

## 要約

### 合成小分子化合物群を用いたペプチド性天然化合物合成酵素に対する 網羅的機能解析技術の開発に関する研究

笠井 昭太

## 序論

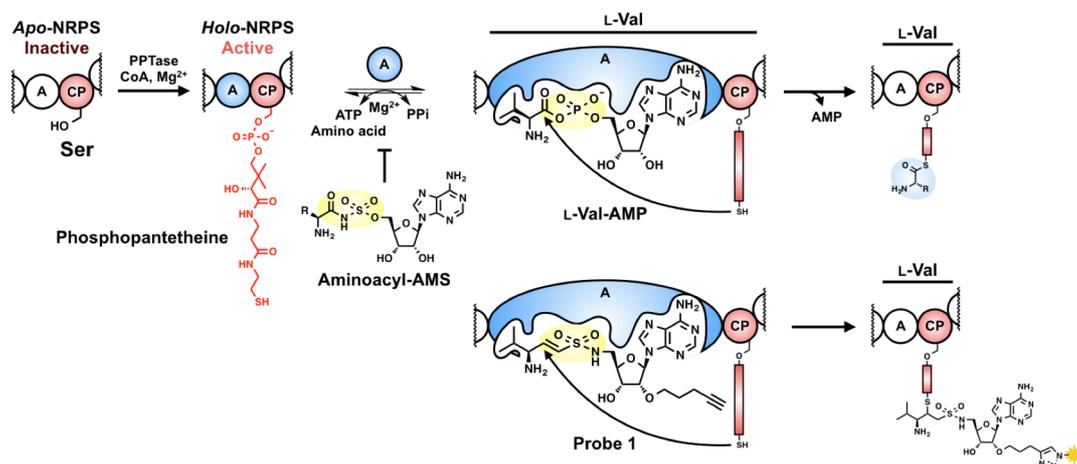
微生物は多種多様な二次代謝産物の一種としてペプチド性天然化合物である非リボソーム性ペプチド (nonribosomal peptide, NRP) を産生する。NRP は多様な分子構造と生物活性を有しており、現在医薬品として多く用いられている。そのため、NRP は創薬リード化合物として注目され、盛んに探索研究が行われてきた。その結果、有用な NRP が見つかっている一方で、病原細菌からは病原性因子として機能する NRP も見つかっている。そのため、NRP の生産制御を目的に、その二次代謝経路を対象とした研究が行われている。

NRP は非リボソーム性ペプチド合成酵素 (nonribosomal peptide synthetase, NRPS) と呼ばれている酵素群によって厳密な制御を受け合成される。NRPS は、アデニレーション (A) ドメイン、キャリアプロテイン (CP)、コンデンセーション (C) ドメインを基本単位とするモジュールが複数連なり構成される巨大タンパク質である。必須ドメインの一つである A ドメインは、その厳密な基質特異性から NRP 合成におけるゲートキーパーとしての役割を担っており、生体内プールから選択した特定のアミノ酸と ATP から高反応性中間体であるアミノアシル-AMP を合成する (Figure 1)。もう一つの必須ドメインである CP は、NRPS の機能発現に必須である翻訳後修飾を受ける部位であり、NRP のビルディングブロックであるアミノ酸を担持する役割をもつ。生体内で産生された新生 NRPS は、ホスホパンテテイントランスフェラーゼ (PPTase) と補酵素 CoA により生体内で速やかに翻訳後修飾としてホスホパンテテイン化を受ける。すべての CP がホスホパンテテインを付加されることで、A ドメインの基質特異性に応じて取り込まれたアミノ酸が NRP のビルディングブロックとして NRPS の CP 上に担持される。この担持されたアミノ酸が C ドメインによって、上流のアミノ酸から下流のアミノ酸へと順次縮合されることで、NRP が合成される。

NRPS の酵素機能を詳細に解析することにより、NRPS から合成される NRP を理解することができる。また、NRPS を遺伝子工学的手法によって制御可能と

なることで、人為的に NRPS によるペプチド性化合物の合成が可能となり、医薬品の供給や新規医薬品候補化合物の合成が期待される。しかし、今日の NRPS 機能解析法は精製タンパク質に限られたものである。また、NRPS は複数のドメインで構成される巨大タンパク質である。したがって、すべての NRPS を組換えタンパク質として発現、精製し解析することは容易ではない。

