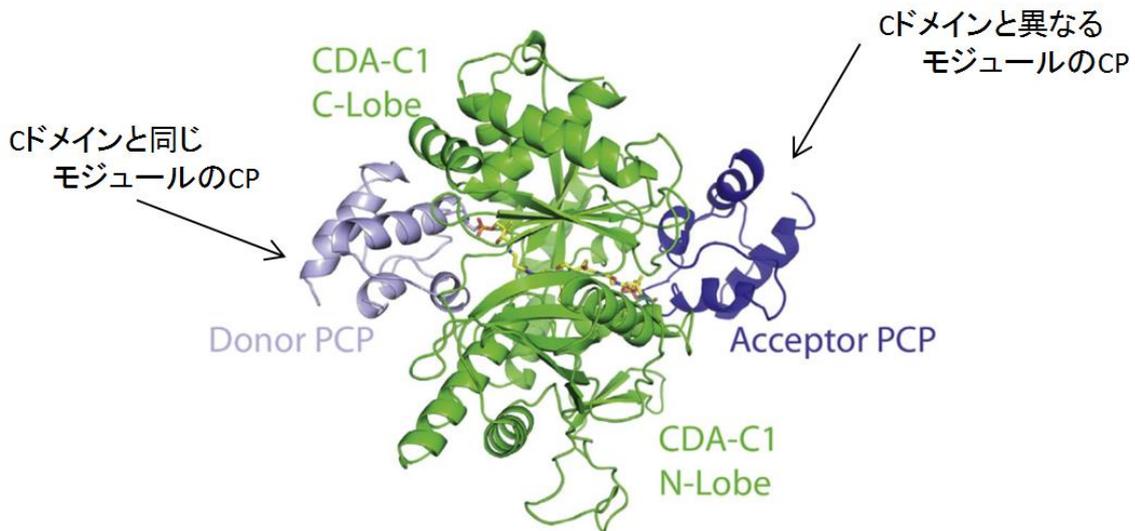


図 1-4 N 末端のアシル化を触媒する CDA-C1 ドメインの構造。CP ドメインの位置はモデリングにより推定している (図は Bloudoff & Schmeing 2017 より引用)

#### CP ドメイン

CP ドメインは約 10 kDa 程度の小さなタンパク質であり、自身に基質や中間体を結合させ、その運搬を担うドメインである。これまでの結晶構造解析により  $A_{\text{sub}}$  ドメインと協調して、NRPS の基質運搬システムを担う重要なドメインであることが分かっている。高度に保存された Ser 残基を有しており、この Ser が翻訳後修飾により PPant 化を受ける (Lambalot et al. 1996)。CP ドメインは 4 つのヘリックス構造を有しており、2 つ目のヘリックス (ヘリックス II) 内に上述した Ser 残基が存在する (図 1-5A, Scha et al. 2006)。構造生物学的研究から *apo* 体の CP ドメインと *holo* 体の CP ドメインは外郭の構造が大きく変わらないことが示されている (Scha et al. 2006)。さらに、基質と結合した状態の CP ドメインの構造も決定されており (図 1-5B, Jaremko et al. 2015)、ヘリックス II と III の間の溝が *holo* 体に比べ広がり、基質が格納しやすくなっていることが示されている (図 1-5C)。2 番目のヘリックスに PPant が存在することからも推定できるように、ヘリックス II と III が様々なドメインと相互作用していることが報告されている。

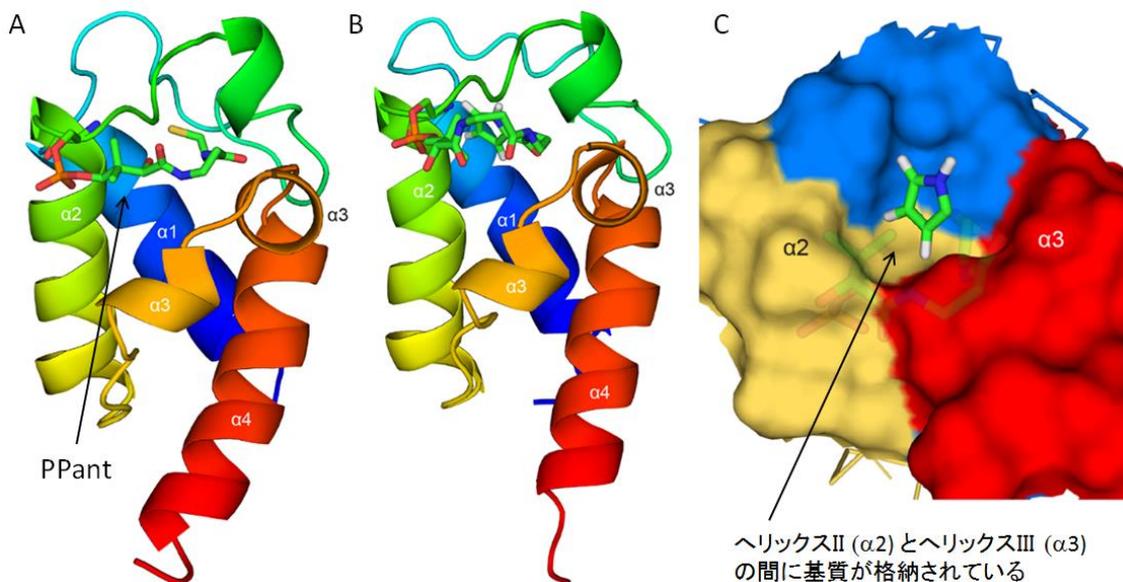


図 1-5 GP (PltL) の溶液中の構造。PltL は prodigiosin の生合成に関わる stand-alone な GP である (A) *holo* 体の溶液中での構造 (PDB ID: 2N5H)。ヘリックス II が持つ Ser に PPant が結合している (B) 生成物である pyrrol が結合した PltL の溶液中での構造 (PDB ID: 2N5I)。(C) ヘリックス II とヘリックス III の間の溝に基質が格納されている様子。(A) と (B) でヘリックス II とヘリックス III 環のループがわずかに位置を変えている。図は Jaremko et al. 2015 を一部改変。

### TE ドメイン

TE ドメイン 30 kDa 程度のタンパク質であり、一般に最終モジュールに存在する。構造的な分類では $\alpha/\beta$ ハイドラーゼであり、その他の $\alpha/\beta$ ハイドラーゼと同様に、保存された Ser 残基 (一部 Cys の場合もある) が、伸長が完了したペプチド中間体に求核攻撃し、TE ドメインにペプチド鎖が移った後に、加水分解を受けて NRPS からリリースされる。また、この時 N 末端側のアミノ基やペプチド中の側鎖が求核攻撃を起こすことで大環状化することもある。

ここまでの NRPS のペプチド結合形成と NRPS からの切り離しに必須なドメインであるが、NRPS にはこれら以外にも追加のドメイン (アクセサリドメイン) を有することが多い。先に述べたようなコアドメインがペプチド鎖を構築し、これから述べるアクセサリドメインがペプチド鎖を様々に修飾することで、生物活性を付与したり、代謝されにくくすることで薬物動態を良くしたりする。特に C ドメインと進化的、構造的に近いアクセサリドメインが複数存在し、まず、これらについて概説する。

## C ドメインの派生ドメイン

C ドメインの派生ドメインは系統樹解析をすることでどのような役割を持つか推定できる (Rausch et al. 2007)。また、コアモチーフが存在しこのモチーフも役割によって異なることが多い。これまでに活性が報告されているものは E ドメイン (Linne et al. 2001)、C/E ドメイン (Balibar et al. 2005)、Cy ドメイン (Keating et al. 2002)、C<sub>T</sub> ドメイン (Zhang et al. 2016)、PS ドメイン (Koketsu et al. 2012)、bL ドメイン (Gaudelli et al. 2015)、X ドメイン (Haslinger et al. 2015) などである。それぞれ、アミノ酸のアミノ基のエピメリ化 (図 1-6 A)、エピメリ化とペプチド結合形成 (図 1-6 B)、側鎖を用いた脱水環化 (図 1-6 C)、TE ドメインの代わりにラクトン化による NRPS からの切り出し (図 1-6 D, 主に糸状菌の NRPS に多い)、Pictet-Spengler 反応を担うもの (図 1-6 E)、ベータラクタム生合成におけるラクタム化 (図 1-5 F)、P450 のリクルート (図 1-6G) といった役割を持っている。

