

新規な物質生産プロセスを可能にする
膜内在性酵素の構造生物学的研究

2022年 1月

岡本 貴樹

目次

序章 緒言	5
1. はじめに.....	5
2. 自然界のアルカン分解に関わる水酸化酵素	6
2-1. アルカンの分解経路.....	6
2-2. メタンモノオキシゲナーゼ (MMO).....	10
2-3. シトクロム P450 (P450, CYP).....	16
2-4. 長鎖アルカンモノオキシゲナーゼ LadA.....	23
2-5. アルカンモノオキシゲナーゼ AlkB	25
3. 微生物が生産するポリマー	32
3-1. ポリ乳酸 (PLA).....	32
3-2. ポリヒドロキシアルカノエート (PHA)	34
3-3. ポリ- γ -グルタミン酸 (γ -PGA).....	36
3-4. ϵ -ポリ-L-リジン (ϵ -PL).....	39
4. 研究目的.....	42
第一章 膜内在性アルカン水酸化酵素 AlkB の構造解析に向けた取り組み及び機能改変 を目指した変異体解析	44
緒言.....	44
結果・考察	45
1-1. AlkB の精製と結晶化	45
1-2. AlkB の構造解析に向けた新たな取り組み.....	48
1-3. アンモニアトランスポーターAmtB 融合 <i>AbAlkB</i> の調製法の確立.....	52
1-4. <i>PpAlkB</i> の変異体解析	61
操作.....	67
1-5. AlkB の発現・精製.....	67
1-6. FocA、GlpF 融合 AlkB の発現と会合状態の確認	67

1-7. FocA、GlpF 融合 <i>AbAlkB</i> の精製	68
1-8. AmtB- <i>AbAlkB</i> の発現・精製.....	69
1-9. AmtB- <i>AbAlkB</i> の界面活性剤の検討.....	69
1-10. MSP2N2 の発現・精製	70
1-11. Nanodisc 再構成.....	70
1-12. 融合体 AlkB の透過型電子顕微鏡観察	70
1-13. ルブレドキシンとルブレドキシン還元酵素の発現・精製	71
1-14. AlkB の活性測定	72
第二章 ε-ポリ-L-リジン合成酵素 Pls の L-リジン特異的な活性化メカニズムの解明と Pls 全長の構造解析に向けた取り組み	73
緒言.....	73
結果・考察.....	73
2-1. Pls アデニル化ドメインの結晶構造解析.....	73
2-2. Pls アデニル化ドメインのエステラーゼ活性.....	82
2-3. クライオ電子顕微鏡単粒子解析に向けた高純度 Pls 調製法の確立	83
実験手法.....	93
2-4. Pls アデニル化ドメインの発現・精製	93
2-5. Pls アデニル化ドメインのサーマルシフトアッセイ	94
2-6. Pls アデニル化ドメインの結晶化	94
2-7. Pls アデニル化ドメインの回折データの収集、構造決定	95
2-8. Pls アデニル化ドメインの活性測定	96
2-9. Pls の精製.....	96
2-10. MSP1E3 と MSP1D1 の発現、精製.....	97
2-11. Pls の Nanodisc 再構成	97
2-12. Pls の透過型電子顕微鏡観察の試料調製.....	97
終章 結言	100
参考文献.....	102

謝辭 118

序章 緒言

1. はじめに

酵素は、あらゆる生物が持つタンパク質であり、生体内外で化学反応を触媒する生体分子である。また、酵素が局在している場所から、膜結合型酵素と可溶性酵素に分類されており、可溶性酵素の中には細胞外に放出される分泌型酵素も存在する。これら酵素群の主な特徴は、鍵と鍵穴に例えられる基質特異性と、常温・常圧の温和な条件下で反応を触媒することである。人間は、酵素がタンパク質であること、どのような機能を持つかを理解する前から、酒造やチーズなどの発酵食品の生産などに酵素を利用してきた。酵素関連の研究が進展した近年では、合成生物学をベースとした物質生産^[1]やバイオレメディエーション^[2]、医療機器のバイオセンサー^[3]など幅広い分野で酵素は応用されている。このような酵素の応用が推し進められている要因の一つに、グリーン・サステナブルケミストリー (GSC) の概念が挙げられる。GSC とは、1998 年にポール・アナスタスが提唱した「グリーンケミストリーの 12 箇条^[4]」を基にした、人体や環境への負荷を低減するための指標、考え方である。具体的には、化学物質を設計・生産・応用する際に有害な物質を使わず、エネルギーや資源の消費と廃棄物を最小限に抑え、効率的に反応を進行させることが GSC の概念である。現在、人間が生活する上で必要な物質を生産するために大量の化学プラントが建てられており、そこで大規模なスケールの化学反応が行われている。この化学反応の大部分は、高温・高圧条件下で行われることが多いため、膨大なエネルギー量を消費し環境への負荷が大きいことが問題となっている。一方、酵素による反応は、先に述べたように温和な条件下で反応を進行させるため省エネルギーな代替法として注目を集めている。実際に、酵素を利用するためには、その酵素の大量調製法の確立や反応メカニズムを理解する必要がある。これらの課題を克服する際に、非常に強力なツールとなるのが酵素の構造解析である。その酵素が持つ機能を原子レベルで明らかにすることができるだけでなく、立体構造を基にして蛋白質工学により酵素の活性向上や機能改変が可能となる。実際に、洗剤に利用されている *Bacillus* 属のセリンプロテアーゼである subtilisin は立体構造を基にした部位特異的変異により耐酸化性が付与された^[5] (図 1)。このように、有用な酵素の立体構造を明らかにし、蛋白質工学的手法により新たな機能を付与することができれば、酵素の工業的応用につながる事が期待される。これまで工業的応用がなされてきた酵素は可溶性酵素であり、特に取り扱いが容易な分泌型酵素が大部分を占めている。膜結合型酵素が利用されていない主な理由に、膜結合型酵素は取り扱いが難しく、あまり研究が進展していないことが挙げられる。しかし、近年ではクライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) による膜タンパク質の構造解析は

はじめとする科学技術の発展により、膜結合型酵素の研究が急激に進展しつつある。本研究では、これまでに蓄積された膜タンパク質の研究技術を駆使し、応用が期待されている膜結合型酵素である、①アルカン水酸化酵素 AlkB、及び、②ε-ポリ-L-リジン合成酵素 Pls を研究対象とした。

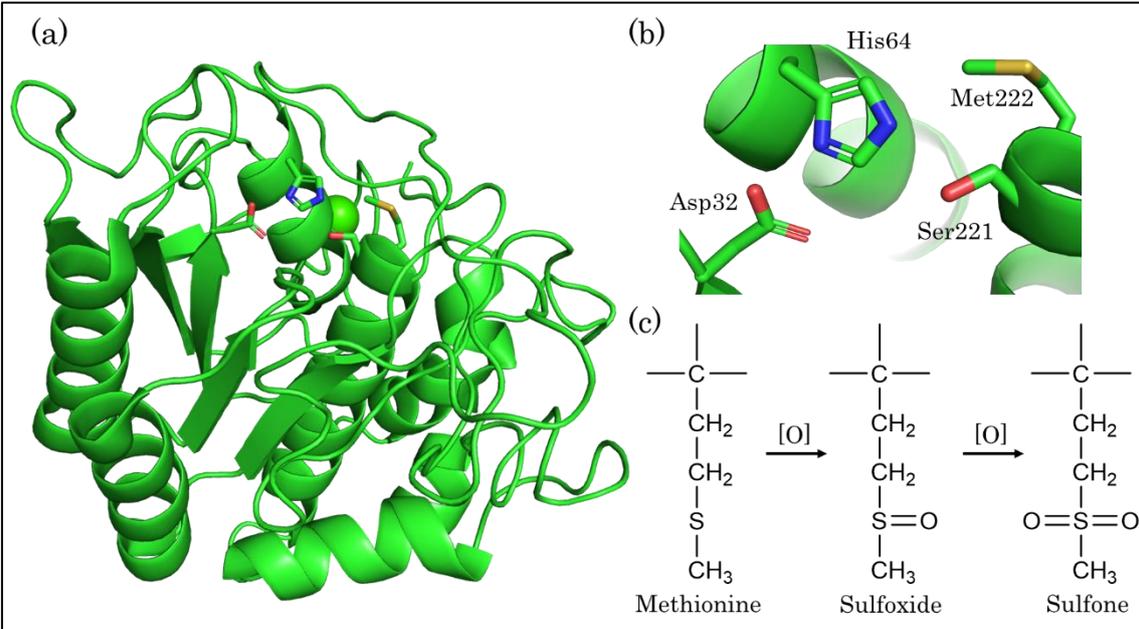


図 1 | (a) subtilisin の全体構造 (PDB ID: 1SBT) (b) 触媒三残基と酸化されるメチオニン残基 (c) メチオニン側鎖の酸化によるスルホキシドとスルホンの形成

Subtilisin は漂白剤に含まれる酸化剤によって活性中心近傍に存在する Met222 が酸化されると失活する。Met222 に対して部位特異的の変異導入を行い、Ser や Ala に置換することで subtilisin の酸化剤への耐性が向上した。

2. 自然界のアルカン分解に関わる水酸化酵素

2-1. アルカンの分解経路

アルkanは、一般式 C_nH_{2n+2} で表される飽和炭化水素であり、天然ガスや石油の主成分として地球上に存在する。自然界に豊富に存在し、非常に安価に入手可能であることから、アルkanをプラスチックや医薬品化合物の原料として利用することが望まれている。しかし、アルkanの C-C 結合及び C-H 結合は非常に安定であるため反応性に乏しく、利用方法は限られている。特に炭素数 1-4 の低級アルkanはより反応性が低いため、C-H 結合を開裂させるには高温の反応条件を必要とする。そのため、これら低級アルkanは主に燃料として利用されている。その他の用途として、一酸化炭素と水素から構成される合成ガスへの変

換がある。合成ガスは水素燃料や、メタン、メタノールなど多種多様な化合物に変換される起点となる重要な原料であるが、合成ガスの製造には低級アルカンの C-H 結合の開裂が必要なため多量のエネルギーを消費する問題がある。そのため近年では、利用方法が限られている低級アルカンを省エネルギーな方法で利用するプロセスの開発が強く望まれている。

自然界に存在するアルカンは、様々な微生物によって分解されることが知られている^[6]。アルカン分解菌と呼ばれるこれらの微生物は、不活性なアルカンを炭素源・エネルギー源として利用する、アルカン資化性を有しているため、原油汚染などに対するバイオレメディエーションへの活用が期待されている。アルカン分解菌による分解は嫌氣的条件下と好氣的条件下のどちらでも行われ、それぞれ異なった経路で分解される。

・嫌氣的条件下でのアルカン分解

嫌氣条件下でのアルカンの分解を行う微生物として、硫酸塩還元菌 AK-01 株^[6]、CV2803T 株^[7]、Hxd3 株^[8]、Pnd3 株^[9]、脱窒菌 HxN1 株^[10]が報告されている。これらの微生物が行うアルカンの嫌氣的分解には 2 つの経路があることが明らかになっている (図 2)。多くの嫌氣性アルカン分解菌から、フマル酸付加に関わるアルキルコハク酸シンターゼ (ASS) の遺伝子が同定^{[11][12][13][14]}されており、世界中の様々な箇所油層からアルキルコハク酸が検出^{[15][16][17][18]}されていることから、嫌氣的アルカン分解の主要な経路はフマル酸付加経路であると考えられている。細胞内に取り込まれたアルカンは、ASS によって C2 位にフマル酸が付加された後、炭素骨格の再構築と脱炭酸を経てカルボン酸に変換される^[19]。このカルボン酸はβ酸化によってアセチル CoA まで分解される。

一方、嫌氣的水酸化経路は、アルカン分解硫酸塩還元菌の中で *Desulfococcus oleovorans* Hxd3 株だけでしか確認されていない。Hxd3 株は、炭素数が奇数のアルカンを炭素源とすると炭素鎖が偶数のカルボン酸を生成し、その逆も同様に起こるためフマル酸付加経路とは違うメカニズムでアルカン分解を行っていると考えられていた^[9]。13C 安定同位体を用いた Hxd3 株の代謝物の解析により、Hxd3 株は最初のステップでアルカンの C3 位をカルボキシル化し、C1 位と C2 位の炭素を除去していることが明らかになった^[20]。また、プロテオミクス解析により、Hxd3 株はフマル酸付加経路の初発反応を担う ASS を有していない代わりに、芳香族化合物の分解に関わるエチルベンゼンデヒドロゲナーゼ (EBDH) のオルソログである、アルカン C2-メチレンヒドロキシラーゼ (AhyABC) を有していた^[20]。EBDH の反応様式から、AhyABC は C2 位の水酸化を行ったあと、連続して酸化することでケト基を形成し、その後 C3 位のカルボキシル化を触媒すると推定された^{[21][22][23]}。

AhyABC によって生産された 2-アセチルアルカン酸はβ酸化を受けてアセチル CoA まで分解される。

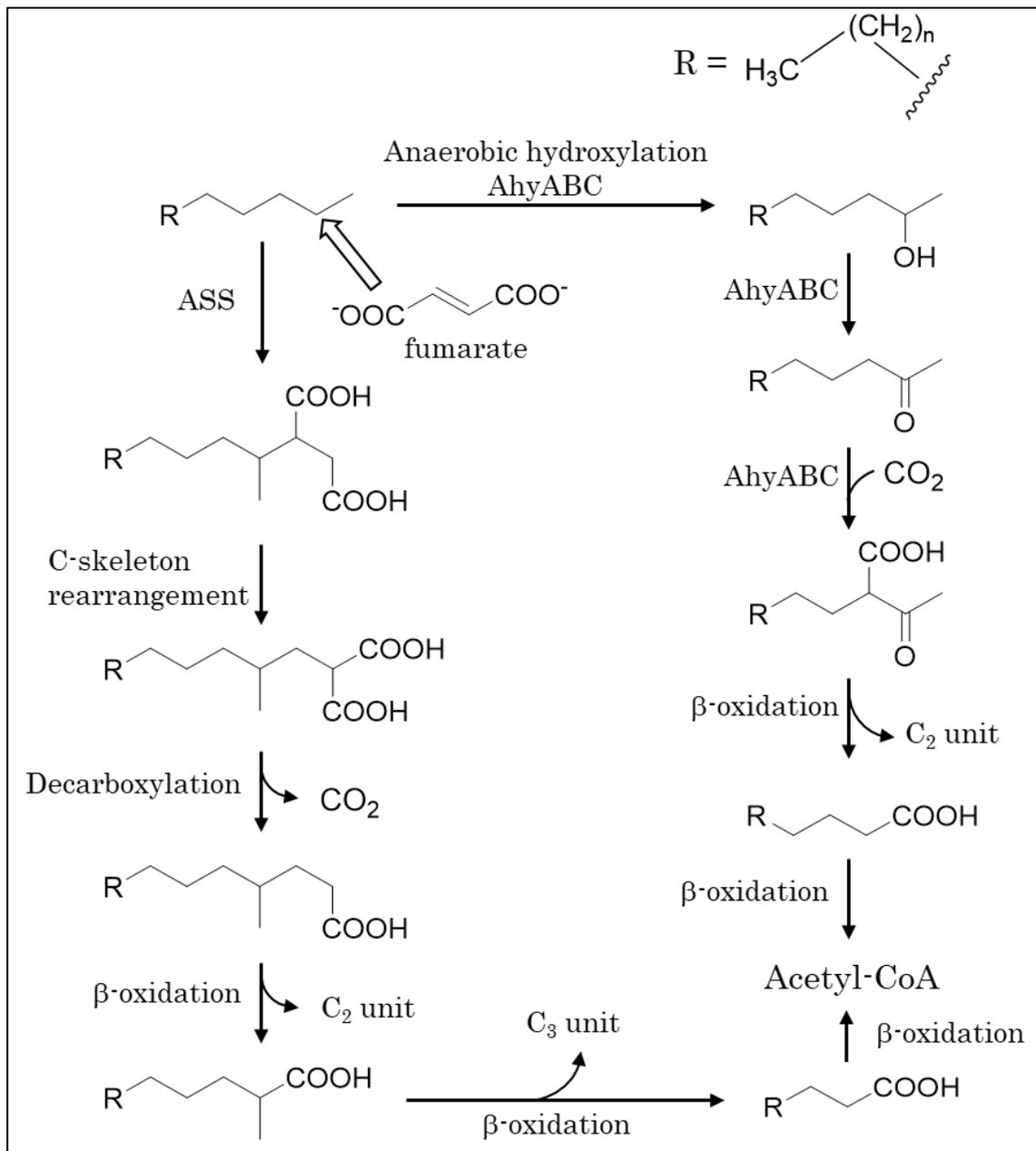


図 2 | 嫌気的アルカン分解経路、フマル酸付加経路と嫌気的水酸化経路の 2 つが報告されている。ASS; アルキルコハク酸シンターゼ AhyABC; 嫌気性アルカンヒドロキシラーゼ

