

京都大学	博士 (薬学)	氏名	今野 翔
論文題目	ペプチド性天然化合物合成酵素アデニレーションドメインに対する選択的ラベル化技術の開発に関する研究		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>微生物が産生する有用な天然化合物の多くは、非リボソーム性ペプチド合成酵素 (NRPS) やポリケチド合成酵素 (PKS) 及びハイブリッド型 PKS-NRPS と呼ばれる巨大酵素群 (平均分子量: 200-800 kDa) によって合成される。遺伝子工学技術の発展に伴い、これら酵素の機能や構造は明らかになってきたが、プロテオームレベルでの発現制御、相互作用などはほとんど解明されていない。その原因として、夾雑系に存在するこれら酵素群を特異的に検出する技術が存在しないことが挙げられる。そこで著者は、NRPS の基本構成単位であり、非リボソーム性ペプチド合成における“ゲートキーパー”であるアデニレーション (A) ドメインに着目し、内在性 NRPS を高選択的にラベル化・検出可能な合成分子プローブの開発を行った。</p> <p>【第1章】アデニレーションドメインを標的とした活性部位指向型プローブの設計・合成及び機能評価</p> <p>A ドメインはペプチド性天然化合物に導入されるアミノ酸やアール酸を選択・活性化するドメインであり、厳密な基質特異性を有する (Figure 1a)。そこで A ドメインの酵素的性質を利用すれば、NRPS の高選択的なラベル化が可能になると期待した。リガンドには、A ドメインにおける高反応性中間体であるアミノアシル-AMP のリン酸エステル部をスルファモイル基に置換したアミノアシル-AMS を採用した。リンカーの導入部位は、A ドメインと AMP との共結晶構造からアデノシンの 2'-OH に決定した。また、リンカー部には近傍の標的タンパク質と共有結合を形成するための光反応性官能基と、共有結合形成後にクリックケミストリーにより様々なタグ分子 (蛍光標識、ビオチン) を導入可能な末端アルキンを導入した (Figure 1b)。光反応性官能基の種類や位置でクロスリンク効率が異なることが予想されるため、光反応性官能基とスペーサーの長さが異なる 10 種類のプローブを設計し、合成した。グラミシジン S 合成酵素の大腸菌組換えタンパク質 GrsA (A: L-Phe) を用いた A ドメインに対する阻害活性評価・ラベル化実験から高いラベル化効率を有するプローブ構造を見出した。</p> <p>【第2章】合成分子プローブを用いた内在性 NRPS の検出法の確立</p>			

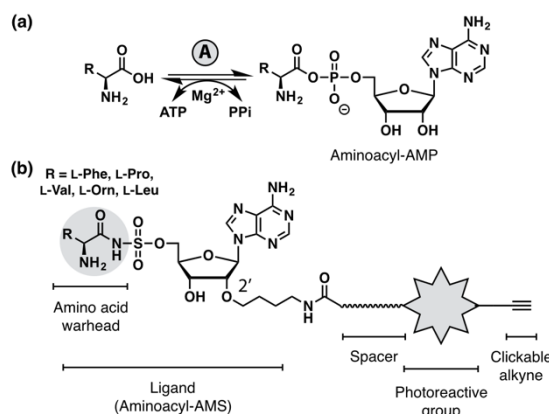


Figure 1. (a) Adenylation reaction catalyzed by the A-domains. (b) Design of the active site-directed proteomic probes for A-domains.

A ドメインの厳密な基質特異性を利用する最大の特徴と利点は、リガンド認識駆動により、リガンド部のアミノ酸に依存したラベル化が期待できることである。そこで、種々のアミノ酸をリガンド部に有するプローブを合成した。また、基質特異性の異なる A ドメインを有する TycB₁ (A: L-Pro) と AusA₁ (A: L-Val) を大腸菌組換えタンパク質として発現し、プローブのリガンド依存的ラベル化を評価した。その結果、プローブはリガンド部のアミノ酸に対応した基質特異性を有する A ドメインを高選択的にラベル化可能であることが明らかになった。次に、グラミシジン S (GS) 合成酵素である GrsA 及び 1 つのタンパク質中に 4 つの A ドメインを有する GrsB (A: L-Pro; L-Val; L-Orn; L-Leu) を標的とし、内在性 NRPS のラベル化実験を行った。リガンド部に L-Phe、L-Pro、L-Orn を有するプローブを GS 生産菌抽出液に処理したところ、リガンド認識駆動により GrsA、GrsB を選択的にラベル化することに成功した。これらの結果から、本プローブは A ドメインを指標として、夾雑系に存在する内在性 NRPS を高選択的にラベル化・検出可能であることが明らかとなった。

【第3章】合成分子プローブを利用した NRPS 活性のプロファイリング

生産菌プロテオーム中の NRPS 活性を定量的に検出することは、NRPS 発現の有無や時期だけでなくその動態・制御機構を理解することに繋がる。そこで、プローブを用いて内在性 NRPS 活性のプロファイリングを行った。まず、GS 生産菌及び非生産菌の GS 産生と NRPS 活性の相関について検討したところ、GS 産生と NRPS 活性は良い相関を示し、本プローブが NRPS を指標とした天然有機化合物生産菌の分別や最適培養条件の探索に応用可能であることが明らかになった。次に、GS 生産菌増殖過程における GrsA 及び GrsB の動態追跡を行った。その結果、*grsA* および *grsB* 遺伝子はポリシストロニックに遺伝子発現が制御されているにも関わらず、タンパク質レベルでは全く異なる発現プロファイルを示すことが明らかとなった。