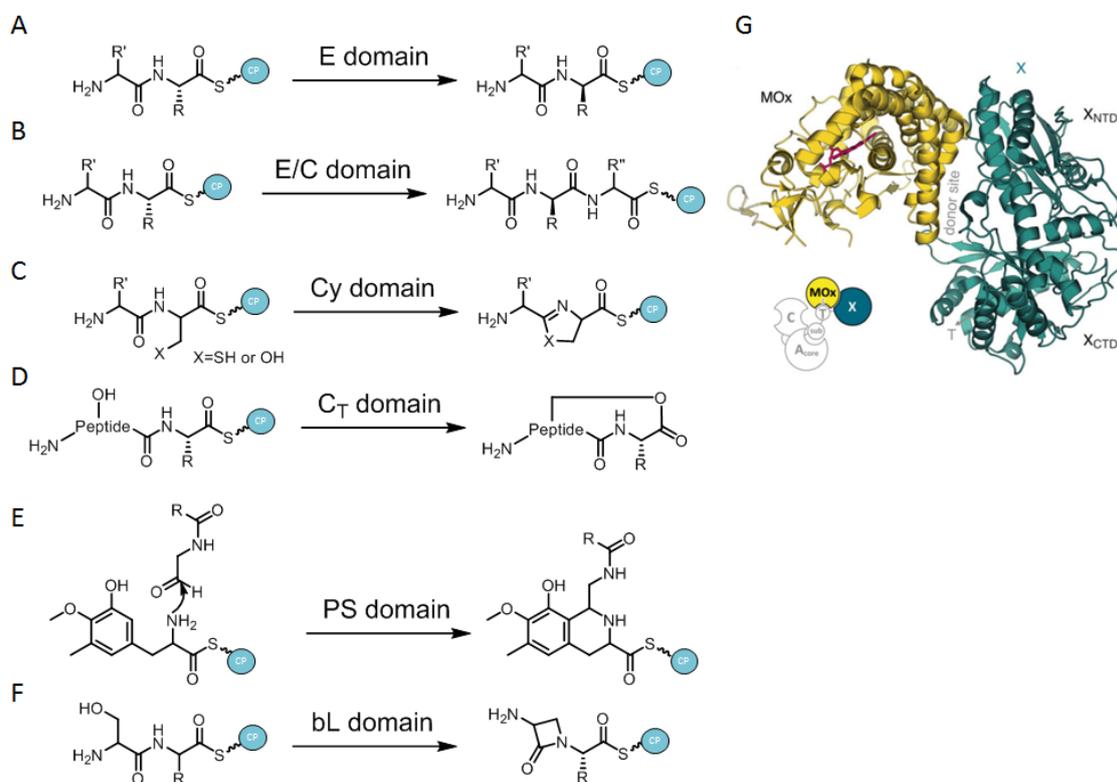


図 1-6 (A)-(F) C ドメインの派生ドメインの触媒機能 (G) X ドメインが P450 と相互作用している結晶構造 (結晶構造の図は Süssmuth & Mainz 2017 より引用)

このように、C ドメインから派生したドメインが多数ある。また、天然にはモジュール内に存在せず、独立のタンパク質として存在する Stand-alone C ドメインが存在する。以下に概説する。

### Stand-alone C ドメイン

NRPS はモジュール型として存在する NRPS の他にそれぞれのドメインが独立したタンパク質として存在するものもある。そのような NRPS システムには stand-alone C ドメインが存在する (Cheng et al. 2013)。例えば vibriobactin 生合成における VibH は CP ドメインに結合した 2,3-ジヒドロキシ安息香酸と norspermidine 間で縮合反応を触媒し、アミド結合を形成する(図 1-7A, Keating et al. 2000)。他にも、C-1027 の生合成において SgcC5 が CP ドメインに結合した 3-Cl-5-OH- $\beta$ -チロシンと本来の基質であると考えられるエンジン骨格を模倣した(*R*)-1-Ph-1,2-ethanediol 間でのエステルもしくはアミド結合形成を形成することが知られている (図 1-7B)。なお、VibH の保存モチーフは HHxxxDG であり SgcC5 の保存モチーフは HHxxxDA である。どちらも触媒に重要な 2 番目の His を有している。

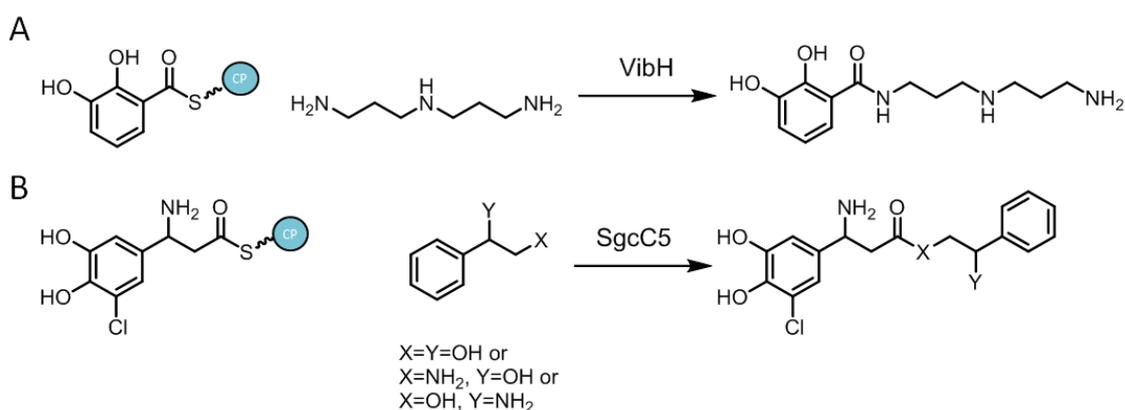


図 1-7 (A) Vibriobactin 生合成における VibH が触媒する反応 (B) エンジン化合物 C-1027 生合成における SgcC5 が触媒する反応。

それ以外にも構造多様性を生み出すために必要なドメインがいくつかある。それらのドメインについて概説する。

### Methyltransferase (MT) ドメイン

MT ドメインは生体内の一般的なメチル供与体である *S*-アデノシルメチオニン (SAM) を用いてメチル化を行うドメインである。NRPS においてメチル化される部位は広範にわたり、主鎖のアミド結合の N 原子や (Chatterjee et al. 2013)、側鎖の N 原子や O 原子、C 原子など多岐にわたる。また、一般には MT ドメインはモジュール内に組み込まれているが、モジュール外に stand-alone に存在する MT ドメインも存在する (Shi et al. 2009)。モジュール内に組み込まれている MT ドメインは A ドメインを分断するように存在していることが多く、A<sub>sub</sub> ドメインの C 末端側に挿入されていることが多い。

### Oxidase (Ox) ドメイン

Ox ドメインは約 30 kDa のタンパク質でありフラビンモノヌクレオチド (FMN) 依存の酵素である。MT ドメインと同様に、A<sub>sub</sub> ドメインの C 末端側に挿入されている。Epothilone 中の EpoB が知られ、メチルチアゾリンをメチルチアゾールへと酸化する (Schneider et al. 2003)。

### Reductase (R) ドメイン

R ドメインは伸長後のペプチド中間体のチオエステル結合を NAD(P)H 依存的に還元しアルデヒドやアルコールを生成するドメインであり、最終モジュールに TE ドメインの代わりに存在する (Chhabra et al. 2012)。

### Formylation (F) ドメイン

F ドメインは開始モジュールの N 末端に追加で存在するドメインであり、NRP の N 末端をホルミル化するドメインである。珍しいドメインであるものの、Gramicidin の NRPS である LgrA において機能解析されている (Schoenafinger et al. 2006)。その触媒機構は N<sup>10</sup>-fH<sub>4</sub>F (N<sup>10</sup>-ホルミルテトラヒドロ葉酸) というホルミル基供与体を用いて N 末端のアミンをホルミル化するものである。

### Ketoacyl reductase (KR) ドメイン

KR ドメインは F ドメイン同様珍しいドメインであり、Valinomycin のようなα-ヒドロキシα-アミノ酸をもつ天然物の NRPS 中に存在する (Matter et al. 2009)