・好気条件下でのアルカン分解

好気的なアルカンの分解は、アルカンへの酸素添加反応から開始される (図 3)。

Alcanivorax 属、*Pseudomonas* 属、*Rhodococcus* 属などが好気性アルカン分解菌として知られており^[24]、海洋から土壌中まで様々な場所で生育している。これらの微生物に加えて、*Methylococcus capsulatus* はメタンを栄養源に生育するメタン資化性菌として知られている^[25]。

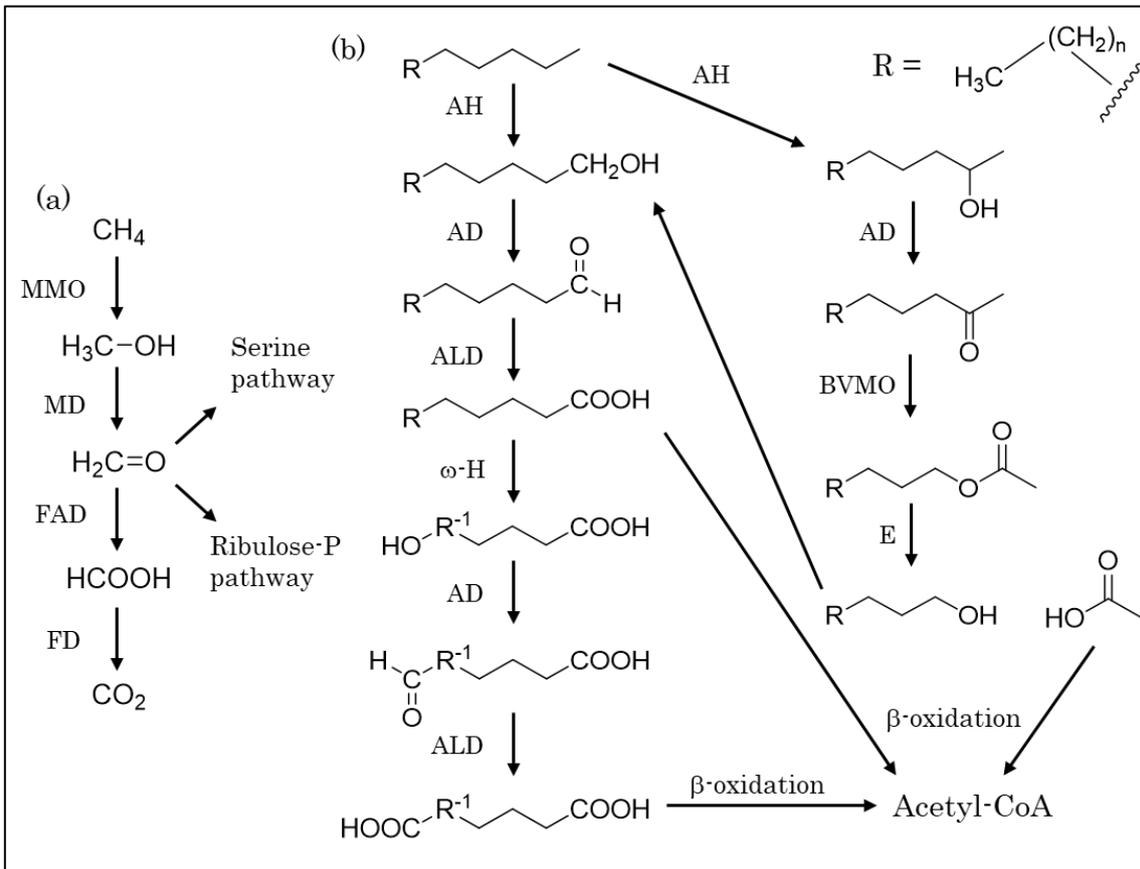


図 3 | (a) メタン分解経路、メタンは二酸化炭素まで逐次酸化されることで分解される。経路途中のホルムアルデヒドはセリン経路またはリブローズリン酸経路に用いられる。**MMO**; メタンモノオキシゲナーゼ、**MD**; メタノールデヒドロゲナーゼ、**FAD**; ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ、**FD**; ギ酸デヒドロゲナーゼ (b) 好気的アルカン分解経路、1 級または 2 級アルコールが生成する反応から分解が始まる。**AH**; アルカンヒドロキシラーゼ、**AD**; アルコールデヒドロゲナーゼ、**ALD**; アルデヒドデヒドロゲナーゼ、 **ω -H**; ω -ヒドロキシラーゼ、**BVMO**; Baeyer-Villiger モノオキシゲナーゼ、**E**; エステラーゼ

・メタン分解経路 (図 3a)

メタン資化性菌 *Methylococcus capsulatus* は、メタンモノオキシゲナーゼ (MMO) によりアルカンの中で最も安定なメタンを水酸化し、メタノールに変換する。メタノールはメタノールデヒドロゲナーゼにより酸化されホルムアルデヒドへと変換される。このホルム

アルデヒドは酸化されギ酸、二酸化炭素に変換、または、セリン経路やリブ羅斯-リン酸経路の炭素同化に利用される^[26]。

・直鎖状アルカンの分解経路 (図 3b)

細胞内に取り込まれた直鎖状アルカンは、アルカンヒドロキシラーゼによって末端炭素または C2 位が水酸化される。アルカンの末端炭素が水酸化された 1 級アルコールは、アルコールデヒドロゲナーゼ (AD) とアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALD) によって逐次酸化されアルデヒド、カルボン酸へと変換され、続いてβ酸化によりアセチル CoA に分解される^[27]。アルカンがカルボン酸まで変換された後、このカルボン酸の末端炭素がω-ヒドロキシラーゼによって水酸化される経路がある^[28]。ω-ヒドロキシカルボン酸は AD と ALD によってジカルボン酸まで酸化される。ジカルボン酸はβ酸化によりアセチル CoA に分解される。

緑膿菌^[29]や、*Gordonia* sp. TY-5 株^[30]などはアルカンの C2 位を水酸化し 2 級アルコールを生成することが知られている。2 級アルコールは、AD によって酸化されケトンに変換される。このケトンは、有機化学反応のひとつである Baeyer-Villiger 酸化を触媒する、Baeyer-Villiger モノオキシゲナーゼによってエステルへと変換される^[31]。エステルはエステラーゼによって酢酸とアルコールに分解され、酢酸は CoA が付加されアセチル CoA に、アルコールはカルボン酸まで酸化されたあとβ酸化を受けることで分解される。

好气的アルカン分解経路に関わる酵素の内、AD と ALD はアルカン分解菌以外の微生物にも普遍的に存在する酵素である。つまり、アルカン分解経路において最も重要となる酵素が、化学的に非常に困難なアルカンの水酸化を触媒する AH である。一般的にアルカンの C-H 結合を酸化するには高温・高压条件を必要とする。更に直鎖状アルカンの、ある特定の炭素だけを酸化することは化学的に困難である。そのため、これらの酵素は生物学、有機化学のどちらの分野においても重要で興味深い酵素であると言える。AH は複数種報告されており、機能解析だけでなく工業的な利用を目指した研究が多くなされている。

2-2. メタンモノオキシゲナーゼ (MMO)

MMO はメタン資化性菌が持つ酵素で、メタン分解経路の初発反応を触媒する。*Methylococcus capsulatus* は、膜貫通型の粒子状 MMO (pMMO) と可溶性 MMO (sMMO) の 2 種の MMO を有する。sMMO は炭素数 1-8 のアルカンを含む幅広い基質特異性を持ち^[32]、pMMO は炭素数 5 以下のアルカンまたはアルケンの C2 位特異的な酸化を触媒するこ

とが報告されている^[33]。これら 2 つの MMO は *M. capsulatus* が生育する培地中の銅イオンの濃度で発現の有無が決まり、銅イオンの濃度が高い場合は pMMO が発現し、低濃度条件下では sMMO が発現することが報告されている^{[34] [35]}。これは pMMO が銅イオンを活性中心に持つ金属酵素^[36]であり、銅イオンが結合する調節因子によって転写が制御される^[37]ことに起因すると考えられている。更に、銅イオン存在下では sMMO の活性が阻害される^[38]ことも報告されていることから、メタン分解には銅イオンが密接に関連していると言える。

膜貫通型の pMMO の結晶構造は 2005 年に初めて報告された (図 4)^[39]。pMMO は pmoB、pmoA^[40]、pmoC^[41] の 3 つのサブユニットが会合してプロトマーを形成し、そのプロトマーが三量体を形成していた。この構造から 1-3 個の銅イオン及び亜鉛イオンの結合部位が発見されたが、近年、量子力学計算を用いた構造精密化^[42]や生化学・分光学的実験^[43]から pMMO 中の銅イオンは単核で機能することが示唆された。しかしこの結果も、pMMO はプロトマー 1 分子中に 12-15 個の銅イオンが存在する、ICP-MS 測定の結果^[44]と矛盾していた。

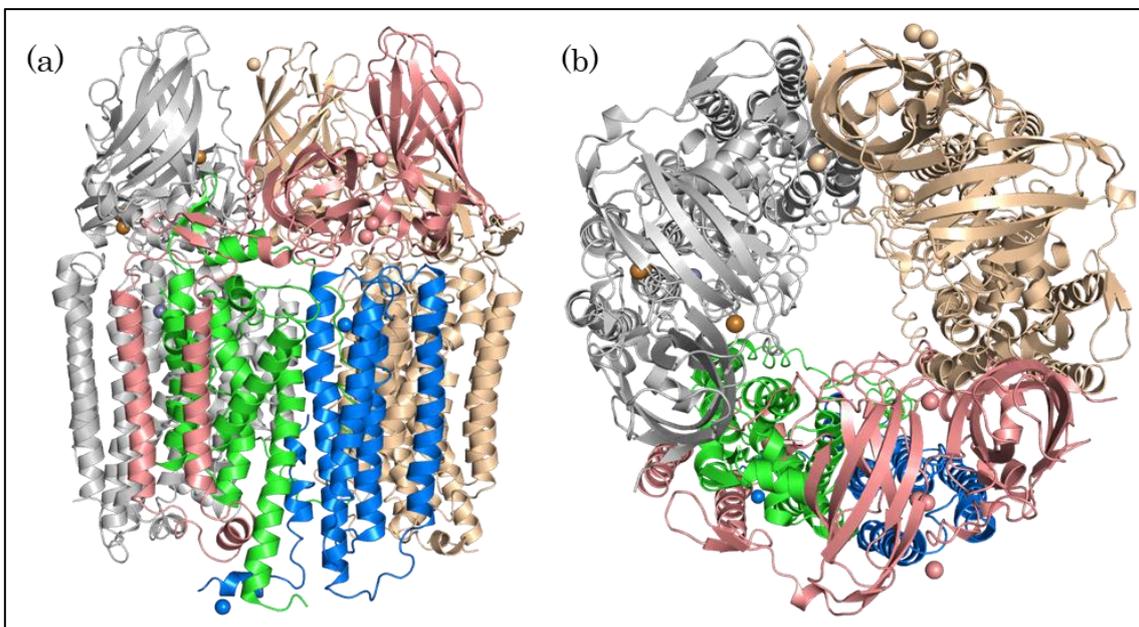


図 4 | 膜貫通型メタンモノオキシゲナーゼ (pMMO) の結晶構造 (PDB ID: 1YEW)
グレーとベージュの分子は三量体を形成する他 2 分子を示す。ピンクが pmoB、緑が pmoA、青が pmoC を示す。(a) 細胞膜と平行方向から見た全体構造 (b) 垂直方向から見た三量体構造

pMMO の結晶構造からは、活性部位の特定には至らなかった。しかし最近、pMMO の Cryo-EM による構造決定がなされ、新たな銅イオン結合部位が明らかとなった (図 5)^[45]。pmoA と pmoC の界面に存在する銅イオン結合部位 (D site) 周辺に存在する残基がメタン資化性菌に保存されており^[46]、D site を形成するペプチドと銅 3 分子が複合体を形成しメタンの酸化反応を触媒する^[47]ことから、D site が活性部位であると推定された。また、pmoB はニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) などの電子供与体から二電子還元を受けた後、酸素分子を活性化し過酸化水素に変換することが知られている^[48]。これらの報告から、三核銅クラスターを活性中心とする pMMO の反応機構が推定された (図 5a)。更に、活性部位近傍に酸素または基質の結合部位と考えられる空洞が確認された (図 5b)。しかしながら、構造からは pMMO の基質特異性や位置特異的な反応機構は明らかになっていない。

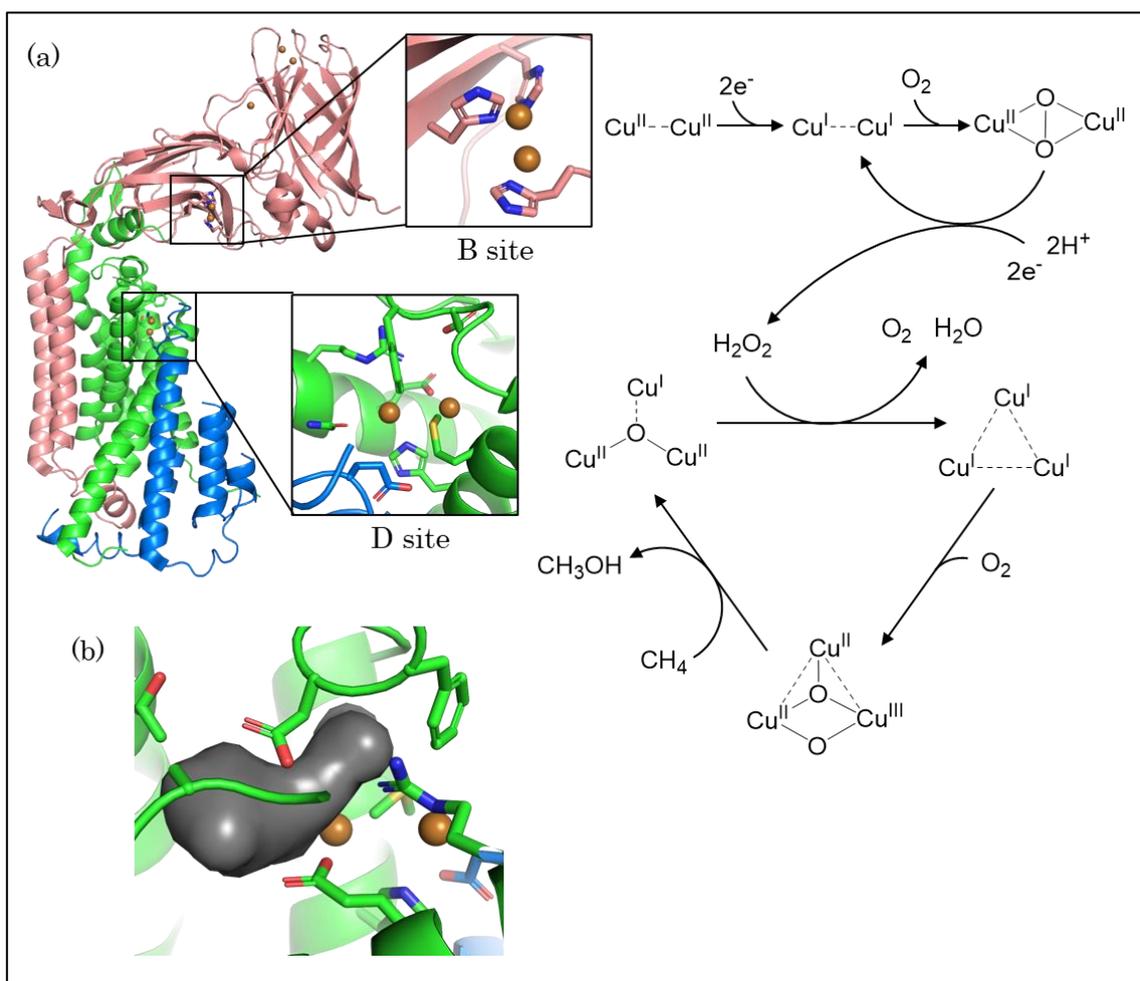


図 5 | pMMO のクライオ電子顕微鏡構造 (PDB ID: 7EV9) (a) pMMO ヘテロマーの構造と反応に関わる銅イオン結合部位と推定された反応機構 (b) 酸素または基質の結合部位と考えられる銅イオン結合部位近傍に存在する空洞

sMMO は、二核非ヘム鉄を有しメタンなどの基質を酸化する MMOH、補因子に FAD と [2Fe-2S] を持つ還元酵素の MMOR、調節タンパク質の MMOB の 3 つの要素から構成される複雑な酵素である^[49]。sMMO は可溶性であることやアルカン以外の化合物も酸化する^[32]ことから工業への応用が期待されている。そのため pMMO よりも研究が盛んであり、1993 年に初めて MMOH の結晶構造が報告された (図 6)^[50]。MMOH は $\alpha\beta\gamma$ の 3 つのサブユニットが会合したヘテロマーを形成し、そのヘテロマーが二量体化した構造をとる (図 6a)。この結晶構造から、活性中心の二核の非ヘム鉄は MMOH の α サブユニットに存在することが確認された (図 6b)。