本研究において、著者は夾雑系に存在する内在性 NRPS を迅速、簡便、高感度に検出可能な A ドメインに対する活性部位指向型プローブを開発した。本プローブ群は A ドメインの厳密な基質特異性を利用しているため、リガンド部のアミノ酸を置換することで、A ドメインを有する NRPS をリガンド認識駆動により高選択的にラベル化することが可能である。また、その発現量が少なく一過性の NRPS を高感度に検出可能である。さらに、A ドメインに対するラベル化剤ライブラリーを構築することで、網羅的 NRPS 発現解析が可能になると期待できる。これにより、プロテオミクスに立脚した未利用遺伝子資源の網羅的探索技術の構築だけでなく、内在性 NRPS の網羅的機能解析へ向けた有用な分子ツールとなることが期待できる。

(論文審査の結果の要旨)

著者は、非リボソーム性ペプチド合成酵素(NRPS)の基本構成単位であり、非リボソーム性ペプチド合成における“ゲートキーパー”であるアデニレーション(A)ドメインに着目し、内在性 NRPS を高選択的にラベル化・検出可能な合成分子プローブの開発を行った。

著者は、A ドメインの酵素的性質を利用し、NRPS の高選択的なラベル化を目指した。リガンドには、A ドメインにおける高反応性中間体であるアミノアシル-AMP のリン酸エステル部をスルファモイル基に置換したアミノアシル-AMS を採用し、リンカーの導入部位は、A ドメインと AMP との共結晶構造からアデノシンの 2'-OH を利用した。また、リンカー部には近傍の標的タンパク質と共有結合を形成するための光反応性官能基と、共有結合形成後にクリックケミストリーにより様々なタグ分子(蛍光標識、ビオチン)を導入可能な末端アルキンを導入した。グラミシジン S (GS) 合成酵素の大腸菌組換えタンパク質 GrsA(A: L-Phe)を用いた A ドメインに対する阻害活性評価・ラベル化実験を行い、高いラベル化効率を有するプローブ構造を見出した。

続いて、著者は、種々のアミノ酸をリガンド部に有する同様のプローブ分子を合成した。また、基質特異性の異なる A ドメインを有する TycB₁(A: L-Pro)と AusA₁(A: L-Val)を大腸菌組換えタンパク質として発現し、プローブ分子のリガンド依存的ラベル化を評価した。その結果、プローブ分子はリガンド部のアミノ酸に対応した基質特異性を有する A ドメインを高選択的にラベル化可能であることを明らかにした。また、グラミシジン S(GS)合成酵素である GrsA 及び 1 つのタンパク質中に 4 つの A ドメインを有する GrsB(A: L-Pro; L-Val; L-Orn; L-Leu)を標的とし、内在性 NRPS のラベル化実験を行った。リガンド部に L-Phe、L-Pro、L-Orn を有するプローブを GS 生産菌抽出液に処理した結果、リガンド認識駆動により GrsA、GrsB を選択的にラベル化することに成功した。したがって、本プローブ分子は A ドメインを指標として、夾雑系に存在する内在性 NRPS を高選択的にラベル化・検出可能であることを明らかにした。

さらに、著者は、本プローブ分子を用いて内在性 NRPS 活性のプロファイリングを行った。GS 生産菌及び非生産菌の GS 産生と NRPS 活性の相関について検討した結果、GS 産生と NRPS 活性は良い相関を示し、本プローブ分子が NRPS を指標とした天然有機化合物生産菌の分別や最適培養条件の探索に応用可能であることを明らかにした。次に、GS 生産菌増殖過程における GrsA 及び GrsB の動態追跡を行った結果、*grsA* および *grsB* 遺伝子はポリシストロニックに遺伝子発現が制御されているにも関わらず、タンパク質レベルでは全く異なる発現プロファイルを示すことを明らかにした。

以上のように、著者は、夾雑系に存在する内在性 NRPS を迅速、簡便、高感度に検出可能な A ドメインに対する活性部位指向型プローブの開発に成功した。本プローブ分子群は A ドメインの厳密な基質特異性を利用しているため、リガンド部のアミノ酸

を置換することで、A ドメインを有する NRPS をリガンド認識駆動により高選択的にラベル化することが可能となる。また、その発現量が少なく一過性の NRPS を高感度に検出可能である。さらに、A ドメインに対するラベル化剤ライブラリーを構築することで、網羅的 NRPS 発現解析が可能になることが期待される。本プローブ分子群は、プロテオミクスに立脚した未利用遺伝子資源の網羅的探索技術の構築だけでなく、内在性 NRPS の網羅的機能解析へ向けた有用な分子ツールとなることが期待できる。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成28年2月29日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当分の間、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日：2016 年 6 月 22 日以降