### 1.2.2 非タンパク質性のアミノ酸の生合成

NRP の最もユニークな点の 1 つは非タンパク質性のアミノ酸を構造単位として用いることができる点である (図 1-8, Walsh et al. 2013)。これは、NRP の構造多様性を大きく向上させ、さらに、その構造多様性が広範な生物活性につながっている。この節ではそのような非タンパク質性のアミノ酸がどのように生合成されるか、いくつかの例を用いて紹介する。

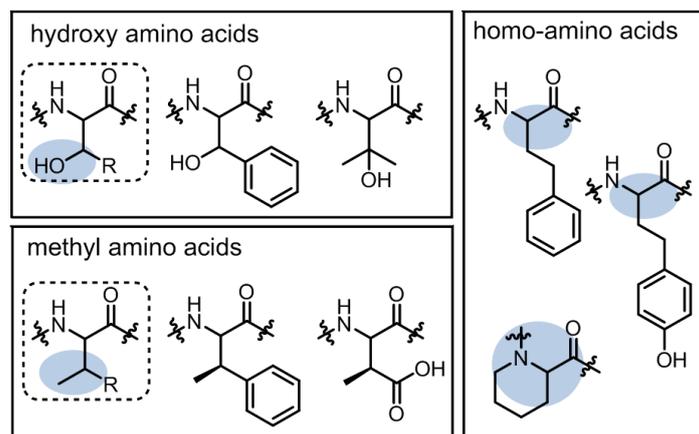


図 1-8 非タンパク質性アミノ酸の例

図 1-8 からわかるように、タンパク質性のアミノ酸が水酸化されたものや、メチル化されたような一段階の変換を受けて生合成されるものから、一次代謝産物が複数ステップの反応を介して生合成されているものもある。また、その変換を受けるタイミングであるが、遊離のアミノ酸の状態では反応を受けるものや、NRPS に結合した状態で反応を受けるもの、NRPS から脱離後のペプチド鎖の状態では反応を受ける等、様々なタイミングがある。以下いくつかの例を挙げてその生合成について述べる。

まず、遊離の一次代謝産物が複数段階の反応を経て変換される例である。例えば、4-hydroxyphenylglycine は 4-hydroxyphenylpyruvate から複数の酵素反応により生合成される (図 1-9A)。また、Viomycin の構成要素である capreomycinidine は遊離の Arg が  $\alpha$ -KG 依存のオキシゲナーゼである VioC により水酸化を受け、VioD による脱水環化を経ることで生合成される (Ju et al. 2004, 図 1-9B)。

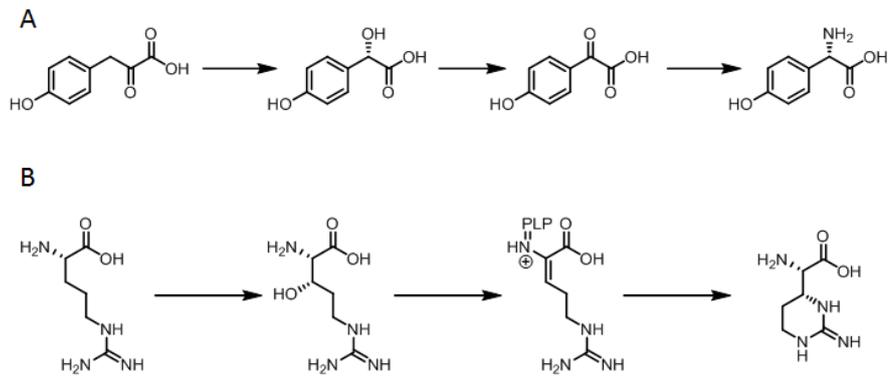


図 1-9 遊離の一次代謝産物が複数の酵素変換反応により非タンパク質性のアミノ酸に変換される例

一方、methoxyvinylglycine の生合成では CP ドメイン上で反応が進行することが報告されている (Patteson et al. 2018)。まず、Glu が NRPS である AmbE の CP ドメインに結合し、続いて、AmbC による  $\alpha$ -KG 依存の  $\beta$  位への水酸化が起こる。さらに、AmbD による  $\gamma$  位の水酸化、モジュール内に存在する MT ドメインによる導入された  $\gamma$  位の水酸基の *O*-メチル化が起こる。さらにもう 1 つの NRPS である AmbB により Ala が導入される。この後の生合成は明らかにされていないが、脱水反応をへて二重結合が形成され、続いて、脱炭酸が起こることで Ala-methoxyvinylglycine が生合成されると考えられている (図 1-10)。

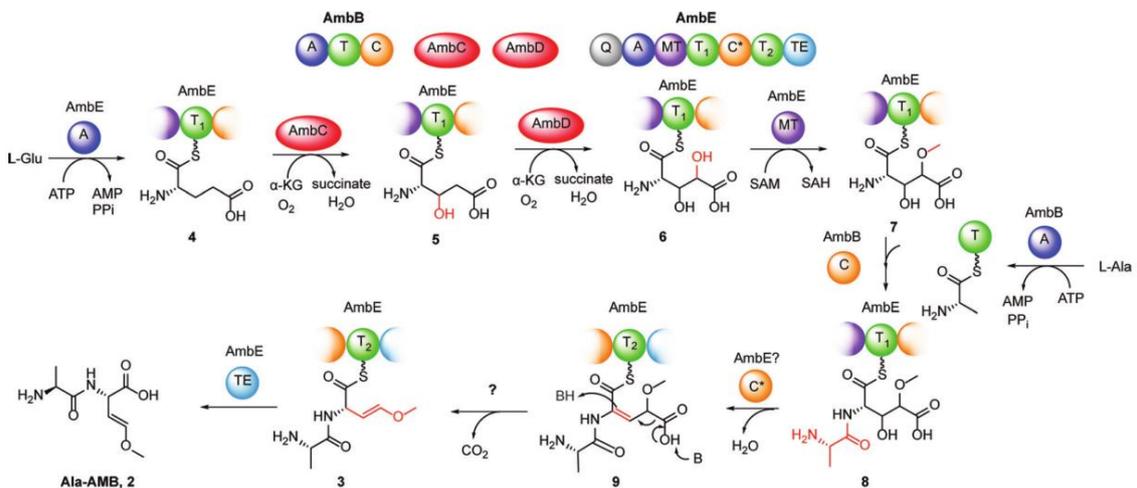


図 1-10 Ala-methoxyvinylglycine の推定生合成経路。2 つの NRPS と 2 つの  $\alpha$ -KG 依存のモノオキシゲナーゼから生合成される。AmbE 中の Q ドメインは機能未知であり、C\* ドメインは C ドメインと相同性を有するものの系統樹解析で既存のクレードに属さないものである (図は Patteson et al. 2018 より引用)。

NRPS から脱離後の反応にはいくつか種類があるが、多いものは糖転移酵素による配糖化や、アシル化である。配糖体化は親水性を付与し、アシル化は、逆に疎水性を付与することで、薬物動態や生物活性に影響を与える。

### 1.2.3 NRPS のダイナミクス

これまでにいくつかの NRPS で 1 つのモジュール全体の結晶構造が解かれている (表 1-1)。

表 1-1 これまでに 1 つのモジュール全体の結晶構造が解かれた NRPS の一覧 (FmoA3 はまだ PDB に登録されていない)

タンパク名	ドメイン構成	NRPS の状態	生合成する NRP	PDB ID
SrfA-C	C-A-CP-TE	<i>apo</i> 型	surfactin	2VSQ
AB3403	C-A-CP-TE	<i>holo</i> 型	不明	4ZXI
LgrA	F-A-CP	<i>apo</i> 型	gramicidin	5ES7
LgrA	F-A-CP	チオール化状態	gramicidin	5ES8
LgrA	F-A-CP	ホルミル化状態	gramicidin	5ES9
EntF	C-A-CP-TE	MLP との複合体	enterobactin	5JA1
EntF	C-A-CP-TE	チオール化状態	enterobactin	5T3D
FmoA3	Cy-A-CP	<i>apo</i> 型	JBIR-34, -35	-
FmoA3	Cy-A-CP	アデニル化状態	JBIR-34, -35	-