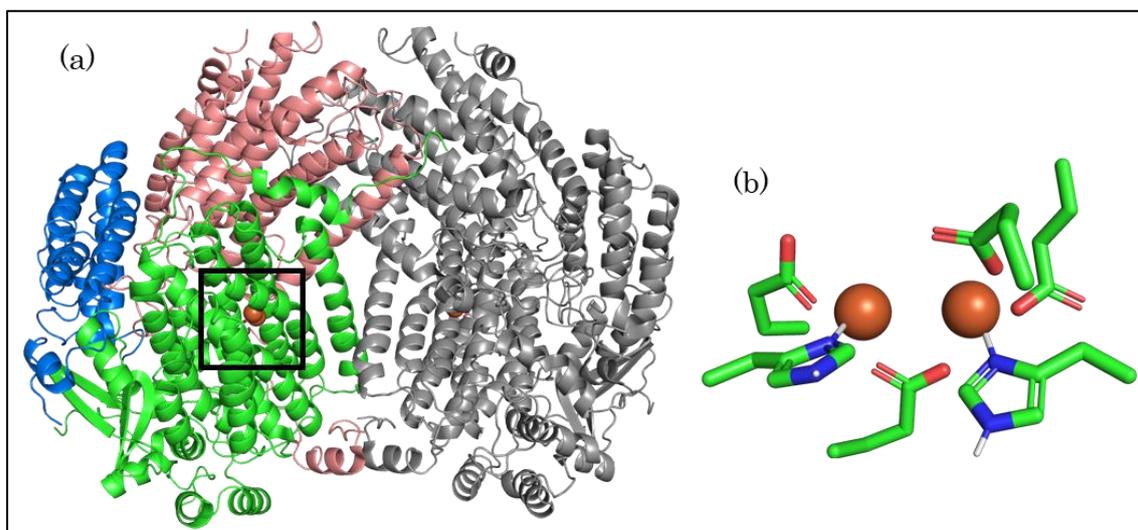


図 6 | 可溶性メタンモノオキシゲナーゼ (sMMO) の結晶構造 (PDB ID: 1MMO)
 (a) sMMO の全体構造、緑: α サブユニット、ピンク: β サブユニット、青: γ サブユニット
 (b) α サブユニットに存在する活性中心の二核非ヘム鉄、(a) の黒枠の拡大図

立体構造及びストップフロー分光法^[51]、メスバウアー分光法^[52]、共鳴ラマン分光法^[53]により二核非ヘム鉄がとりうる中間体と sMMO の反応サイクルが推定された (図 7^[46])。sMMO の反応は、MMOR が電子供与体の NADH 由来の電子を MMOH へ伝達し、活性中心の二核非ヘム鉄が還元されることで開始する。この反応は図 7a の H_{ox} から H_{red} の経路に相当する。鉄原子が還元された後に、MMOR からの過剰な電子供給を防ぐために調節タンパク質 MMOB が MMOH に結合する^[54]。還元された鉄原子に酸素が結合し、2 つの鉄原子間を酸素が架橋したペルオキシ中間体 (H_{peroxo}) をとる。このペルオキシ中間体は基質アルカンの存在下で、二酸素原子架橋した高原子価鉄-オキシ中間体 Q (図 7b) へ変化する。高原子価鉄-オキシ中間体 Q の酸素原子による基質アルカンの水素原子の引き抜きから、酸素添加反応が開始される。この反応は DFT 計算により、基質アルカンから完全に水素原子が引き抜かれてラジカルが発生する経路と、水素原子が引き抜かれる際に炭素原子が酸素原子と結合したまま進行してラジカルが発生しない経路の 2 つが推定されている^[55]。基質アルカンへの酸素添加反応の後、水分子が鉄原子に結合することで反応前の酸化状態の H_{ox} に戻る。また、sMMO はアルケンを基質にした場合、水酸化ではなくエポキシ化することが報告されている^[56]。ストップフローの解析により、この反応は高原子価鉄-オキシ中間体 Q ではなくペルオキシ種が活性種であると推定された^[57]。

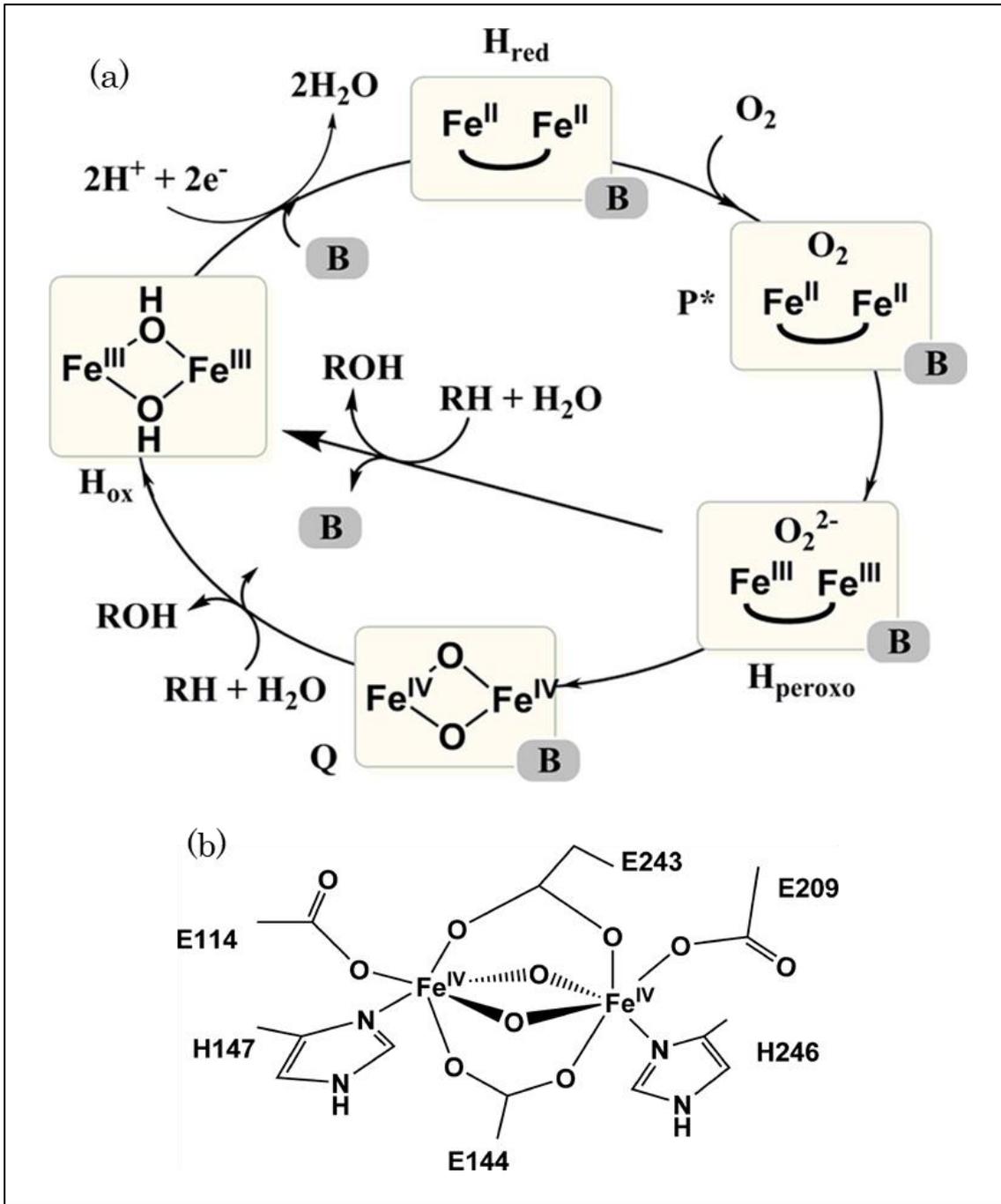


図 7 | sMMO の反応サイクル (a) 反応サイクルと二核非ヘム鉄がとりうる中間体、図中の B は調節タンパク質 MMOB を示す。(b) アルカンの水酸化を触媒する高原子価鉄-オキソ中間体 Q の構造 [46]より引用

メタン酸化細菌が有する MMO は不活性なメタンを酸化する数少ない酵素であるため、工業への応用が非常に注目されている。メタンは地球上に豊富に存在し安価であることから、燃料や化合物の原料として広く用いられているが、常温常圧下では気体として存在する

ため取り扱いが危険で輸送にも手間がかかるため、結果として使用コストが高くなっている。そのため、メタンガスを液体燃料に変換する **Gas to Liquids (GTL)** が注目を集めており、2-1.で述べた合成ガスの製造も **GTL** に含まれる。**GTL** は合成ガスを原料としたフィッシャー・トロボシュ法 (**FT 法**) によって行われるが、**FT 法** による液体燃料の合成は、大規模なプラントを必要とするだけでなく、反応時にエネルギーを多量に使用する問題がある。そのため、**FT 法** の代わりに **MMO** を有するメタン資化性菌を触媒として用いる **Bio-GTL** が注目されているが実現には至っていない。また、メタン資化性菌の応用として、メタンを出発原料とした物質生産も注目を集めている。これまでに、メタノール^[58]、L-乳酸^[59]、アスタキサンチン^[60]など様々な化合物がメタン資化性菌によって生産されている。しかしながらいずれの化合物も実用化には至っていない。これらの研究が実用化に至っていない原因として、実用的な大腸菌や枯草菌などと比較してメタン資化性菌の代謝経路の理解が進んでいないことや、倍加時間が長いことが挙げられる。これらの問題を解決するために、**MMO** の異種発現が取り組まれており、2017 年に **sMMO** を大腸菌に異種発現することでメタンをメタノール変換に成功し、特許が取得されている^[61]。実用化が少しずつ近づいてきているが、**sMMO** は銅イオン存在下で反応が阻害されることや、メタンをはじめとする基質アルカンの低い溶解度のために反応効率が低くなることが問題になると懸念される。

2-3. シトクロム P450 (P450, CYP)

シトクロム P450 (P450, CYP) は大腸菌など一部の微生物を除いた多くの生物種で発見されており、活性中心の鉄-ポルフィリン錯体のへムを介して様々な酸化反応を触媒する金属酵素である。P450 は発現場所によって、可溶性型、マイクロソーム型、ミトコンドリア型の 3 種に分類され、中でもマイクロソーム型とミトコンドリア型は、まとめて膜結合型と分類されている。どの P450 においても反応を触媒するために、活性中心のへム鉄を還元する電子を必要とする。この電子の供給は生物種によって異なり、微生物では $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ を補因子に持つ鉄硫黄タンパク質と FAD を補因子に持つ還元酵素によって電子伝達する系^[62]が、真核生物ではシトクロム P450 還元酵素が電子伝達する系^[63]が一般的に知られている。これまでに非常に多くの P450 が発見されて様々な研究が行われており、詳細な反応サイクルも

明らかになっている (図 8)[64]。

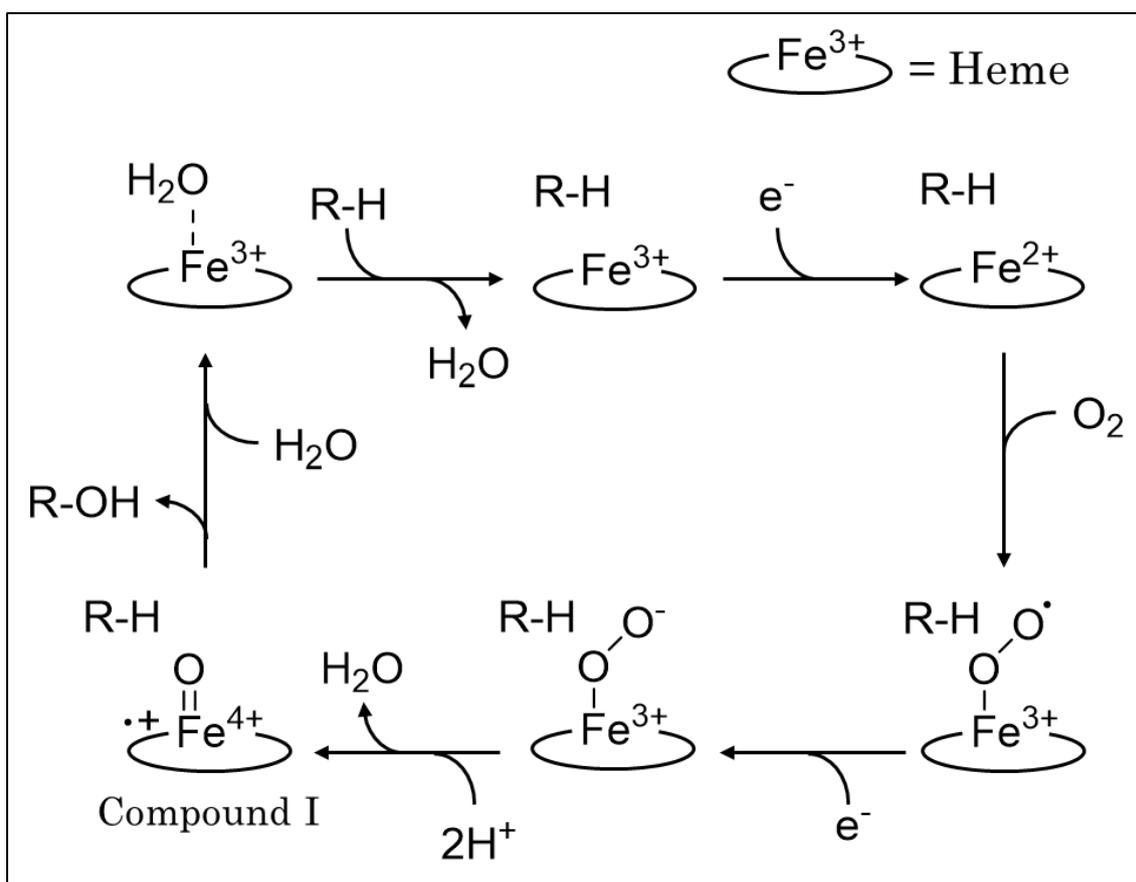


図 8 | P450 の酸素添加反応のサイクル R·H は基質、R·OH は生成物を示す。

P450 のへム鉄には水分子が配位しており、基質が結合することでこの水分子が離脱する。電子伝達タンパク質により NADH または NADPH から電子がへム鉄に供給され一電子還元される。還元状態のへム鉄に酸素分子が配位しオキシ中間体を形成した後、電子伝達タンパク質によって再度、一電子還元されペルオキシ中間体を形成する。ペルオキシ中間体は、プロトンを受け取り水分子と Compound I と呼ばれるオキソフェリルポルフィリン π -カチオンラジカルを形成する。Compound I が酸化活性種として働くことで、基質から水素を引き抜いて基質ラジカルとヒドロキソ中間体が生成され、ヒドロキソ中間体が基質ラジカルにリバウンドし、基質への酸素添加が起こる。生成物がへム周辺から離脱した後、溶媒の水分子がへム鉄に配位することで最初の状態へと戻り反応が終了する。

P450 は図 8 に示すように、一般的に基質の C-H 結合の間に酸素原子を添加する反応を触媒するが、アルカンを基質として認識し酸素添加を行う P450 は、ごくわずかししか知られ

ていない。*Mycobacterium* 属や *Acinetobacter* 属に見られる CYP153 ファミリーは炭素数 4-16 の直鎖状アルカンの末端炭素を位置特異的に水酸化する可溶性型 P450 として報告されている^{[65][66]}。また、*Candida tropicalis* は直鎖状アルカンを炭素源に生育した場合 α , ω -ジカルボン酸を生産することが知られている^[67]。これは、マイクロソーム型 P450 である CYP52 が、炭素数 10-16 の直鎖状アルカンの両末端と脂肪酸の末端炭素を水酸化することで生産されている^[63]。これらの P450 は近年発見されたため、応用に向けた研究は不十分である。

P450 の中でも応用に向けた研究がよく進められているのが *Pseudomonas putida* 由来の P450cam と *Bacillus megaterium* 由来の P450BM3 である。これらはいずれも可溶性型 P450 で取り扱いが簡便であるだけでなく、特に P450BM3 は P450 の中でも非常に酵素活性が高いため、触媒として工業的に利用することが期待されている。しかし、これらの P450 はアルカンを基質としないため、構造情報を基にした蛋白質工学により基質特異性を改変する研究が精力的に行われてきた。

P450cam は最初に結晶構造が明らかにされた P450 であり、ショウノウを基質とする(図 9)^[68]。Wong らの研究グループは P450cam の基質結合ポケット周辺に存在するアミノ酸残基に対して部位特異的変異導入を行った。P450cam の基質結合ポケットは疎水性アミノ酸で覆われているが、一部極性を持つアミノ酸が存在する(図 9b)。基質のショウノウとヘム鉄に最も近く、極性を持つ Y96 をフェニルアラニンに置換した Y96F 変異体は炭素数 5-7 のアルカンを水酸化することが明らかとなった^[69]。更に、Y96F の変異に加えて、Y96 の近くに存在する V247 をロイシンに置換して基質結合ポケットを狭めた Y96F/V247L 二重変異体は、ヘキサン水酸化活性が大幅に向上した^[70]。これらの変異に加えて、よりヘム鉄に近い位置に存在する F87, T101, L244, V247, D297 に基質結合ポケットを狭めるように変異を導入した結果、この変異体 P450cam はガス状アルカンのブタンとプロパンの水酸化反応を触媒した^[71]。生成物はどちらも 2 位の炭素が水酸化された 2-アルコールであった。更に、ヘム鉄の配位子である C357 の隣に存在する L358 をプロリンに変異させることでヘムが基質側に少し押し上げられることが報告され^[72]、この L358P 変異と基質結合ポケットを埋める変異を加えた、新たな変異体 P450cam が作製された。この変異体 P450cam はプロパンの水酸化活性を向上させただけでなく、エタンの水酸化も触媒した^[73]。