そこで本研究では、微生物が産生した内在性 NRPS に適用可能な網羅的機能解析技術の開発を行った。第一章では、NRPS の必須ドメインであるアデニレーション (A) ドメインの活性部位指向型標識化プローブと阻害剤ライブラリーを用いた内在性 NRPS の網羅的基質特異性解析方法の開発について、第二章では、内在性 NRPS の翻訳後修飾を標的とした選択的検出プローブの開発を行った。以下にその研究成果について述べる。



**Figure 1.** NRPS モジュールにおける CP への翻訳後修飾と A ドメイン及び CP での触媒機構、アミノアシル-AMS 及びプローブ 1 の構造と反応機構

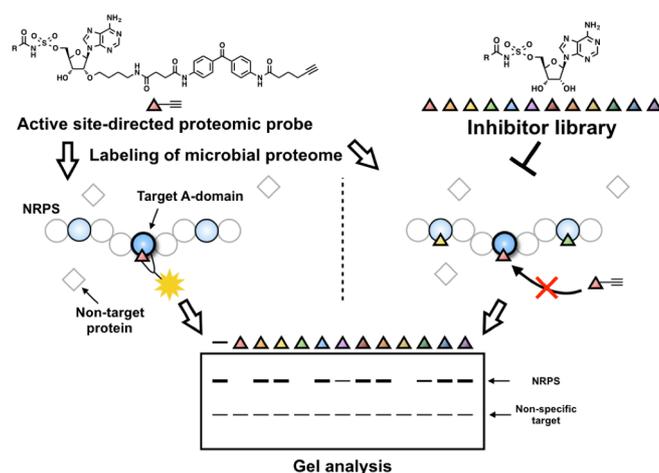
## 本論

### 【第一章 競合的 activity-based protein profiling (ABPP) による内在性アデニレーション (A) ドメインの網羅的機能解析】

本章では、A ドメインの基質特異性解析法として競合的 ABPP の開発を目指した。ABPP とは、酵素のメカニズムに依存し機能する化学プローブを用い、プロテオーム中から特定のタンパク質の検出やその酵素活性の評価を行う方法である。当研究室では、生体内を含む夾雑系に適応可能な NRPS の A ドメインに対する活性部位指向型プローブを開発している。そしてこのプローブのリガンドであるアミノアシル-AMS はアミノアシル-AMP の生物学的等価体であり、A

ドメインと高い親和性を示す阻害剤である。アミノアシル-AMS の側鎖部を種々のアミノ酸側鎖部と置換することで、様々なアミノ酸を基質とする A ドメインの阻害剤を合成可能である。すなわち、各種アミノ酸側鎖部をもつアミノアシル-AMS と、A ドメインに対する活性部位指向型プローブを組み合わせた競合的 ABPP を行うことで、微生物プロテオームに存在する様々な A ドメインの基質特異性を網羅的に評価できると考えた (Figure 2)。そこで、本研究では、19 種の天然アミノ酸及び L-Orn の側鎖部構造を有するアミノアシル-AMS 阻害剤ライブラリーを構築し、競合的 ABPP による解析法の評価を行った。

20 種のアミノ酸の側鎖部の構造を有するアミノアシル-AMS を合成し、競合的 ABPP によって内在性 NRPS の A ドメインの基質特異性を評価可能であるか否かの検討を行った。内在性及びリコンビナント NRPS を用いた競合的 ABPP による解析結果と、リコンビナント NRPS に対する既存の A ドメインの基質特異性解析法である MesG アッセイによる解析結果を比較した。その結果、これら解析結果にはよい相関がみられた。これにより、本研究で開発した競合的 ABPP は内在性 NRPS に対して、その基質特異性の評価が可能であることを明らかとなった。本法は既存の A ドメインの基質特異性及び酵素活性評価法とは異なり、夾雑系において特定の A ドメインの解析が可能である。したがって、これまで解析が困難であった、複数の A ドメインが含まれる NRPS の A ドメインを個別に評価可能である。また、SDS-PAGE を用いた簡便な解析ができ、多様な側鎖部構造を有するアミノアシル-AMS を用いることで、一度に複数のアミノ酸に対する基質特異性を評価可能であり有用性が高い。