最初に構造が決定された NRPS の全体結晶構造は Sufactin の生合成を担う NRPS である SrfA-C であり (図 1-11A, Tanovic et al. 2008)、これは PPant 化される Ser を Ala に置換した *apo* 型での結晶構造である。CP の PPant 化される Ser の位置から、PPant の長さである 20 Å 以内にある各ドメインの活性残基は C ドメインの His147 のみであり、A ドメインや TE ドメインの活性残基とは 40 Å 以上離れている。これより、NRPS の特に CP ドメインは大きく位置を変える必要があることが示された。

更に近年になると他の NRPS の全体構造の結晶構造も解かれた。どのような NRP を生合成するかは不明である NRPS である AB3403 や Enterobactin の生合成に関与する EntF の結晶構造が解かれた (Drake et al. 2016)。SrfA-C (*apo* 体) の結晶構造と、AB3403 (*holo* 型) の結晶構造を比べると CP ドメインや TE ドメインの位置が異なることが見てとれる (図 1-11B)。更に、C ドメインと A ドメインの界面を見てみると、C ドメインと A ドメインの相互作用している残基が異なっていることがわかる (図 1-11C)。これらの結晶構造から NRPS はその触媒段階により構造変化をすることが明らかになった。

また、当研究室において JBIR-34, -35 の生合成に関わる NRPS である FmoA3 の全長での結晶構造解析が行われた (Sone 2018)。1 つは PPant 化される Ser を Ala に置換した *apo* 型での結晶構造であり、もう 1 つは ATP と基質もしくは ATP アナログ 5'-adenylylimidodiphosphate (AMP-PNP) との共結晶である。

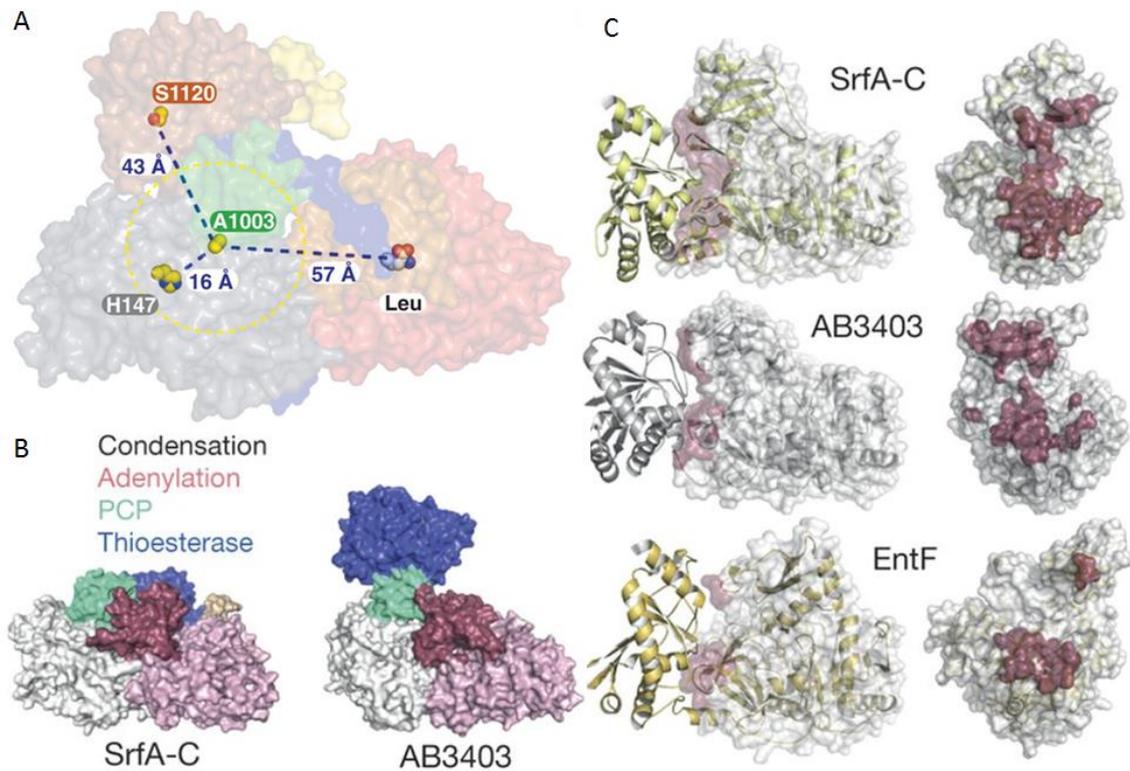


図 1-11 これまでに解かれた1つのモジュール全体のNRPSの結晶構造 (A) SrfA-Cの構造 (PDB ID: 2VSQ) Ser1003 (実際の結晶構造解析に用いられたタンパク質ではAlaに置換されている) から PPant の長さである 20 Å の距離が黄色の点線で示されている (B) SrfA-C と AB3403 の結晶構造の比較 (C) SrfA-C と AB3403、EntF の A ドメインと C ドメインの界面の比較 赤で示されている残基が相互作用に関与している残基 (A は Tanovic et al. 2008 より、B, C は Drake et al. 2016 より引用)



NRPS と同様にモジュール型の構造を持つ I 型ポリケタイド合成酵素 (PKS) に関してはモジュール間相互作用に関する研究が進んでいる。一般に I 型 PKS は Docking Domain (DD) と呼ばれる coiled-coil 構造を有するドメインを有しており、このドメインがモジュール間の相互作用に重要であることが Cryo-EM や溶液中の構造解析を通して明らかになっている (図 1-13)。

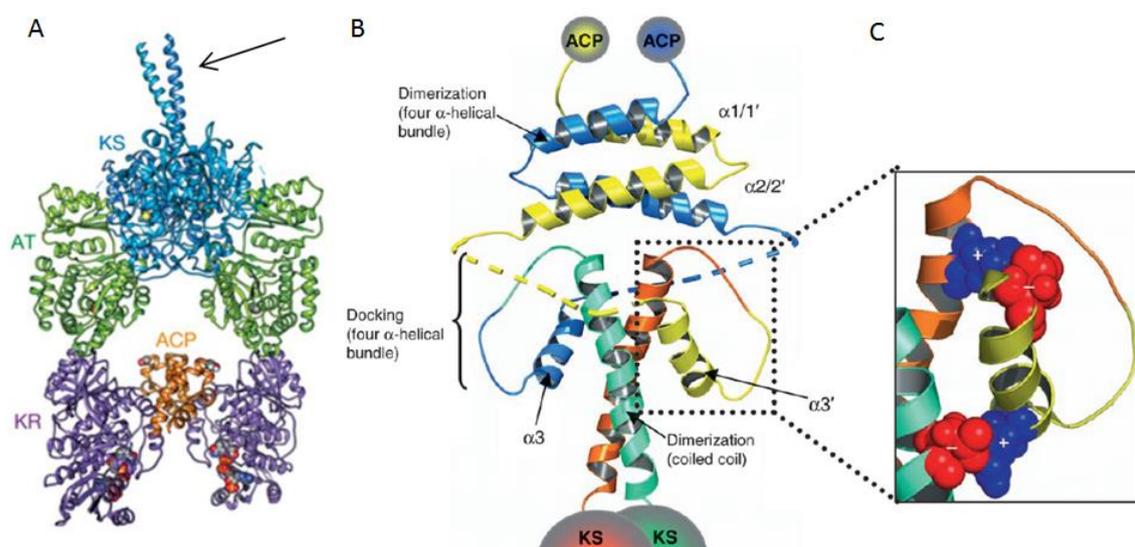


図 1-13 (A) Cryo-EM により構造が決められた I 型 PKS である PicAIII のモジュール全体の構造 (Whicher et al. 2014 より引用し一部改変), (B) Erythromycin の I 型 PKS である DEBS の DD の溶液中の構造。C 末端側の DD は青と黄色で、N 末端側の DD は緑とオレンジで示してある。それぞれのヘリックスが密接に相互作用していることがうかがえる。(C) B の枠線の中の拡大図。DD が正または負に帯電する残基を有し、相互認識していることがわかる (B, C は Richter et al. 2008 より引用)。

一方 NRPS においては相互作用に重要なドメインとして COM (communication-mediating) ドメインが知られている (表)。これは tyrocidineA や gramicidinS、surfactin の NRPS である TycA-TycB-TycC や GraA-GraB1 や SrfAA3-SrfAB1 に存在するとされる 20-30 残基程度の短い配列である (表 1-2、図 1-14)。

表 1-2 これまでに COM ドメインをもつことが示された NRPS の一覧

タンパクの組み合わせ	ドメイン構成
TycA-TycB	(A-CP-E-COM)-(COM-C-A-CP-A-CP-C-...)
TycB-TycC	(COM-C-A-CP-A-CP-C-A-CP-E-COM)-(COM-C-A-CP-C-...)
SrfAA-SrfAB	(C-A-CP-C-A-CP-C-A-CP-E-COM)-(COM-C-A-CP-C-...)
SrfAB-SrfAC	(C-A-CP-C-A-CP-C-A-CP-COM)-(COM-C-A-CP-TE)
GraA-GraB	(A-CP-E-COM)-(COM-C-A-CP-C-...)