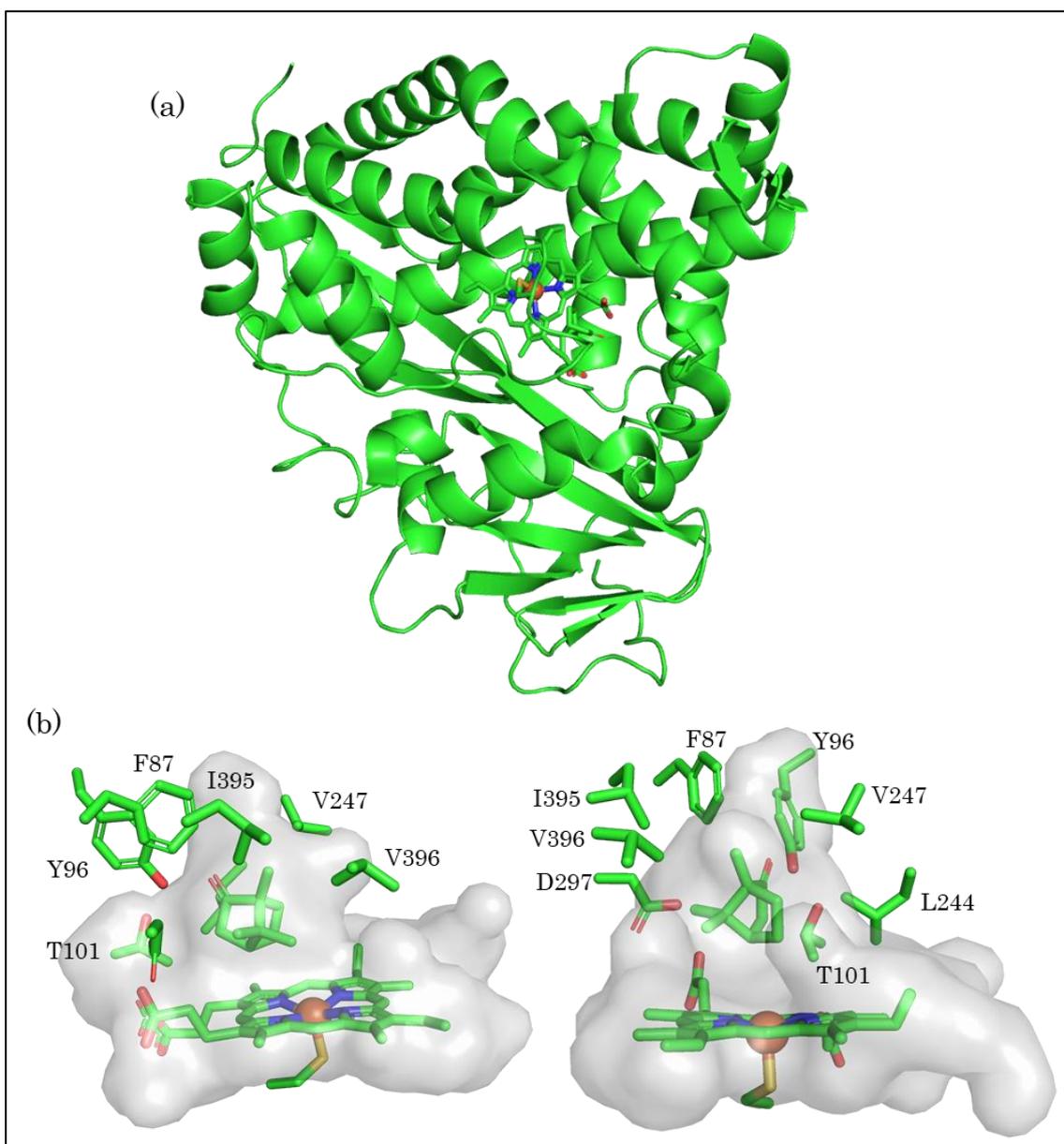


図 9 | P450cam の全体構造と基質結合ポケット (PDB ID: 2CCP) (a) P450cam の全体構造、中心にスティックモデルで示したヘム鉄が結合している。鉄原子は球体モデルで示した。(b) P450cam の基質結合ポケットと周辺に存在するアミノ酸残基。ヘム鉄の上部にスティックモデルで示したショウノウが存在する。

もう一方の P450BM3 は炭素数 12-20 の脂肪酸の C2 位水酸化反応を触媒する^[74]。P450BM3 の大きな特徴は、反応に必要な電子供給に関わる還元酵素が融合して 1 つのタンパク質になっていることである^[74]。P450BM3 の酵素活性が他の P450 より高い要因として、還元酵素が融合しているため常にヘム鉄の近くに還元酵素が配置されており、効率よく電子伝達が行われるためであると考えられている。Arnold らは、P450BM3 に対してラン

ダム変異導入を行い、ブタン及びプロパンを水酸化する変異体 P450BM3 を作製した (図 10a)^[75]。この変異体は 11 箇所に変異が導入されていたが、その内、基質の結合に関与するアミノ酸残基の変異は 1 箇所だけであった。そこで、Arnold らは *N*-palmitoyl glycine 結合型 P450BM3 の結晶構造^[76]を参考に、基質と活性部位の周辺に存在するアミノ酸 (図 10b) に対して網羅的に飽和突然変異導入を行い、エタンを水酸化する P450BM3 変異体を作製した^{[77][78]}。これらの変異は、基質結合ポケットを埋めるようにアミノ酸側鎖を嵩高くするものが多数存在していた。

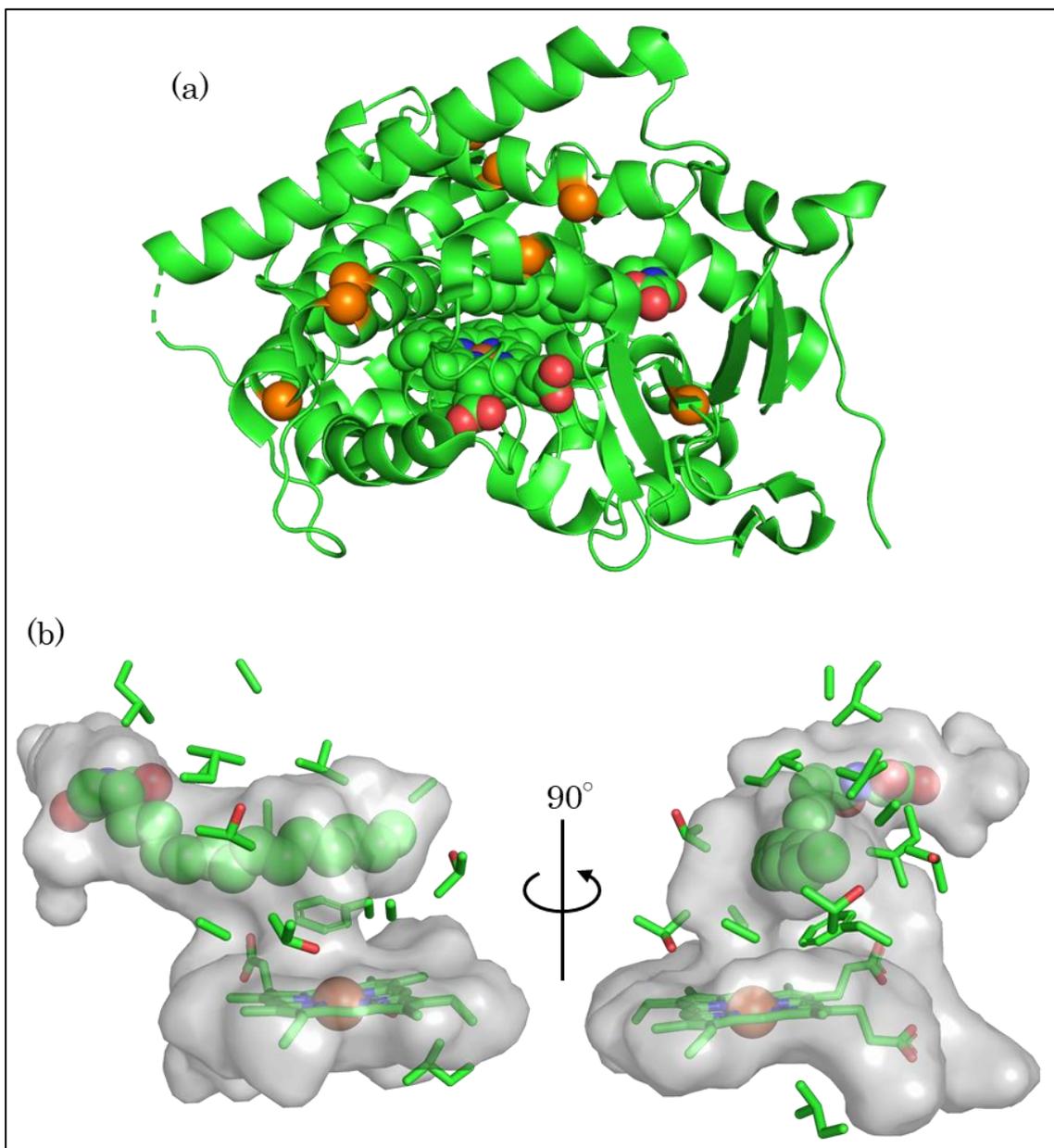


図 10 | P450BM3 の全体構造と基質結合ポケット (PDB ID: 1JPZ) (a) P450BM3 の全体構造、ヘムと *N*-palmitoyl glycine は球体モデルで示した。構造中のオレンジ色の球体モデルはランダム変異導入されたアミノ酸残基の α 炭素を示す。(b) P450BM3 の基質結合ポケットと周辺のアミノ酸残基

P450cam 及び P450BM3 でガス状アルカンを水酸化する試みは、どちらも立体構造の情報に基づいて変異導入を行い、基質結合ポケットを小さくすることで達成している。近年、P450BM3 を用いて、変異導入せずに基質特異性を変化させる研究が行われている。P450 の反応は一般的に基質の結合をトリガーとしており、そのトリガーとして機能しない化合

物は酸化されることはない。名古屋大学の庄司らは、P450BM3 の基質の構造とよく似ているが酸化されることがない、デコイ分子と名付けられた疑似基質を用いて P450BM3 の反応を強制的に開始させ、本来の基質ではない化合物を酸化するシステムを考案した。脂肪酸の C-H 結合を全て安定な C-F 結合に置換したパーフルオロカルボン酸をデコイ分子として用いることで、野生型 P450BM3 がプロパンやブタン、シクロヘキサンを水酸化できることが報告された^[79]。このデコイ分子のカルボン酸にアミノ酸を付加した、パーフルオロノナノイル-L-トリプトファンが結合した P450BM3 の結晶構造が決定された^[80]。この構造から、デコイ分子が基質結合ポケットの大部分を埋めており、ヘムの上部だけに小さな空間があることが判明した (図 11)。つまり、デコイ分子が反応開始のトリガーとなるだけでなく、基質結合ポケットを埋める働きをすることで、低級アルカンが酸化されるまで結合し続けることができるようになったため、低級アルカンの水酸化が生じたと考えられる。

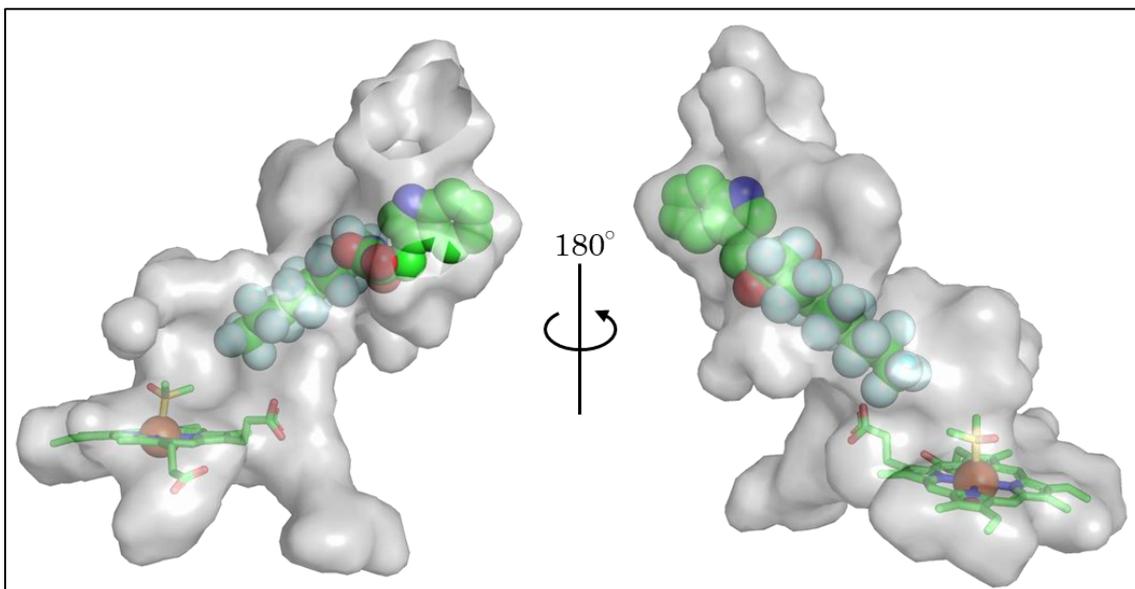


図 11 | パーフルオロノナノイル-L-トリプトファン結合型 P450BM の基質結合ポケット (PDB ID: 3WSP) 球体モデルはパーフルオロノナノイル-L-トリプトファンを示す。この構造ではヘム鉄にジメチルスルホキシド (DMSO) が配位していた。

またこの構造より、デコイ分子の末端炭素がヘム鉄から十分に離れていることが分かり、脂肪酸のフッ素化をしていなくても酸化されないことが示唆された。この結果から、脂肪酸のカルボキシ基をアミノ酸で修飾した新たなデコイ分子が多数開発され、これらはパーフルオロカルボン酸より高い水酸化活性を引き出すデコイ分子であった^[81]。

更に、デコイ分子を用いることで P450BM3 が低級アルカンだけでなく、ベンゼンを水酸化しフェノールを生産できることが明らかとなった^[82]。現在、フェノールの工業的生産

法はベンゼンとプロピレンを原料に合成するクメン法である。クメン法は高温高压条件を必要とするだけでなく、大量の副生成物が合成されてしまう問題点がある。そのため、ベンゼンからフェノールへの酸化反応は注目を集めており、特にこのような温和な条件下で反応を進行可能な酵素による合成法は非常に有用である。しかし、P450BM3は反応に電子を必要とし、その電子は NADPH から供給されているが、NADPH は高価であるため、P450BM3 を工業的に実用化する上でコスト面の問題が生じることが懸念されていた。そこで荳司らは、P450BM を発現させた大腸菌を用いた、ベンゼンからフェノールを合成するシステムを構築した^[83]。大腸菌はグルコースを使った NADPH 生産が可能であるため、コストを低く抑えることが可能である。大腸菌を生育する培地にデコイ分子とベンゼンを添加することで、フェノールを収率約 60% で得ることに成功していた。これは、アルカン水酸化酵素の工業的実用化に向けた大きな成果であり、今後更なる研究が期待される。

2-4. 長鎖アルカンモノオキシゲナーゼ LadA

好熱菌 *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 は長鎖アルカン (C₁₅-C₃₆) の分解をすることが知られている^[84]。長鎖アルカンの分解は、他と同様にアルカンの末端炭素の水酸化を初発反応として開始される。2008 年に、*G. thermodenitrificans* NG80-2 由来の長鎖アルカン水酸化酵素 LadA の結晶構造が報告された (図 12)^[85]。LadA の結晶構造はホモ二量体構造を形成しており、LadA が溶液中で二量体である結果と一致していた。二量体の界面近くに存在するシステインをアラニンに変異させた LadA は二量体化できず、酵素活性も失われることが明らかとなった。また、LadA の基質結合ポケットと思われる位置にフラビンモノヌクレオチド (FMN) が結合していた (図 12b)。この構造に対して長鎖アルカン (C₁₅-22) のドッキングシミュレーションが行われ、その結果、どのアルカンを用いた場合でも末端炭素が FMN の C4a 原子の近くに配置されていた。酸化型 FMN は二電子還元を受けて還元型 FMN に構造変化する。還元型 FMN は複数の共鳴構造を取ることができ、その内の 1 つに C4a カルボアニオンを持つ構造がある。これに酸素が反応することで C4a-ヒドロペルオキシフラビン中間体が形成される (図 12c)。この中間体がアルカンの水酸化に関与すると推定されている。しかしながら、NADPH から LadA への電子伝達経路や、アルカンへの酸素添加メカニズムなどは未だに明らかになっていない。