**Figure 2.** A ドメインの活性指向型プローブと A ドメイン阻害剤であるアミノアシル-AMS ライブラリーを利用した競合的 ABPP の概要図。

## 【第二章 NRPS 担体タンパク質 (CP) の翻訳後修飾を標的とした分子ツールの開発】

本章では、NRPS の CP の翻訳後修飾 (ホスホパンテテイン化) を選択的に検出する分子ツールの開発を目指した。NRPS の A ドメイン及び CP での特徴的な酵素触媒反応を利用する、翻訳後修飾を選択的に検出する分子ツールとして、アミノアシル-AMP を模倣したプローブ **1** の設計及び合成をした (Figure 1)。設計したプローブを用いたリコンビナント及び内在性 NRPS モジュールに対する標識化実験から、プローブの機能評価を行った。その結果、合成したプローブは NRPS の CP 上のホスホパンテテインを選択的に検出できることが明らかとなった。また、その標識化は CP と隣接する A ドメインの基質特異性に依存していることを明らかとなった。本研究で行ったプローブの合成法は、他のアミノ酸側鎖部を有するプローブの合成にも適用可能である。そのため、様々なアミノ酸側鎖部を有するプローブを合成し用いることで、NRPS に含まれる複数の CP を個別に検出可能となる。

本研究で開発したプローブは、微生物が産生した内在性 NRPS に対しても適用可能であり、新たな CP の翻訳後修飾を標的とした分子ツールである。開発した CP の選択的標識化プローブを用いることで、微生物の内在性 NRPS に対する翻訳後修飾を直接的に検出することが可能となり、本法は生体内における翻訳後修飾の制御機構や PPTase を標的とした創薬基盤の構築につながると期待される。

## 結論

本研究では、内在性 NRPS に適用可能な NRPS 機能解析を目的に、合成小分子化合物群を用いた内在性 NRPS に対する網羅的機能解析技術の開発を行った。

第一章では、競合的 ABPP による NRPS の A ドメインの網羅的な基質特異性の解析法の開発を行った。A ドメインの選択的阻害剤であるアミノアシル-AMS ライブラリーを構築し、当研究室で開発された A ドメインに対する活性部位指向型プローブと組み合わせた競合的 ABPP を行った。それにより、A ドメインの基質特異性解析が可能であることを明らかにした。本法は、簡便に内在性 NRPS の多くの A ドメインを解析することが可能であり、複数の A ドメインが存在しても、各 A ドメインについて個別に解析可能である。また、本法は一度に様々な基質に対する解析を可能とした。

第二章では、内在性 NRPS に対する翻訳後修飾の解析を可能とする分子プローブの開発を行った。NRPS の基質であるアミノアシル-AMP を模倣したプローブの設計及び合成を行った。このプローブを用いることで、複数の CP が存在する内在性 NRPS から、隣接する A ドメインの厳密な基質特異性を利用し、特定の CP を標識可能であることを明らかにした。本法は、微生物の生体内での翻訳後修飾の解析における大きな一歩であると考えている。リガンド部のアミノ酸を入れ替えることにより、複数の NRPS に対する生体内での翻訳後修飾による機能制御の解析研究への適用が期待される。

本研究成果は、内在性 NRPS を直接用いた A ドメインの網羅的機能解析が可能になったことで、新規 NRPS の機能解析に加え、NRPS を用いたペプチド性天然化合物の合成を目的とした組換え A ドメインの簡便な機能解析を可能とする技術であることが期待される。また、内在性 NRPS に対する CP の翻訳後修飾の検出を可能としたことにより、生体内における PPTase の機能解析や、それを創薬ターゲットとしたスクリーニング系の構築による新規医薬品開発を支援するものとなることが期待される。