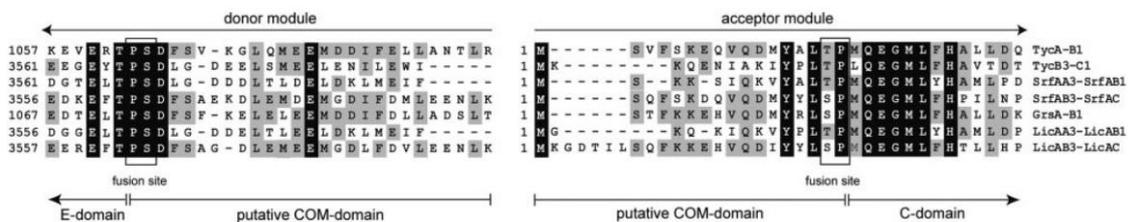


図 1-14 COM ドメインをもつとされる NRPS のアライメント

中でも TycA-TycB の組み合わせはいくつか研究例があり、COM ドメインを欠失させた TycA では tyrocidineA の生産能が無くなるのが *in vitro* で示されている (Hahn & Stachelhaus 2004)。また、アルキンとアジドを有するケミカルプローブで TycA と TycB のそれぞれを修飾し、この組み合わせでのみ 2 つのモジュールが huigen 反応により共有結合で結ばれ、これより特異的な相互作用の存在が示されている (図 1-15, Hur et al. 2009)。

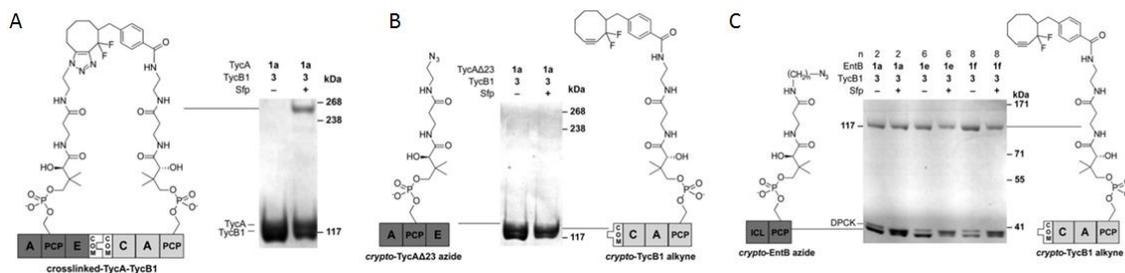


図 1-15 TycA と TycB を酵素化学的に修飾したクロスリンク実験 (A) TycA にアジドを、TycB にアルキンを導入し、huigen 反応でクロスリンクすることを確認した実験 (B) TycA の C 末端の COM ドメインを欠失させるとクロスリンクしなくなる (C) 適切なパートナーでない EntB ではクロスリンクしない (図は Hur et al. 2009 より引用)

また、NRPS-PKS ハイブリッド型のもでも DD の存在が報告されており、その結晶構造解析もなされている (Richter et al. 2008)。解析がなされているのは Tubulysins の NRPS-PKS ハイブリッドの TubB と TubC 間の DD である (図 1-16A, B)。PKS の DD がヘリックスのみから構成されていたのに対し、こちらはβ-シート構造も持つ。60 残基程度から構成されており、PKS の DD と同程度の長さであり、COM ドメインの倍程度の長さである。

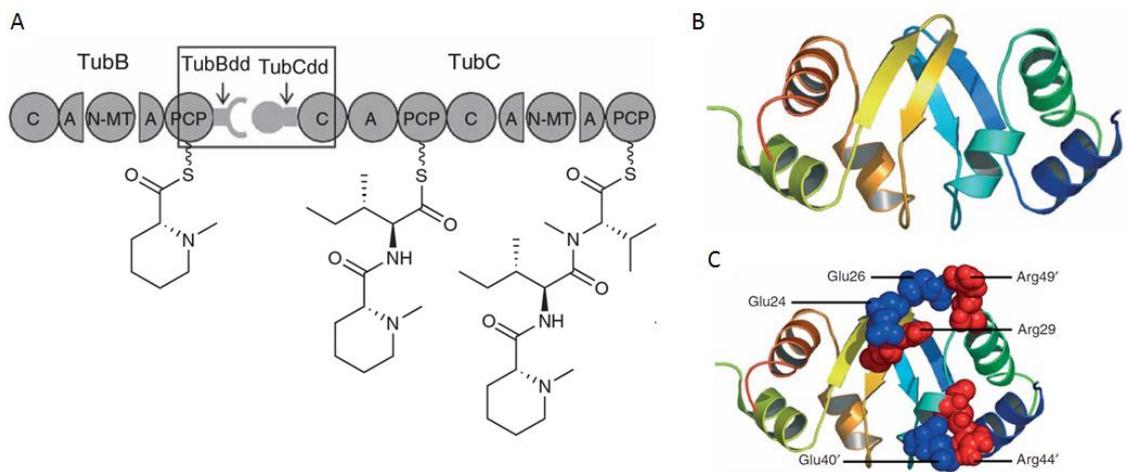


図 1-16 (A) TubB と TubC のドメイン構成 (掲載している部分は組み立てラインのすべてではなく、TubC の後ろには PKS が存在する)。(B) 溶液中の TubC の DD の構造, (C) TubC の DD 同士は塩橋で相互作用している。

### 1.3 NRPS の生合成改変

NRPS は多様な生物活性を有することから NRPS は格好の酵素エンジニアリングの標的となっている。これまでにかなりの研究がなされ、その手法はいくつかに分類される。これまでに行われてきた主な NRPS の生合成改変をまとめた (表 1-3)。

1 つは precursor-directed biosynthesis である。これは生産菌に非天然型の前駆体を投与し、その前駆体を取り込まれた非天然型の天然物が生産されるというものである。しかし、当然のことながら非天然型の基質と天然型の基質では後者の取り込みが勝り、本来の生産物が生産されてしまうため非天然型の天然物の収量は低い (図 1-17A)。

そこで次に着目されたのが mutasynthesis である (図 1-17B)。これは、前駆体の生合成遺伝子破壊株に対して非天然型の前駆体を取り込ませるものであり、上記の様な競合による問題は生じない。しかし、破壊できる遺伝子が限られていること、破壊した遺伝子の下流の生合成は変えられないこと、下流の生合成酵素の基質特異性等の問題が生じる。これらの問題により、依然として収率の問題を抱えることが多い。また、前駆体の膜透過性も問題となる。この問題を回避するために前駆体の生合成遺伝子破壊株に対して、代替の遺伝子を導入し、生体内で前駆体を作らせるという方法もある (図 1-17C)。