また、LadA は P450 と同様に変異体解析が行われている。Dong らは LadA にランダム変異導入を行い、ヘキサデカン (C₁₆) の水酸化活性が高い変異体を作製した^[86]。この変異体は二重変異が導入されており、どちらの変異も基質結合ポケット付近でないにもかかわらず、ヘキサデカン水酸化活性が向上しただけでなく、熱安定性が大幅に向上した。この結

果は、数か所の変異導入による、わずかな構造変化だけで活性や安定性を向上させることができる可能性を示した。

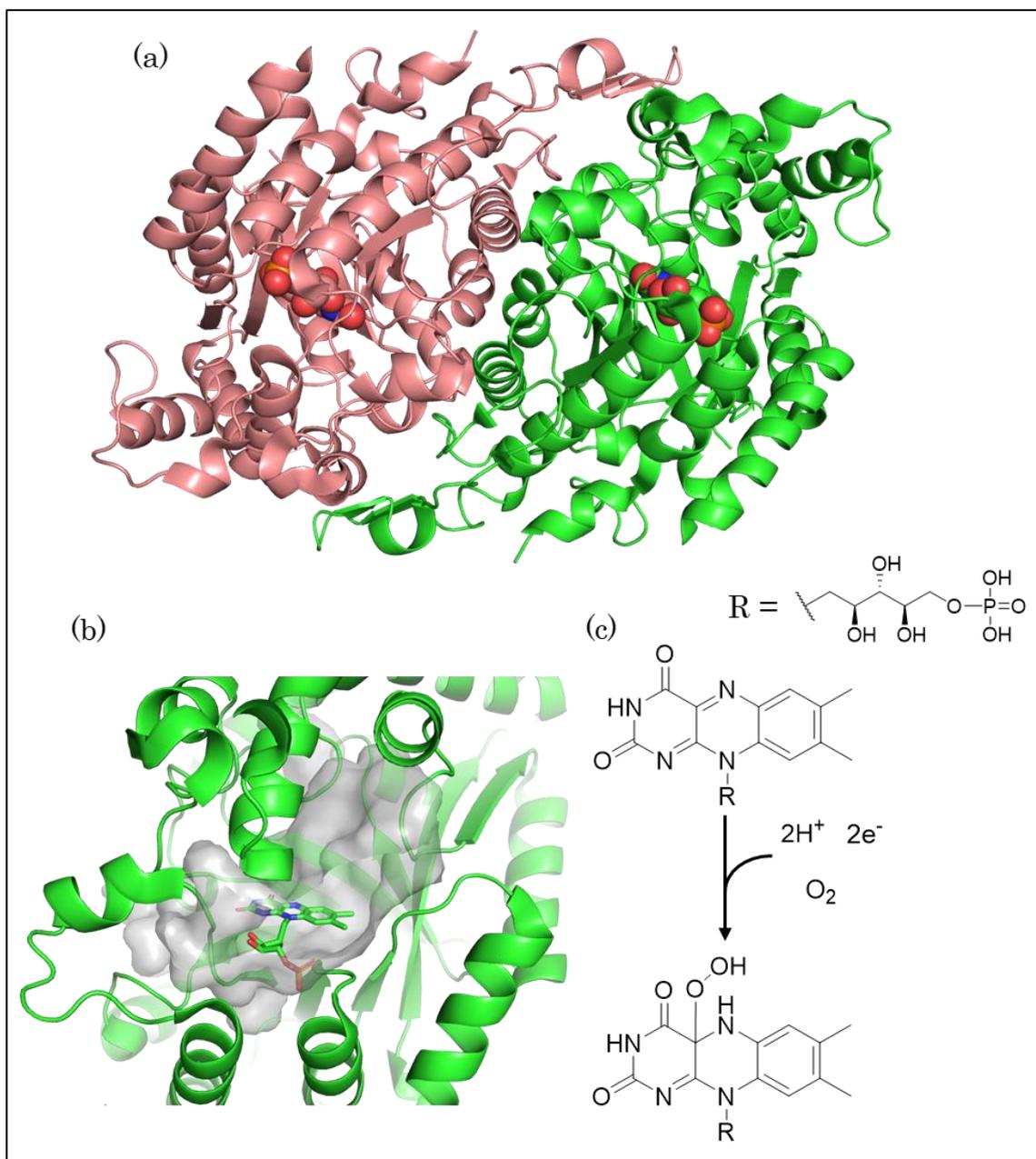


図 12 | FMN 結合型 LadA の結晶構造 (PDB ID: 3B90) (a) LadA の全体構造、ホモ二量体を形成し、単量体はTIMバレル構造をとる。球体モデルはFMNを示す。(b) LadAの基質結合ポケット、他のアルカン水酸化酵素と異なり巨大な空洞が存在していた。(c) 酸化型FMNとC4a-ヒドロペルオキシフラビンの構造、FMNは二電子還元された後、酸素と反応しC4a-ヒドロペルオキシフラビン中間体を形成する。

2-5. アルカンモノオキシゲナーゼ AlkB

アルカンモノオキシゲナーゼ AlkB は、最も研究されている *Pseudomonas putida* GPo1 が有するアルカン分解経路の初発反応を担うアルカン水酸化酵素である^[87]。*P. putida* GPo1 は炭素数 5-12 の直鎖状アルカンを分解することができ、アルカン分解に関わる酵素群の遺伝子を OCT と名付けられたプラスミド上に持つことが知られている (図 13)^[88]。そのプラスミド上に *alkBFGHJKL* 及び *alkST* の 2 つの遺伝子群があり、これらがアルカン分解に関わる酵素群をコードしている^{[88][89]}。これらの遺伝子群は転写因子の AlkS によって発現が制御されている。AlkS は、アルカン以外の炭素源が存在する場合には誘導を抑制し、アルカン存在下でのみ *alkBFGHJK* 及び *alkST* の発現を誘導する (図 13a)^[90]。アルカン分解に関わる酵素群が発現した後、アルカントランスポーターと考えられる AlkL^[91]によってアルカンが細胞内に取り込まれ、AlkBGT の 3 つの要素で構成されるアルカンヒドロキシラーゼシステムによってアルカンが水酸化されアルコールが生成される。このアルコールは AlkJ と AlkH によって逐次酸化されカルボン酸に変換される。このカルボン酸はアシル CoA シンターゼの AlkK によって CoA が付加された後、 β 酸化によってアセチル CoA まで分解される (図 13b)。

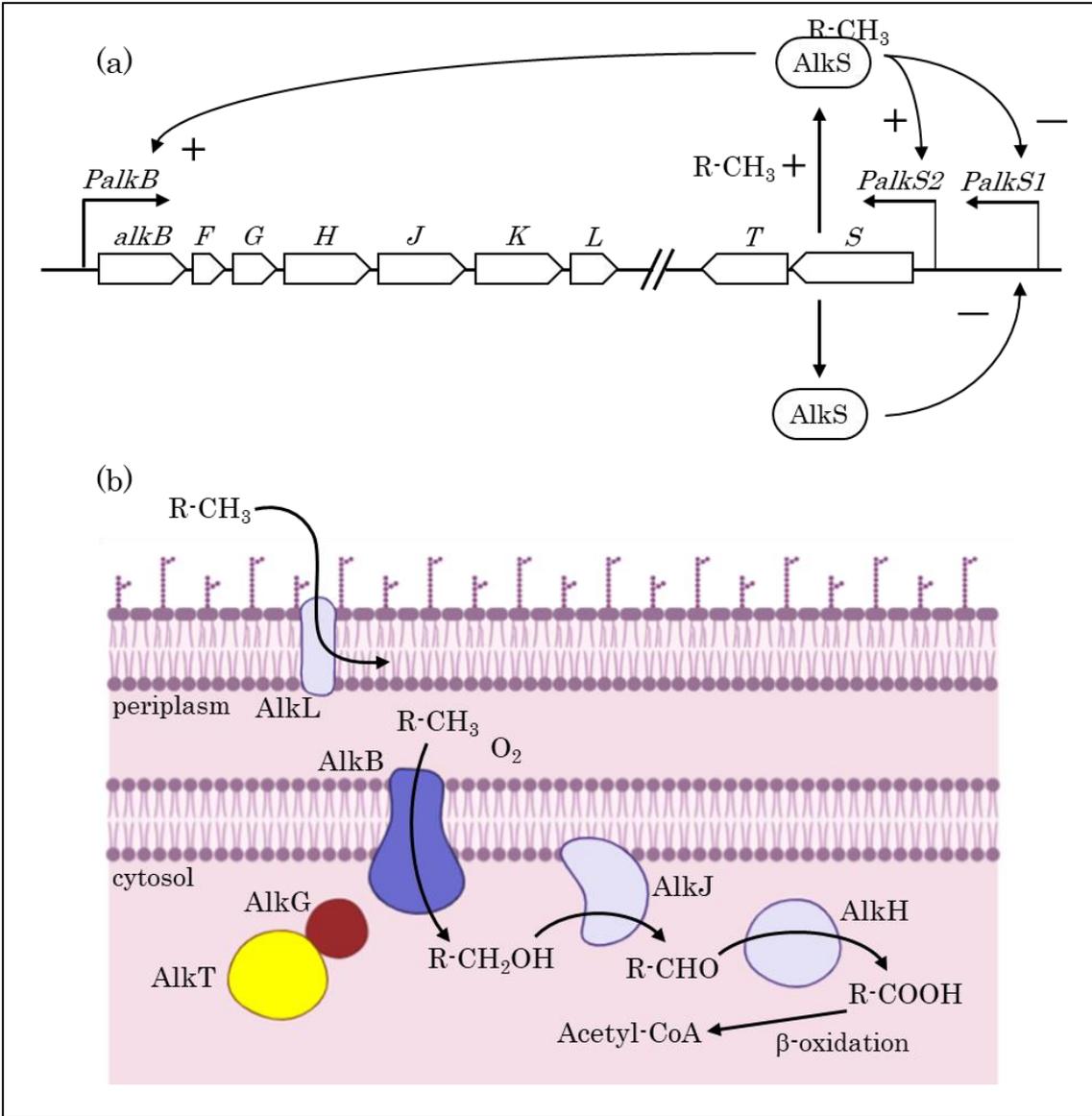


図 13 | *P. putida* GPo1 がアルカン分解に関わる酵素の遺伝子群とアルカン分解経路

(a) OCT プラスミド上に存在する遺伝子群、*alkBFGHJKL* と *alkST* の 2 つのクラスターで構成されており、転写因子の AlkS によって発現が制御されている。*PalkB*, *S1*, *S2* はプロモーターを示す。(b) アルカン分解経路、 $R-CH_3$ は直鎖状アルカンを示す。各酵素は(a)の遺伝子名と対応する。AlkL: アルカントランスポーター、AlkB: アルカンモノオキシゲナーゼ、AlkG: ルブレドキシシン、AlkT: ルブレドキシシン還元酵素、AlkJ: アルコールデヒドロゲナーゼ、AlkH: アルデヒドデヒドロゲナーゼ。AlkF (ルブレドキシシン) と AlkK (アシル CoA シンターゼ) は省略している。

AlkB は非常に多くのアルカン分解菌から発見されており、アルカンの分解に特に重要な酵素である^[92]。AlkB は二核非ヘム鉄を持つ金属酵素^[93]であり、炭素数 5-12 の直鎖状ア

ルカンを水酸化する^[94]。この非ヘム鉄は、AlkB に高度に保存された 8 個のヒスチジン残基が配位しており 1 つでも変異すると失活する^[95]ことから、活性中心であると考えられている。また、AlkB が触媒する反応には MMO や P450 と同じく電子が必要であり、AlkG と AlkT によって NADH の電子が供給されている^[96]。AlkG は最も単純な鉄硫黄タンパク質である電子伝達タンパク質のルブレドキシン (Rub) である。Rub は分子量 6,000 程度の小さなタンパク質で、鉄原子に 4 つのシステイン残基が配位した構造をとる^[97]。一方、AlkG は分子量 19,000 であり、70 残基のリンカーでつながった 2 つの Rub ドメインを N 末端と C 末端に持つことが知られている^{[98][99]}。AlkF も Rub であることが報告されている^[98]が、AlkB への電子伝達には関与しておらず^[99]、生体内でどのような役割を担っているかは不明である。また、AlkG の N 末端も AlkB への電子伝達に関与しておらず、C 末端の Rub だけで機能していることが明らかになった^[99]。AlkG はルブレドキシン還元酵素 (RubR) である AlkT によって還元された後に AlkB の鉄原子に電子伝達を行う^[100]。

AlkT はフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) を補因子に持つフラビントタンパク質で、NADH の電子を使って FAD を還元し、AlkG を還元する酵素である。2007 年に、緑膿菌 *P. aeruginosa* PAO1 の Rub と RubR の複合体の結晶構造が報告された (図 14a)^[101]。Rub の鉄原子と RubR の FAD のイソアロキサジン環が近接しており、分子間の距離は 7.4 Å であった。一般的に、電子伝達が可能な距離は 14 Å 以下である^[102]ため、この構造は Rub-RubR 間の電子伝達時のコンフォメーションであることが示唆された。更に、鉄原子とイソアロキサジン環の間に水分子が存在しており、この水分子を介して電子伝達が行われていると推定された。

P. putida GPo1 が有するアルカンヒドロキシラーゼシステムに関連する電子伝達サイクルを図 14b にまとめた。この電子伝達サイクルは、AlkT が NADH を用いて補因子の FAD を二電子還元することで開始する。還元型 AlkT が AlkG と複合体を形成し、AlkG の鉄原子を還元する。還元型 Rub が AlkB に電子を受け渡し、活性中心の非ヘム鉄を還元する。その後、AlkB は分子状酸素を用いた直鎖状アルカンへの酸素添加反応を触媒し、酸化状態に戻る。

この電子伝達サイクルにおいて、還元型 AlkT は二電子還元できるため 2 分子の AlkG を還元すると考えられているが、AlkG の一電子還元後に生じるイソアロキサジン環のセミキノン体がこれまでに検出されていない。また、還元型 Rub から AlkB への電子伝達の詳細なメカニズムも明らかになっていない。

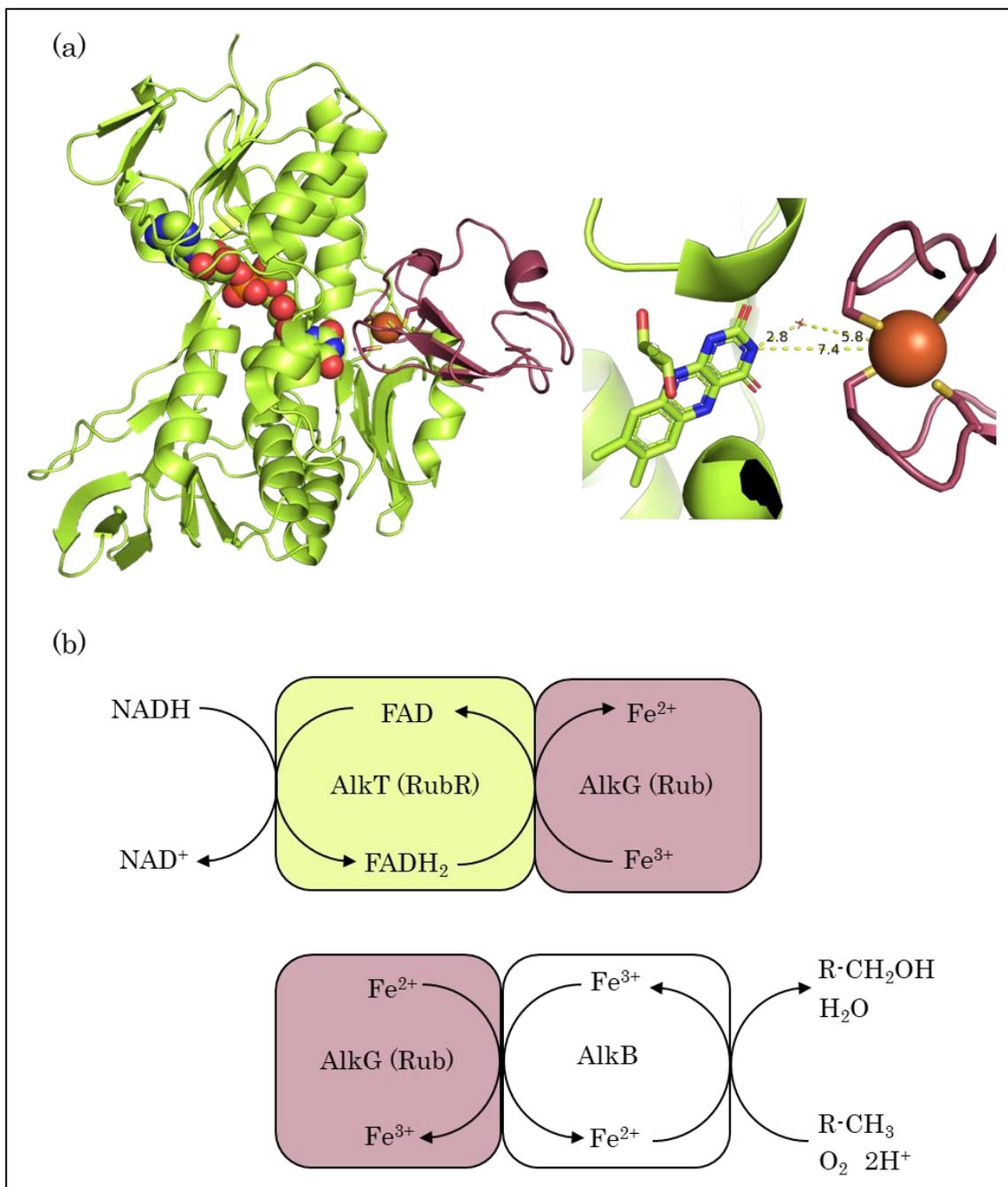


図 14 | Rub-RubR 複合体の結晶構造 (PDB ID: 2V3B) と電子伝達サイクル (a) Rub-RubR 複合体の全体構造と補因子結合部位の拡大図、黄緑色の構造が RubR、赤褐色の構造が Rub を示す。球体モデルは FAD を示す。拡大図中の数字は距離を示す (単位: Å)。(b) *P. putida* GPo1 が有するアルカンヒドロキシラーゼシステムの電子伝達サイクル。このシステムでは RubR と Rub を介して NADH から AlkB に 2 個の電子が供給される。