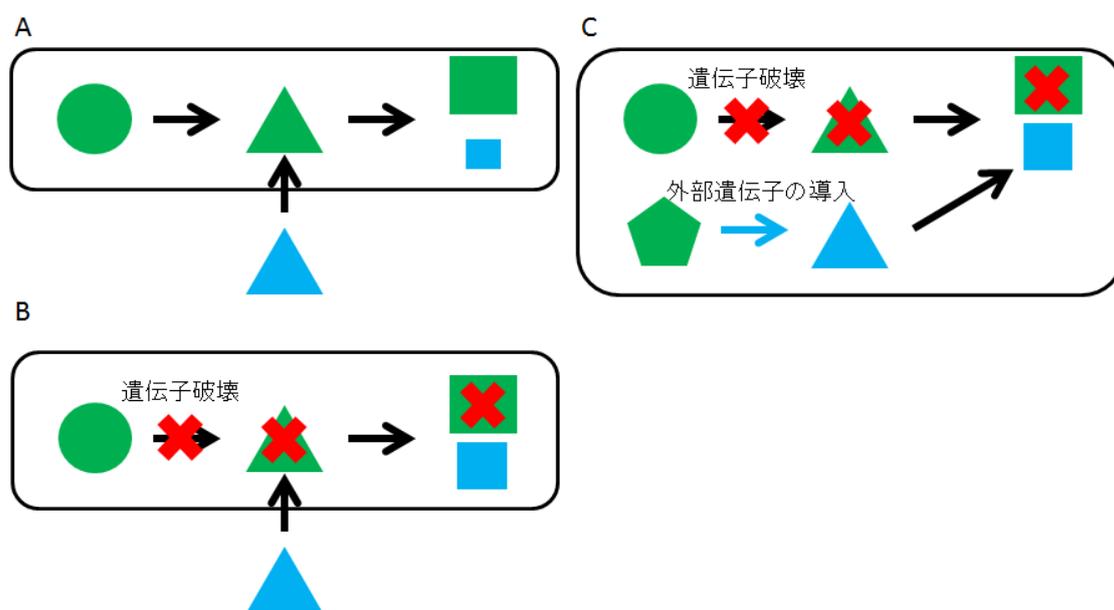


図 1-17 precursor-directed biosynthesis (A) と mutasynthesis (B)、外部酵素の導入によるエンジニアリング (C) の概念図

表 1-3 これまでに行われた NRPS の生合成改変の抜粋

Method	Target compound	Target genes/proteins	Results	Ref
前駆体投与	cyclosporin	-	3つのアナログ合成 (low yield)	Traber et al. 1989
Mutasynthesis	CDAs	<i>hmaS</i> (前駆体生合成) 破壊	6つのアナログ合成 (low yield)	Hojati et al. 2002
Mutasynthesis	balhimycin	<i>bhp</i> (前駆体合成) 破壊	3つのアナログ合成 (low yield)	Weist et al. 2002
異種酵素遺伝子導入	pacidamycin	<i>prnA</i> (ハロゲナーゼ) 導入	改変型前駆体 Cl-Trp の導入、半合成	Roy et al. 2010
遺伝子破壊	CDAs	<i>hxcO</i> (Fa 酸化酵素)	脂肪酸部位の異なる3つのアナログ合成	Powell et al. 2007
改変 Mutasynthesis	CDAs	<i>hxcO</i> (前駆体合成) 破壊、 関連遺伝子への変異導入	脂肪酸部位の異なる3つのアナログ合成	Powell et al. 2007
遺伝子破壊と 異種遺伝子導入	enduracidin	Phe ハロゲナーゼ	ジクロロ-Phe がモノクロロ-Phe になったアナログ	Yin et al. 2010
異種酵素遺伝子導入	enduracidin	Phe ハロゲナーゼ	ジクロロ-Phe がトリクロロ-Phe になったアナログ	Yin et al. 2010
異種酵素遺伝子導入	enduracidin	<i>ram29</i> (糖転移酵素)	マンノースが導入されたアナログ	Wu et al. 2015
<i>in vitro</i> 反応	Teicoplanin A2-2	N アシル基転移酵素	糖のアシル側鎖アナログ 20 個	Lyu et al. 2014

<i>in vitro</i> 反応	Teicoplanin like	スルホ基転移酵素	スルホ基の位置と数の異なるアナログ 7 個	Winn et al. 2016
異種酵素遺伝子導入	A47934	スルホ基転移酵素	スルホ基がさらにもう一つ導入されたアナログ	Yim et al. 2014
遺伝子破壊と 異種遺伝子導入	A47934	スルホ基転移酵素	異なる位置にスルホ基が導入されたアナログ	Yim et al. 2014
<i>in vitro</i> 反応	A47934	糖転移酵素	グルコースが導入されたアナログ	Yim et al. 2014
モジュールの交換	Daptomycin	NRPS モジュール	最後のアミノ酸が違うアナログ(2 種)	Miao et al. 2006
モジュールの交換	Daptomycin	NRPS モジュール	間の構成単位が異なるアナログ(15 種)	Nguyen et al 2006

また、テーラリング反応を利用した例も存在する。**Ram29** はリポペプチド **Ramoplanin** のテーラリング酵素であり **NRPS** によって構築されたアグリコンにマンノースを付加する糖転移酵素である。この **Ram29** をコードする遺伝子をリポペプチドである **Enduracidin** の生産菌に導入することで **Enduracidin** のマンノース配糖体の生産が確認されている (図 1-18, Wu et al. 2015)。

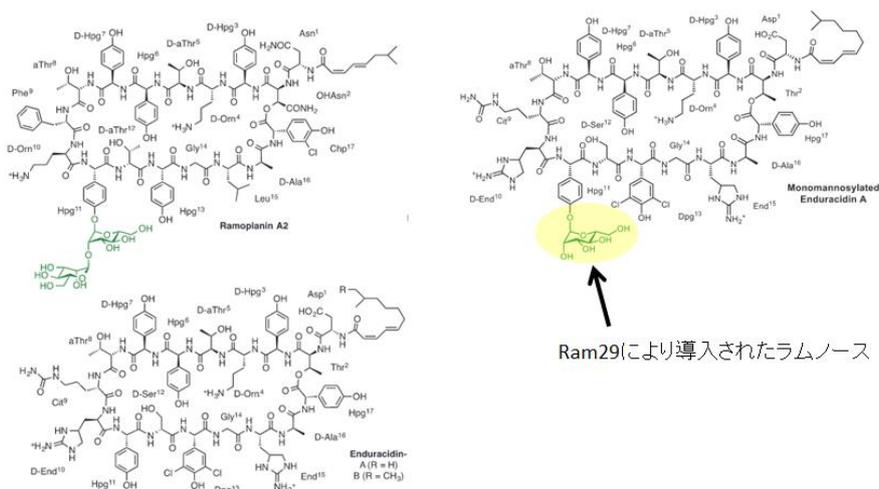


図 1-18 Ramoplanin, Enduracidin の化学構造式と Ram29 により配糖体化された Enduracidin の化学構造 (図は Wu et al. 2015 より引用し一部改変)

ここまでの例とは異なり、**NRPS** のドメインやモジュールを改変して非天然型の天然物を創出した例もある。リポペプチドである **daptomycin** は **DptA**, **DptBC**, **DptD** により生合成される。ターミネーションモジュールである **DptD** は 3-メチルグルタミン酸とキヌレニンを活性的化し、それらを構成単位として **NRP** に組み込んだ後、大環状化を触媒する **NRPS** である。この **dptD** 破壊株に対して、**A54145** のターミネーションモジュールである **lptD**、もしくは **CDA** のターミネーションモジュールである **cdaPS3** を導入したところ、キヌレニンの代わりに **Ile** と **Trp** が導入された **NRP** の創出に成功している (図 1-19, Miao et al. 2006)。

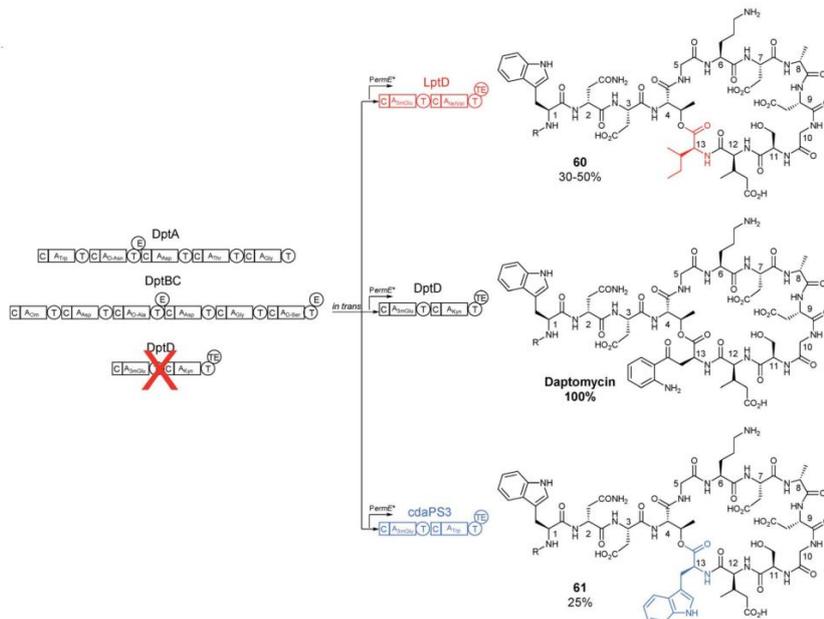


図 1-19 Daptomycin を用いた NRPS のエンジニアリングの例 (図は Winn et al. 2016 より引用、なお、図中の T ドメインは GP ドメインと同義である)

また、DptBC 中のモジュールを入れ替えたり、重複させたりすることで構成要素の順番の入れ換えや、交換を行い、新たな NRP の創生がなされている (図 1-20, Nguyen et al. 2006)。

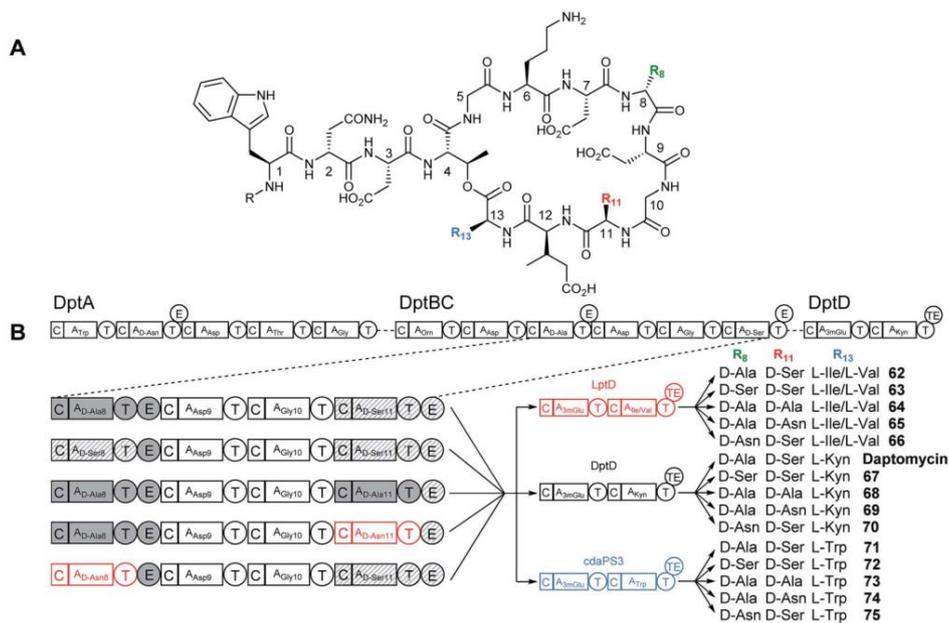


図 1-20 Dptmycin を用いた NRPS のエンジニアリングの例 グレー、白、斜線で描かれているものが DptBC が本来もつモジュールであり、これを入れ替えたり、重複させたり、赤で描かれている A54145 のモジュールに置換したりすることで構造多様性を創出している。さらに図 1-10 の結果と組み合わせることで 14 個のアナログの生産を達成している (図は Winn et al. 2016 より引用、なお、図中の T ドメインは GP ドメインと同義である)。

先の 2 例はモジュール全体を入れ替えるというストラテジーであったが、モジュールの中のドメインのみを交換して新たな NRP を創出した例も存在する (Calcott et al. 2014)。Pyoverdine の生合成に関わる NRPS、PvdD の 2 つ目のモジュール (モジュール 11) 内の A ドメインのみ、もしくは C-A ダイドメインを自身の他のモジュール内の A ドメインや C-A ダイドメイン、もしくはホモログの A ドメインや C-A ダイドメインと交換することで Thr が Ser や Lys に変わったようなアナログを創出している (図 1-21)。

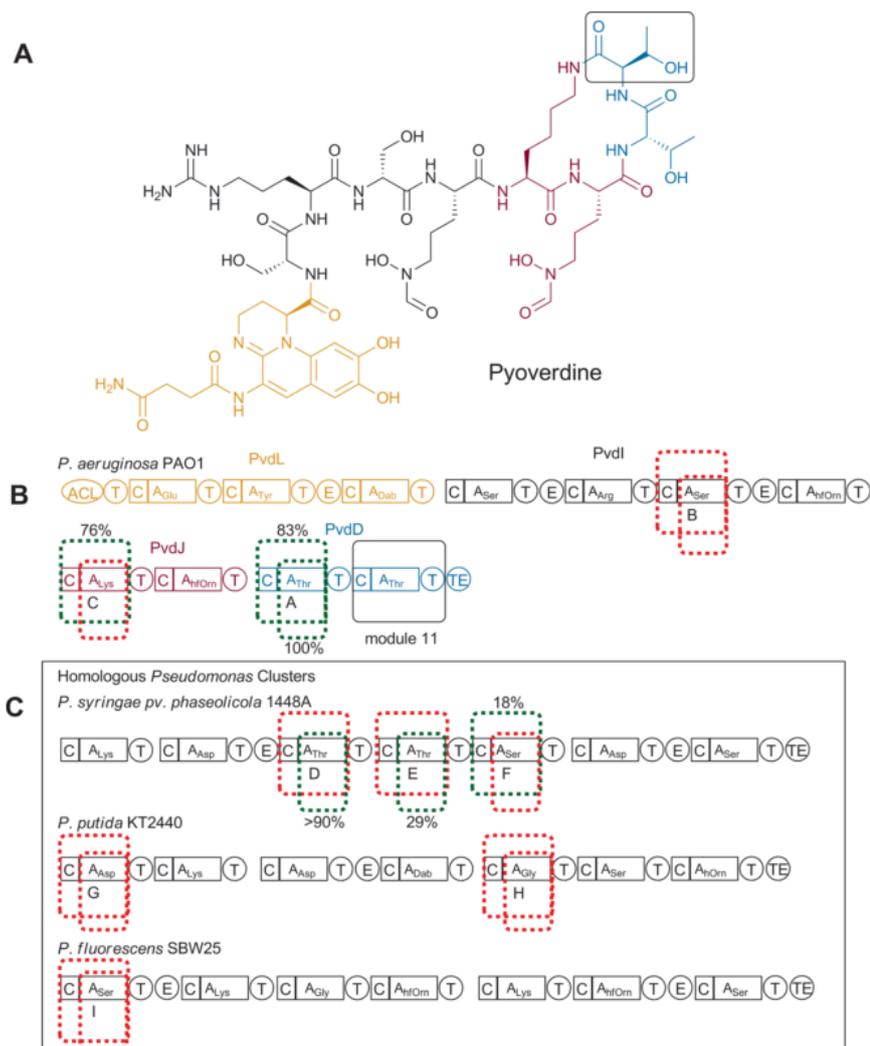


図 1-21 Pyoverdine の NRPS を用いたエンジニアリング PvdD の最後のモジュール (モジュール 11) の黒線で囲われた A ドメインもしくは C-A ダイドメインが PvdI や PvdJ, PvdD とホモログ酵素の点線で囲われた部分と交換された。緑線はアナログの生産が確認されたもので、赤線は生産が確認されなかったもの。数字は野生型と比較した際の生産効率を表す (図は Winn et al. 2016 より引用、なお、図中の T ドメインは CP ドメインと同義である)。

#### 1.4 本研究の目的

これまでで述べたように、二次代謝産物は感染症への対策に留まらず、抗がん剤や免疫抑制剤などへの応用がなされており、非常に重要な化合物群である。そのなかでも NRP はその構造多様性や、生物活性から研究され続けてきた化合物群である。しかしながら、その生合成機構の詳細に関しては未知な部分が多い。NRP の生合成を理解する上で重要な点は2つあり、1つは非タンパク質性のアミノ酸の生合成である。これまでで述べたように非タンパク質性のアミノ酸は生物活性を發揮するために重要な要因であることが多いためである。もうひとつの特徴はもちろん NRPS によって行われる構成要素の組み立てである。これまでで述べたように、モジュール全体の結晶構造解析が行われてもその全容は解明されていない。