AlkB がアルカン水酸化酵素と同定されてから現在に至るまで、半世紀以上の間、様々な研究が行われてきているが、未だに AlkB の立体構造は明らかになっていない。その原因と

して AlkB が膜タンパク質であることが挙げられる。しかしながら、これまでの機能解析などの研究により少しずつ素性が明らかになってきた。van Beilen らは、蛋白質工学的手法を用いて、AlkB の様々な位置にアルカリホスファターゼまたは β -ガラクトシダーゼを挿入し、それらの酵素活性を測定することで AlkB の膜に対する配向を調べた。その結果、AlkB は N 末端と C 末端が細胞質側に存在する 6 回膜貫通構造を取ることが示唆された^[103]。また、Alonso らは、脂質膜に再構成した AlkB の二次元結晶を作製し透過型電子顕微鏡で分析を行い、AlkB が脂質膜上では三量体を形成していることを見出した。pMMO は三量体で機能することから、AlkB も生体内では三量体で機能している可能性が示唆された。また、van Beilen らは様々な炭化水素を用いて AlkB の活性測定を行い、基質結合ポケットの形状の予測を試みていた。AlkB は三級炭素を持つアルカンを酸化できず、シクロアルカンの酸化効率が低く、直鎖状アルカンの酸化効率が低いことから、高さ 5 Å、幅 8 Å 程度の基質結合ポケットを有することが示唆された。また興味深いことに、どのような基質を用いた場合でも末端炭素のみが水酸化されており、AlkB は高い位置特異性を有することが判明した。更に、効率は低いがエチルベンゼンなどの芳香族化合物も水酸化され、末端にアルケンを持つ化合物はエポキシ化されていた^[94]。更に彼らは、AlkB の基質結合に関わる残基を特定するために、*P. putida* GPo1 由来の AlkB を *P. fluorescens* に導入し、本来水酸化できない炭素鎖長の直鎖アルカンを唯一の炭素源として生育させることで選択圧をかけ、変異体を得る実験を行った。その結果、本来炭素源として利用することができない、テトラデカンとヘキサデカンで培養することに成功した。この菌体の AlkB 遺伝子を調べたところ、W55S または W55C の変異が入っていることが判明した。他の生物種が持つ AlkB の W55 に相当するアミノ酸残基に同様の変異、または、小さなアミノ酸の場合にはフェニルアラニンやトリプトファンに変異させたところ、炭素源として利用可能なアルカンの鎖長が変化した。この結果から、AlkB は W55 を基質結合ポケットの底部にして水酸化できるアルカンの炭素鎖長の上限を決めていることが示唆された^[104]。

これらの結果から AlkB のトポロジーモデルが考案された (図 15)^[104]。AlkB は、細胞質側に存在する保存された His クラスターが配位した活性中心の二核非ヘム鉄から、ペリプラズム側の W55 まで筒状に伸びた基質結合ポケットを有していると推定された。

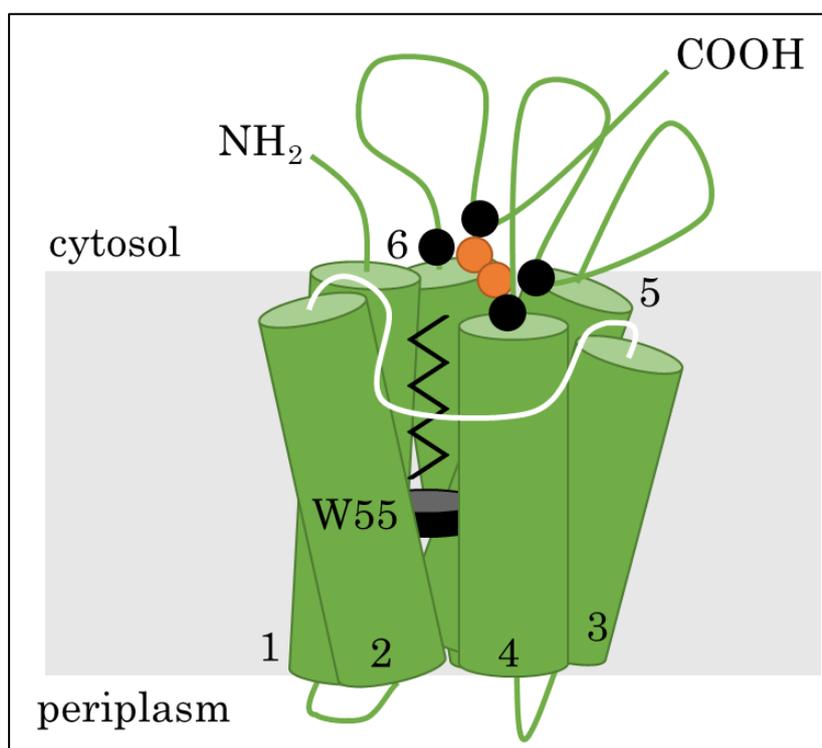


図 15 | AlkB のトポロジーモデル、数字は膜貫通ヘリックスを示す。黒丸は保存されている His モチーフ、オレンジの丸は鉄原子を示す。

AlkB は他のアルカン水酸化酵素と比較して基質特異性が広いことから、工業的な実用化が強く望まれている酵素である。また驚くべきことに、*Alcanivorax borkumensis* が有する AlkB は非常に低効率ではあるがベンゼンを水酸化することが報告されている^[105]。このように有用な AlkB を実用化する上で問題となるのが、電子伝達タンパク質の調製が必要な点と、P450 と同様に高価な NADH が必要なことである。Tsai らによって AlkG を炭素電極上に固定化して電気化学的に AlkB へ電子供給する系が開発された^[106]。この手法では NADH と AlkT が不必要であり、調製の簡略化とコストダウンが期待される。更に、この系を用いた場合、AlkB はプロパンとブタンも水酸化することが報告された。AlkG が固定されていることで本来とは異なる相互作用を形成し、基質結合ポケットの形状が変わることによってガス状アルカンの水酸化が可能になっていると推察されている。

近年、*P. putida* GPo1 のアルカン分解経路の一部を大腸菌に導入して、ナイロン 12 の原料である 12-アミノドデカン酸メチルエステルを産生した合成生物学的な応用が報告された^{[107][108]}。原料のドデカン酸メチルエステルは AlkL によって大腸菌に取り込まれた後 AlkB と AlkJ によりアルデヒドへ変換される。このアルデヒドがω-トランスアミナーゼによって末端にアミノ基が転移することで 12-アミノドデカン酸メチルエステルが合成され

る。また、アラニンデヒドロゲナーゼを同時に発現させることで、アミノ基転移に必要なアラニンの供給量が増え、効率よく 12-アミノドデカン酸メチルエステルが合成された。

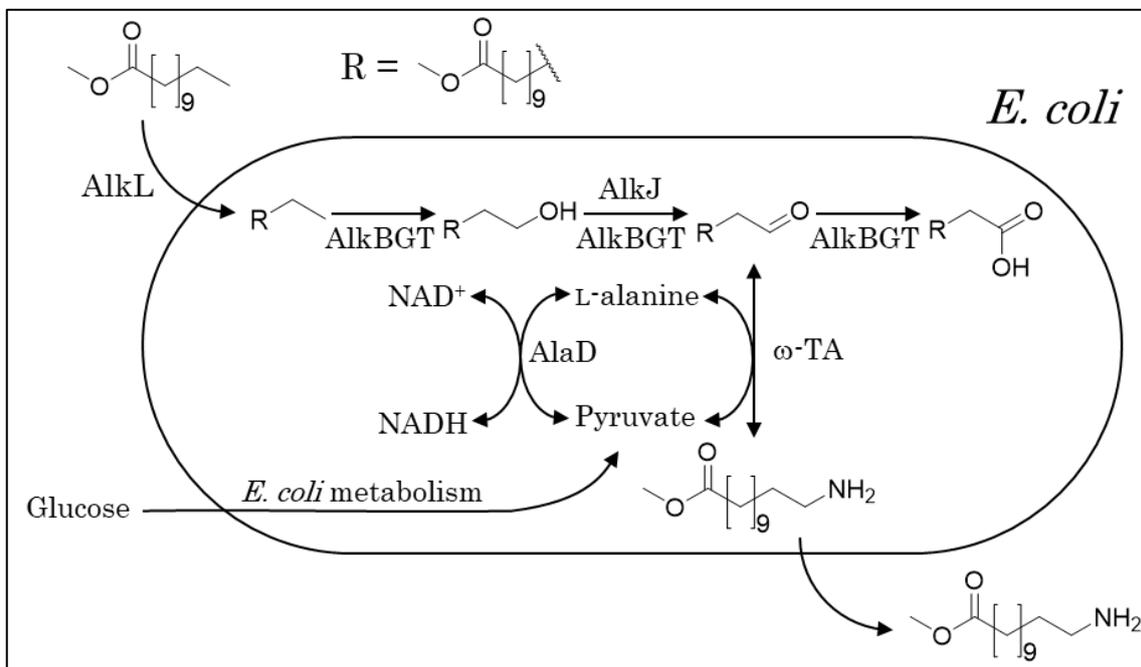


図 16 | 大腸菌を用いた 12-アミノドデカン酸メチルエステルの合成経路図。AlaD: アラニンデヒドロゲナーゼ、 ω -TA: ω -トランスアミナーゼ

更に近年、AlkB を使った燃料電池が開発^[109]されるなど、少しずつ応用例が増えてきているが、P450 など他の酵素と比べるとその数は非常に少ない。先に述べたように変異体解析などにより基質特異性が変化した AlkB が得られているが、構造情報が不足しているためその変異がどのように寄与しているか十分に理解できておらず、それが応用例の少なさにつながっていると考えられる。そのため、以前から AlkB の立体構造の解明が強く望まれており、構造が明らかになることで AlkB の応用に向けた研究が加速すると期待される。

3. 微生物が生産するポリマー

バイオポリマーは生物が生産する高分子化合物を指し、核酸やタンパク質、多糖類などが相当するが、近年は生物由来の原料を使ったプラスチックを指すことが多い。バイオポリマーは再生可能資源が原料であり、カーボンニュートラルな化合物であるため、石油製品の代替品として非常に注目を集めている。また、バイオポリマーの特徴として酸・アルカリで分解しやすいことや生分解性があるため、リサイクルが容易な点が挙げられる。これまでにポリ乳酸 (PLA)、ポリヒドロキシアルカノエート (PHA) などのポリエステルが実用化されている。ここではこれら 2 種のバイオポリエステルと、新たなバイオプラスチックになりうる素材として注目されているアミノ酸ホモポリマーのポリ- γ -グルタミン酸 (γ -PGA) 及び ϵ -ポリ-L-リジン (ϵ -PL) を加えた、計 4 種のポリマー (図 17) の性質や合成法について概説する。

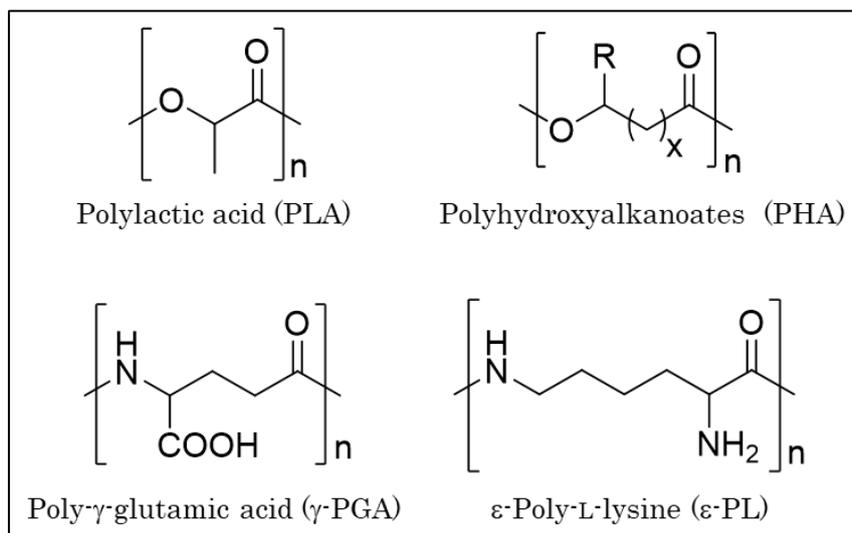


図 17 | 微生物が生産するバイオポリマー

3-1. ポリ乳酸 (PLA)

PLA の合成原料は植物などのバイオマスであり、セルロースやデンプンを糖化したもの^[110]、またはデンプンを直接利用^[111]して、乳酸菌により PLA の単量体である乳酸が生産される。乳酸菌による乳酸の生産は菌種ごとに異なっており、エムデン-マイヤーホフ経路のホモ発酵と、6-ホスホグルコン酸/ホスホケトラーゼ経路のヘテロ発酵の 2 つの経路のどちらかで行われる (図 18)^[112]。ホモ発酵は 1 mol のグルコースから 2 mol の乳酸を生産し、ヘテロ発酵は 1 mol のグルコースから 1 mol の乳酸を生産する。

乳酸菌によってバイオマスから乳酸が生産された後、主に化学プロセスによって重合されることで PLA が合成されている。PLA の合成法は非常に多く開発されている^[113]ため、

ここでは主要な経路を取り上げて説明する (図 19)^[114]。最も主流な経路が乳酸を脱水縮合してラクチドを形成し、ラクチドを開環縮合することで PLA を合成する手法である。もう一つの主流な合成経路が、高温・真空下で直接重縮合を行う手法である^[115]。PLA の工業的な生産はこれらの化学合成法が用いられているが、大腸菌の代謝工学により、グルコースから PLA を生産する菌株も開発されている^[116]。

PLA は毒性がなく高強度で透明性があることから、食品の包装容器やフィルムなどに用いられており^[117]、キトサンと銀イオンを修飾することで抗菌性を付与した PLA フィルムなども開発されている^[118]。更に、PLA は生分解性であるため、医療用の縫合糸や再生医療などの組織工学に応用されている^[117]。

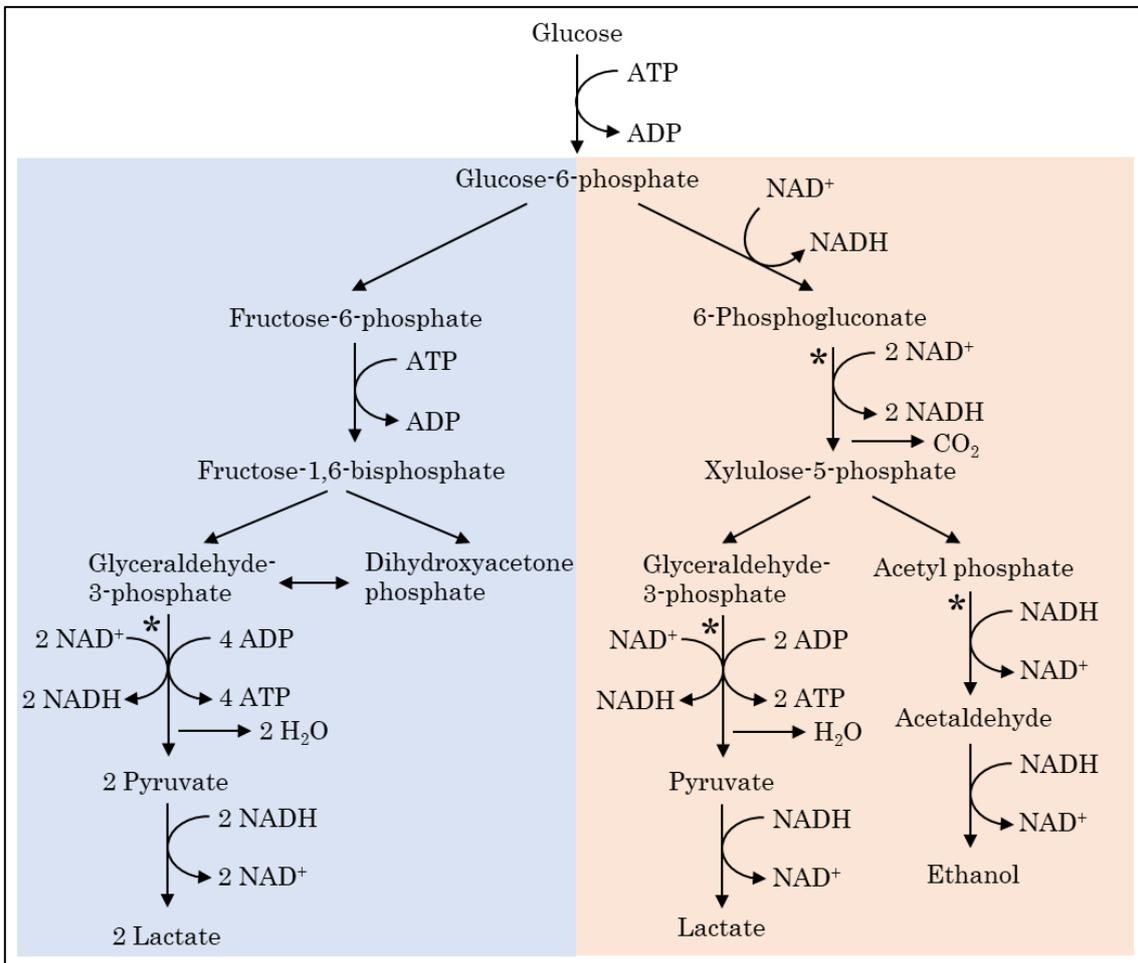


図 18 | 乳酸菌の乳酸生産経路、左: ホモ発酵 (エムデン・マイヤーホフ経路) 右: ヘテロ発酵 (6-ホスホグルコン酸/ホスホケトララーゼ経路) 図中の*は一部の反応を省略していることを示す。