そこで、本研究ではこの2点について研究を進めた。すなわち、非タンパク質性のアミノ酸の生合成経路の解明と、モジュール間の相互作用に関する研究である。前者では新たな酵素の発見に繋がる可能性があり、後者は NRPS のエンジニアリングに繋がる知見が得られると考えられる。これらの知見が蓄積していくことで、任意のアミノ酸を任意の順番で結合させる新たなペプチド合成システムの構築に繋がると考えられる (図 1-22)。

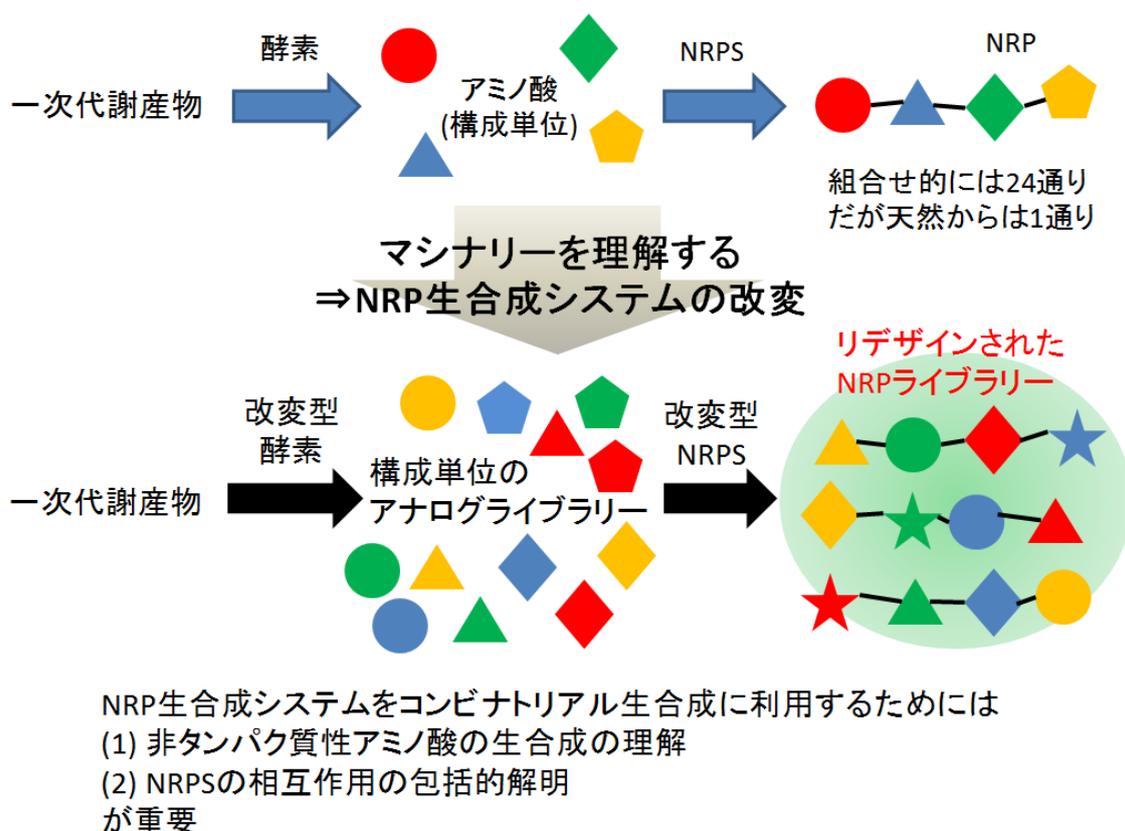


図 1-22 本研究の最終的目標の模式図

## 謝辞

本博士論文は、私が東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 博士課程在学中に 醗酵学研究室 において行なった研究をまとめたものです。

本学教授の 大西 康夫 先生には本研究を進めるにあたり、終始ご指導・ご助言を頂きまして心より感謝致します。大西先生は、いつもいつでも一生懸命で、教授室をのぞくと見える、先生が真摯に仕事に取り組む様子は私のモチベーションの1つでありました。また、研究を進めていくうちに考えが狭まってしまいがちであったため、先生の大きな視点からのご助言は大変有難いものでした。研究会での数々の提案やコメント、飲み会での交流の全てが私の人生観、研究観に大きく影響を与えてくださりました。本当にありがとうございました。

本学准教授の 勝山 陽平 先生からは、実験の基本的な技術に始まり、分析機器の使い方、データの解釈の仕方まで、丁寧に指導して頂きました。勝山先生の火の玉のような向上心の発露は常に私のモチベーションであり続けました。勝山先生のような明晰な方の下で博士課程を過ごしたことは私の理想研究者、指導者像を大きく高めてしまいましたが、今後、その理想と現実の差を埋めるべく先生のように頑張りたいと思います。ありがとうございました。

本学助教の 手塚 武揚 先生とは一番年が近いスタッフということもありいつでも気さくに接していただきました。まれに実験操作を教えていただく際にはとても丁寧に教えてくださり、学生へのその接し方に学ぶべき姿があるなと思いました。話していてもつかみどころのないところが面白かったです。ありがとうございました。

本学特任教授の 尾仲 宏康 先生は、いつもフランクに接して下さり、時にはお説教をしていただいたりと、兎に角、いろいろとお話しをさせていただきました。先生からいただいた言葉のうち幾つかは深く胸に刻み込まれています。ありがとうございました。

本学特任助教の 浅水 俊平 先生は、私が最近読んだ論文の話をするると大体目を通しておられることが多く、学生の指導や自身の実験の合間にも論文を読む時間を見つけ、新たな知識を獲得している姿に感銘を覚えていました。ありがとうございました。

本学 特任教授の 川崎 寿 先生は、私が生意気なことを言ってもそれを笑顔で受け止めてくださり、さらにそれに対して大変有益な助言もおっしゃっていただいていたいました。先生のおおらかさは指導者として見習うべきところであると考えています。いつもお忙しい中お話をする機会を作っていただきましてありがとうございました。

共同研究者である AIST の 新家 一男 上級主任研究員、UCSD の Michael Burkart 教授、東北大学の 土井 隆之 教授、OIST の 佐藤 矩行 教授やその研究室員の方々には実験サンプルの供与や研究のディスカッションにおいて大変お世話になりました。この場を借りて厚く御礼を申し上げます。

本学助教の 水口(鈴木) 千穂 先生には SPR 解析を、同博士研究員の 吉田 彩子 博士には iTC の測定法をご教授していただきました。この場を借りて厚く御礼を申し上げます。

北里大学の 長光 亨 教授、大多和 正樹 講師、有馬 志保 助教には学部生のときに有機合成化学の基礎を叩き込んでいただきました。現在、そしてこれからも役に立つ技術、経験を積ませていただきました。この場を借りて厚く御礼を申し上げます。

東京工業大学の 江口 正 教授、工藤 史貴 准教授、宮永 顕正 助教には修士課程在学時に生合成研究の特に酵素の精密反応解析に関してその技術と、なによりもその哲学を叩き込んでいただきました。この経験は私の化学者としての基礎を形作る大変貴重な経験となりました。この場を借りて厚く御礼を申し上げます。

所属研究室の先輩である菅井 佳宜 博士、富田 宏矢 博士、河内 護之 博士、毛利 佳弘 博士、江 年 博士、齋藤 駿 博士には公私両面における様々な相談事や愚痴を聞いていただきました。偉大な先輩方に囲まれて生活したことは、自身の成長に直結していると思います。ありがとうございました。

後輩の皆さんからは、実験の合間などに楽しく語り合う中で、日々の困難を乗り越える力を貰いました。また、色々なことを教える中で皆さんからも教わることも多々ありました。ありがとう。

同期の 木村 知宏 君、佐藤 啓 君、曾根 薫 君、管 S 一郎君とは切磋琢磨し協力し合いながら生活する中でお互いを高め合うことができました。ありがとう。

また、ここには書ききれませんが、他大学の方や、他研究機関の方、他研究室の方、これまでに所属した研究室の先輩方、同期のみんな、後輩の皆様や大学、高校、中学の友人たちにも感謝をしたいと思います。

最後に、両親と 4 人の兄弟、その家族と、誰よりも私の博士課程での 4 年間を支えてくれた婚約者の 岡本 悠里 さんに感謝の言葉を述べたいと思います。ほんとうにありがとう。

12 月 21 日 角田 毅