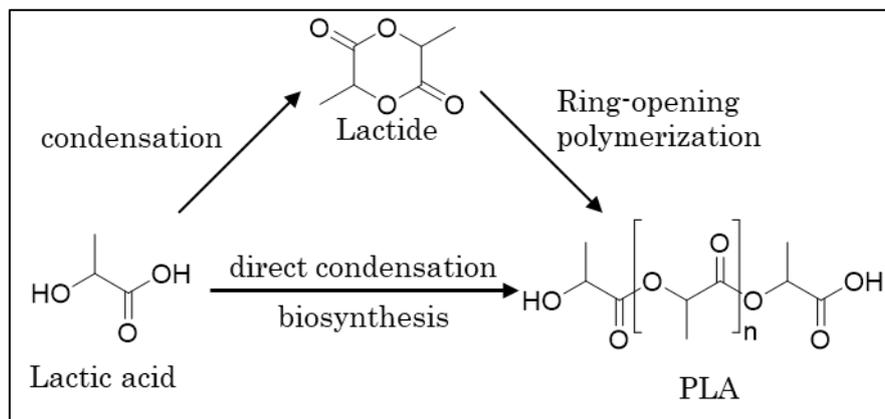


図 19 | 主要な PLA 合成経路、工業的な生産には化学合成法が使われている。

3-2. ポリヒドロキシアルカノエート (PHA)

PHA は、PLA と同様に植物等のバイオマスに加えて、食用廃油などを合成原料として製造される。PHA の合成は化学プロセスが含まれず、全て微生物により行われている。PHA を生産する微生物として、*Ralstonia eutropha*^[119]、*Azotobacter* 属^[120]、*Bacillus* 属^[121]、*Pseudomonas* 属^[122]などが知られている。これらの微生物は、炭素源以外の栄養源が制限されている条件下で PHA を合成し、炭素源の備蓄として細胞内に蓄積する。一方、遺伝子組み換えによって PHA 生産株に改変された大腸菌は、栄養などの条件に関係なく PHA を生産できることが分かっている^[123]。

PHA の単量体は 3-ヒドロキシアシル CoA で、微生物種によって炭素数が異なっており、3 種いずれかの経路で合成される (図 20)。I の経路は、最も研究されている *R. eutropha* が有しており、糖から変換されたアセチル CoA を出発物質とする。2 分子のアセチル CoA が PhaA によって縮合され、アセトアセチル CoA に変換される。次に、PhaB がアセトアセチル CoA を 3-ヒドロキシブチリル CoA に還元する。最終的に PhaC が 3-ヒドロキシブチリル CoA を重合し、ポリヒドロキシブチレート (PHB) を合成する^[124]。

II の経路は *Pseudomonas* 属が有しており、脂肪酸のβ酸化で生じるアシル CoA を出発物質とする。エノイル CoA または 3-ケトアシル CoA は PhaJ、PhaB、FabG によって 3-ヒドロキシアシル CoA に変換される。また、3-ケトアシル CoA からアシル CoA に変換される際に生じるアセチル CoA は経路 I に用いられる。この経路で合成される PHA は様々な炭素数の基本骨格を持つことが報告されている^[125]。また、この経路はアルカン分解経路と連続しており、アルカンを出発物質とすることが可能である。

III の経路も *Pseudomonas* 属が有しており、II の経路と同じ PhaC が PHA の合成に関与している^[122]。この経路は PhaG が脂肪酸の生合成で生じる 3-ヒドロキシアシル ACP を

CoA 体に変換することでポリマー原料を得ている。この経路の特徴は、糖などの安価な炭素源から様々な炭素数の PHA が合成されることである。

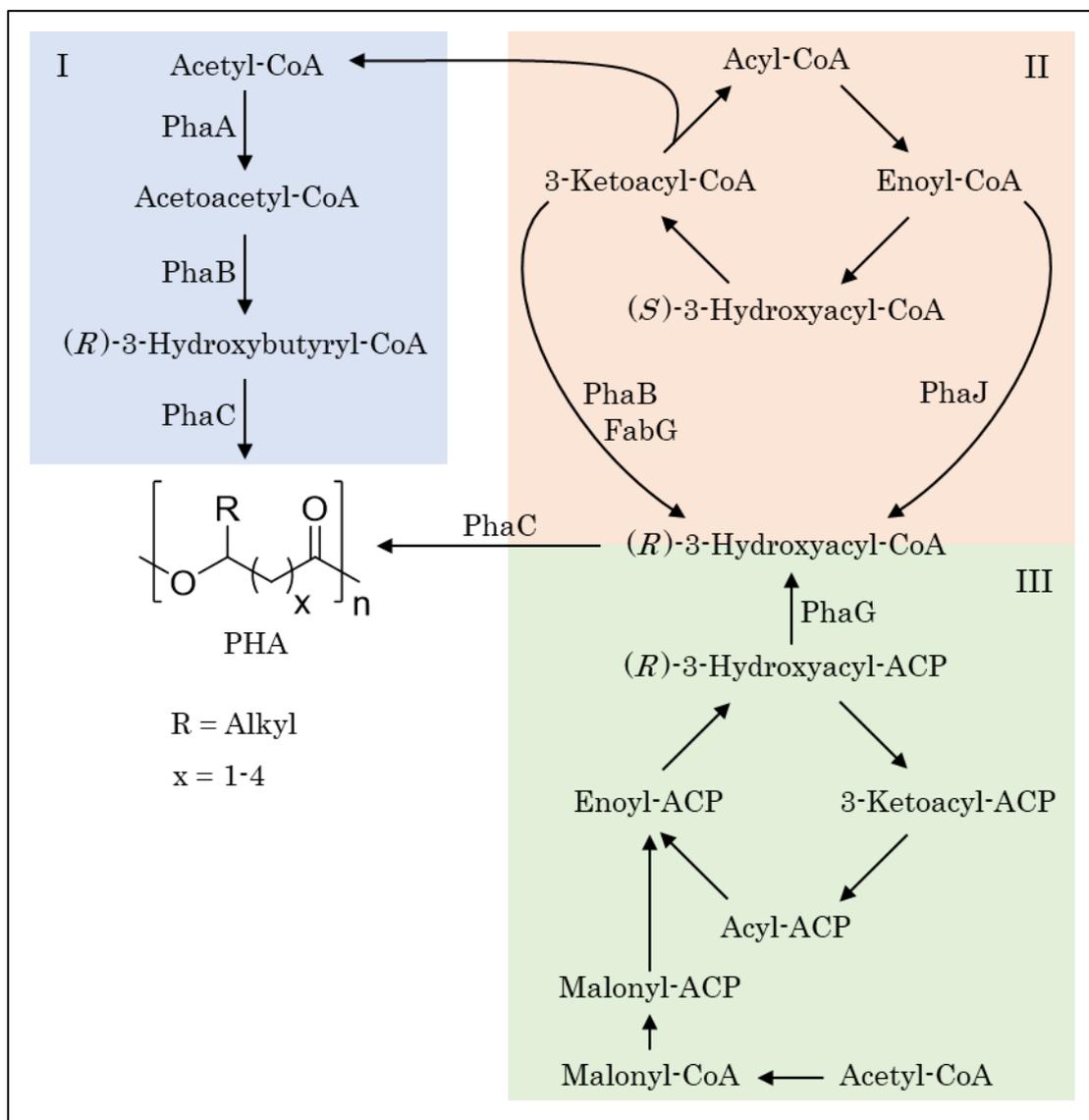


図 20 | PHA の生合成経路 (I) 3-ヒドロキシブチリル CoA 経路、2 分子のアセチル CoA から 3-ヒドロキシブチリル CoA を合成する。(II) β酸化経路、脂肪酸を分解する過程で様々な炭素数の 3-ヒドロキシアシル CoA を合成する。(III) 脂肪酸生合成経路、アセチル CoA から脂肪酸を生合成する過程で様々な炭素数の 3-ヒドロキシアシル CoA を合成する。矢印の横に反応を触媒する酵素を示した。ACP: アシルキャリアタンパク質

PHA は単量体を構成する炭素数によって、短鎖長 PHA (PHA_{SCL}) と中鎖長 PHA (PHA_{MCL}) に分類される。PHA_{SCL} は炭素数 3-5 で、PHA_{MCL} は炭素数 6-14 である^[124]。これらの PHA は大きく性質が異なっており、PHA_{SCL} は非常に硬くて脆いのに対して、

PHLMCL は柔軟性が高く加工に適した材質である^[126]。また、生合成される PHA の特徴として、異なる炭素数の単量体同士で重合し、共重合体 (copolymer, コポリマー) を形成することが挙げられる。コポリマーは単一構成単位のポリマーと比べて柔軟性を持つ。炭素源を糖だけにして *R. eutropha* を生育させると PHB しか生産しないが、糖とプロピオン酸 (C₃) を炭素源にして生育させると、ポリ(3-ヒドロキシブチレート-co-3-ヒドロキシ吉草酸) P(HB-co-HV) を生産する (図 21)^[127]。P(HB-co-HV) は Biopol という名称で商品化されており、シャンプーボトルや使い捨て用品など様々な製品の原料に使われている^[128]。

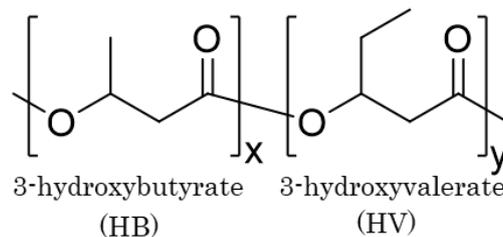


図 21 | ポリ(3-ヒドロキシブチレート-co-3-ヒドロキシ吉草酸) の構造式

PHA は安価なバイオマスから微生物による発酵だけで大量に生産できるため非常に魅力的なバイオポリマーである。しかし、生産された PHA は微生物の細胞内に蓄積するため抽出の作業が必要となる。抽出には有機溶媒を用いて溶解させる方法と、細胞を破壊して放出させる方法がある。有機溶媒を用いる方法は抽出効率が高くポリマーへの影響も少ないが、毒性が高い塩素系溶媒を大量に使う必要があり、さらに抽出前にバイオマスや菌体に含まれる溶媒を蒸発させるための大量のエネルギーを必要とする問題点がある。もう一方の細胞を破壊する方法は、有機溶媒による抽出より安全ではあるが、ポリマーが低分子量化する可能性や、大量の廃液処理が必要になる欠点がある。これらの理由から、製造コストが高くなっており抽出方法の改善が求められている^[129]。

3-3. ポリ- γ -グルタミン酸 (γ -PGA)

γ -PGA はアミノ酸のグルタミン酸が構成単位で、 α アミノ基と γ カルボキシ基がアミド結合したアニオン性のポリマーである。 γ -PGA は D 体のみから構成された γ -D-PGA、L 体のみで構成された γ -L-PGA、D 体/L 体が混在した γ -DL-PGA の 3 種が天然から発見されており、いずれも主に *Bacillus* 属細菌によって生産される。*Bacillus* 属細菌は二次代謝産物として γ -PGA を生産し、有害な外的要因からの防衛や、炭素、窒素源の貯蔵として機能していると考えられている^[130]。

γ -PGA の工業的な生産に使われている菌株は主に *Bacillus* 属細菌であり、L-グルタミン酸の供給が必要な株と不必要な株に分けられる。これらの株はグルタミン酸の供給方法が異なっているが、 γ -PGA の合成に関わる酵素群は同じである。*Bacillus* 属細菌の γ -PGA 生合成経路を図 22 に示した。グルタミン酸非依存性株は、細胞外から取り込んだグルコースを解糖系、TCA サイクルを経て α -ケトグルタル酸に変換した後、グルタミン酸デヒドロゲナーゼによって α -ケトグルタル酸にアミノ基が転移され、L-グルタミン酸を合成する。L-グルタミン酸はラセマーゼで D-グルタミン酸に変換される。L-グルタミン酸から直接 D-グルタミン酸が合成される経路以外に、L-アラニンを経由する間接的な経路も存在する。合成された D,L-グルタミン酸は、細胞膜上に局在し複合体を形成する、 γ -PGA 合成酵素 (Pgs) によって重合され、複合体によって形成された孔を通して細胞外へ放出されると推定されている^[131]。

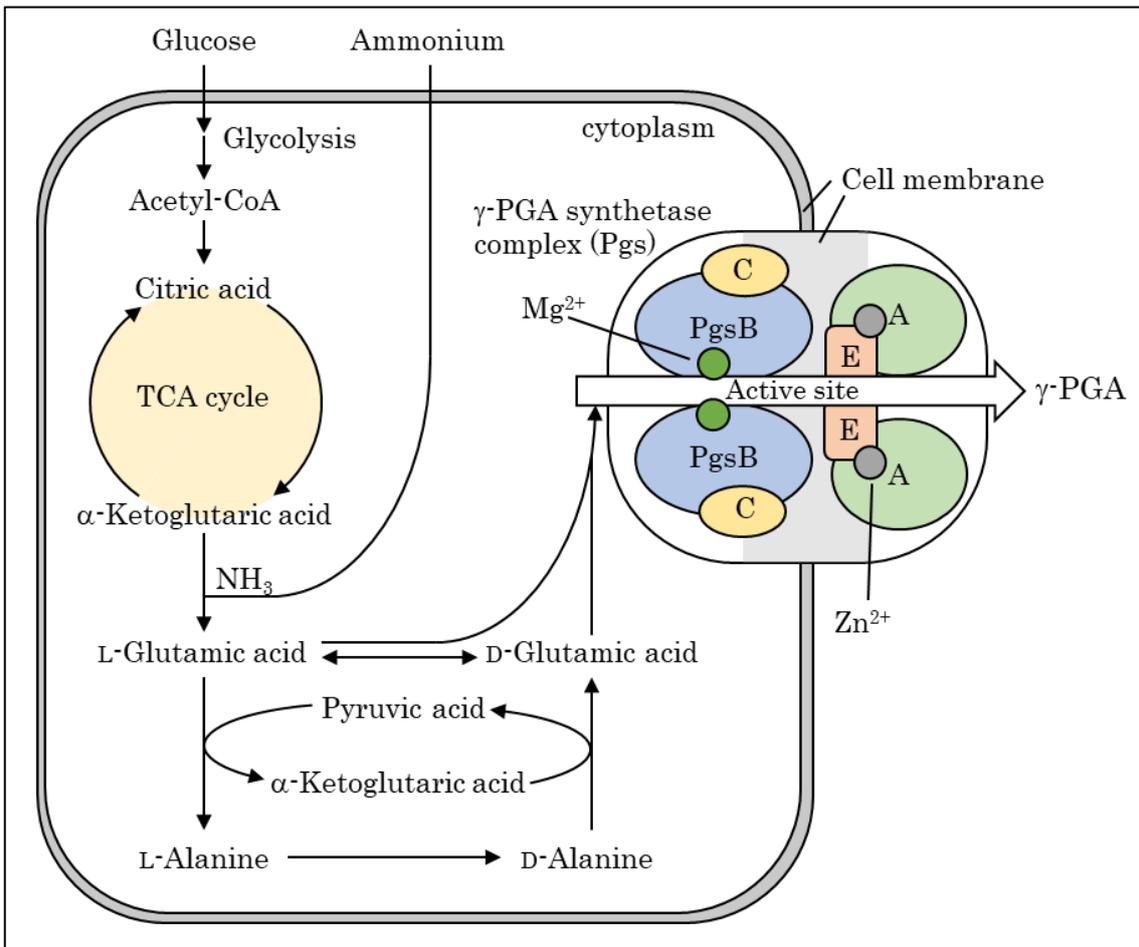


図 22 | γ -PGA の生合成経路。グルタミン酸が合成または細胞外から取り込まれた後、 γ -PGA 合成酵素複合体によって縮合され、細胞外に放出される。

Pgs は PgsB、PgsC、PgsA、PgsE の 4 成分で構成される複合体を形成する。グルタミン酸の重合は PgsBC が ATP 存在下で触媒しており、ATP の加水分解産物が ADP であったことからマグネシウム依存性アミノ酸リガーゼ様の反応であると推定されている (図 23)^[131]。

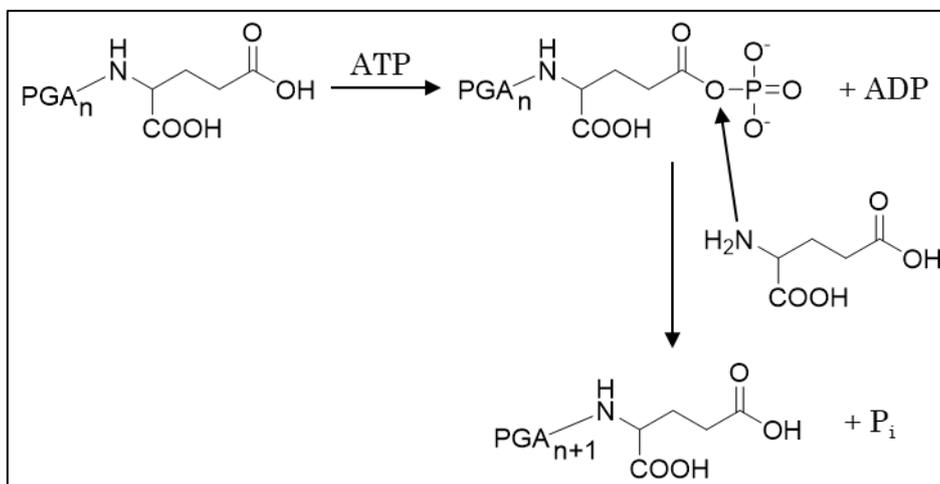


図 23 | 推定されている PgsBC の反応メカニズム、 P_i は無機リン酸を示す。

一般的にアミノ酸リガーゼはアミノ酸の異性化活性を持たないため、 γ -D-PGA 及び γ -DL-PGA が合成されるには重合前に D-グルタミン酸に変換されている必要がある。D 体を含む γ -PGA を生産する菌株は D-グルタミン酸合成に関わる遺伝子を持っているのに対して、 γ -L-PGA しか生産しない菌株から、その遺伝子は見つかっていない^[132]。また、PgsA は存在していても PgsBC による γ -PGA の縮合反応が行われるが、活性が低下することが報告されている。この PgsA は、疎水性アミノ酸と多数の塩基性アミノ酸で構成されていることから、PgsBC と複合体を形成して、合成された γ -PGA を細胞膜外に放出する役割を担っていると推定されている^[131]。PgsE は非常に小さなタンパク質で、長年 γ -PGA の生産にどのように寄与するか不明であった。近年、PgsE が Zn^{2+} 存在下で、PgsBCA に作用して γ -PGA の生産量を向上させる^[133]だけでなく、 γ -PGA の高分子量化にも関与^[134]していることが明らかになった。

γ -PGA は生分解性と安全性を併せ持つことから、増粘剤などの食品加工に利用されている^[135]だけでなく、近年ではドラッグデリバリーシステムへの応用もされている^[136]。微生物での生産法が確立されているが、外部からのグルタミン酸の追加が必要なことや、分離や精製のプロセスがあるためコストが高い問題がある。そのため、遺伝子工学や代謝工学的手法による異種宿主を用いた大量生産法の開発^[137]や、グルタミン酸の工業的生産に用いられている *Corynebacterium glutamicum* を *Bacillus* 属細菌と共培養することで外部からのグル

タミン酸添加を削減する手法^[138]など、様々な研究が行われている。一方で、Pgs に対する蛋白質工学的手法を用いて活性を向上させるといった試みは行われていない。これは Pgs が複合体を形成して機能するため、反応系が複雑であることが要因であると考えられる。また、Pgs のどのサブユニットも立体構造が明らかになっておらず、 γ -PGA 合成メカニズムの理解が十分でないことも要因として挙げられる。そのため、 γ -PGA の工業的生産に向けた研究を推進していくためには、構造生物学的研究が必要であると考えられる。

3-4. ϵ -ポリ-L-リジン (ϵ -PL)

ϵ -PL は、アミノ酸の L-リジンが構成単位で、 α カルボキシ基と ϵ アミノ基がアミド結合で重合したカチオン性のアミノ酸ホモポリマーで、放線菌 *Streptomyces albulus* の二次代謝産物として生産される。 ϵ -PL は γ -PGA と異なり L 体のリジンだけで構成されており、酵母や細菌に対する抗菌活性を示す^[139]ことが特徴として挙げられる。また、ヒトへの毒性はなく高い水溶性と熱安定性、生分解性を併せ持つことから、食品の防腐剤として広く用いられている^[140]。工業的な ϵ -PL の生産は、異種宿主を用いると ϵ -PL の抗菌活性のために生育ができなくなるため、 ϵ -PL 分解酵素を有している^[141] ϵ -PL 生産株の *S. albulus* が用いられている。

S. albulus による ϵ -PL 生合成経路を図 24 に示した。*S. albulus* は糖やグリセロールなどの炭素源を取り込み、TCA サイクルによってオキサロ酢酸に変換した後、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼによりアスパラギン酸を合成する。このアスパラギン酸を初発物質として、ジアミノピメリン酸 (DAP) 経路を介して L-リジンが合成される。その後、ポリリジン合成酵素 (Pls) によって ATP 依存的に L-リジンの重合が起こり 25-35 量体の ϵ -PL が合成され、細胞外へと放出される。細胞の近傍に存在する ϵ -PL はポリリジン分解酵素によって L-リジンに分解される。

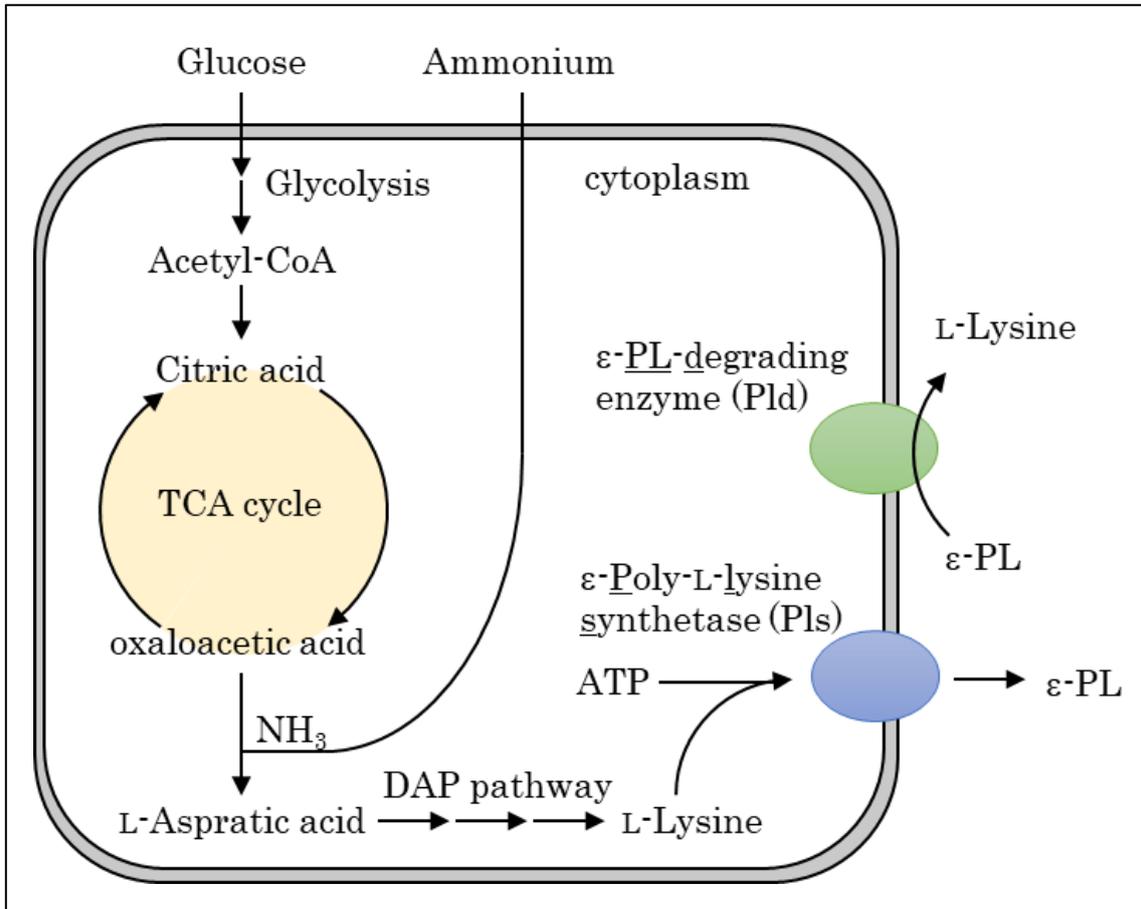


図 24 | *S. albulus* における ε-PL 生合成経路、DAP 経路を介して合成された L-リジンは Pls によって重合される。

ポリリジン合成酵素 (Pls) は ATP 依存的に L-リジンの縮合反応を触媒する膜内在性酵素である。kawai らは、Pls による ε-PL 合成の際に L-リジン依存的に AMP が産生されていることを報告した^[142]。このことから Pls は、Pgs のようなアミノ酸リガーゼではなく、非リボソーム型ペプチド合成酵素 (NRPS) であると推定された。

NRPS はタンパク質の合成とは異なりリボソームを介さずにポリペプチドを合成でき、アデニル化 (A) ドメイン、チオエステル化 (T) ドメイン、縮合 (C) ドメイン、チオエステラーゼ (TE) ドメインを必須ドメインとする巨大なマルチドメインタンパク質である。これらの複数個のドメインで 1 つのモジュールと呼ばれる複合体を形成する。更に、そのモジュールは合成されるポリペプチド鎖の残基数分だけ存在し、1 つまたは複数個の巨大な酵素を形成する。NRPS によるポリペプチド合成の概要図を図 25 に示した。初めに、A ドメインが ATP を用いて基質アミノ酸をアデニル化することでアミノアシル AMP を合成し、次に、T ドメインに結合した 4-ホスホパンテテインのチオール基にアミノアシル AMP が結合する。同様の反応が隣接したモジュールでも起こり、2 つのアミノ酸が T ドメインに結合した状態になる。これら 2 つのアミノ酸を C ドメインが縮合することでジペプチドが合成される。この反応をモジュールの数だけ繰り返して合成されたポリペプチド鎖は、TE ドメインによって加水分解され T ドメインから切り離される^[143]。

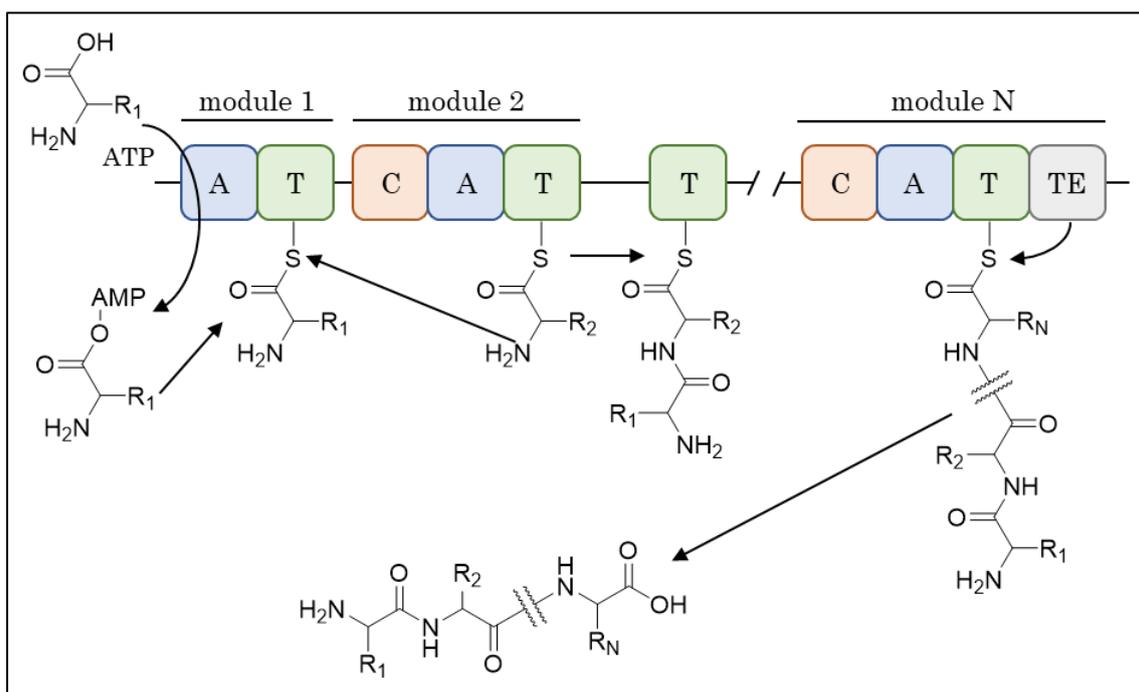


図 25 | NRPS によるポリペプチド合成の概要図、N 個のモジュールで N 残基のポリペプチド鎖が合成される。

2008 年に Yamanaka らによって *S. albulus* から Pls が単離され、その遺伝子も同定された^[144]。Pls は以前に推定されていた通り、NRPS A, T ドメインと相同性を示すドメインが存在し、L-リジンのアデニル化と、T ドメインが有する 4-ホスホパンテテインのチオール基への結合も確認された。しかし、NRPS に特徴的な C, TE ドメインは存在せず、3 対の

タンデム可溶性ドメインと 6 回膜貫通 (TM) ドメインが存在していた。3 対のタンデムドメインは NRPS C ドメインと配列相同性は示さないが、二次構造が類似していることが判明した。また、Pls の変異体解析により、このタンデムドメインは ϵ -PL 合成活性に重要であることが明らかとなり、NRPS C ドメインに相当すると推定された^[145]。また、合成された ϵ -PL は細胞外に分泌されるため、TM ドメインが分泌孔を形成していると推定された (図 26)。更に、¹⁴C で標識された L-リジンをを用いた実験から、合成途中の ϵ -PL は Pls と共有結合していないことが明らかとなった。つまり、Pls は NRPS 様の反応で L-リジンを活性化し、アミノ酸リガーゼ様の反応でポリマー化する新規酵素であることが判明した。しかしながら、Pls が L-リジン特異的にポリマーを伸長する詳細なメカニズムについては明らかになっていない。

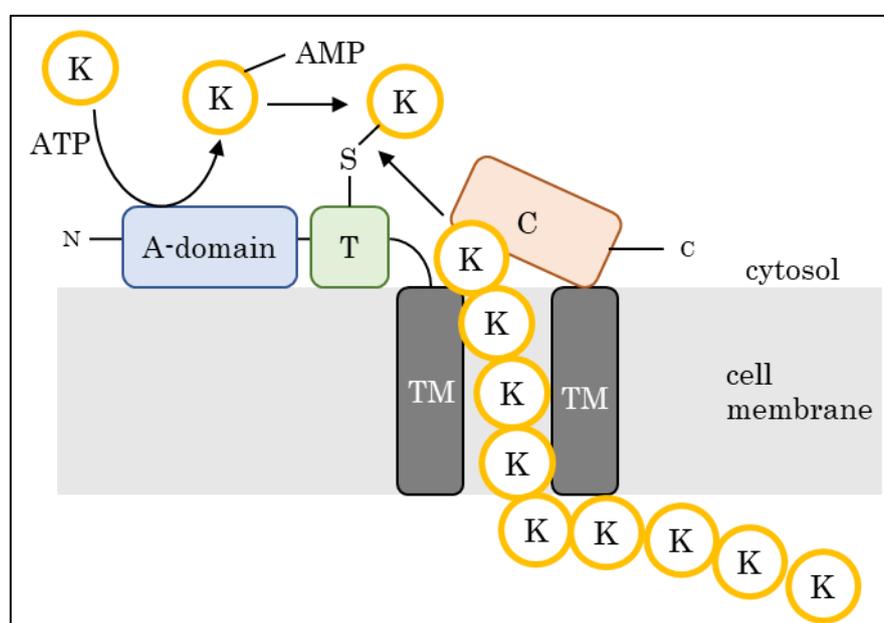


図 26 | 推定される Pls の ϵ -PL 合成メカニズム、K は L-リジンを示す。

4. 研究目的

本研究は工業的利用が期待されている酵素、特に膜内在性酵素について、立体構造から詳細な反応メカニズムを明らかにすることで、蛋白質工学などの基礎となる知見を提供し、工業的応用に繋げることを目指した。

第一章では不活性なアルカンを水酸化する膜内在性アルカン水酸化酵素 AlkB の立体構造決定に向けた取り組みと、機能改変に向けた変異体解析についての研究成果をまとめた。また、二章では、ポリアミド系バイオプラスチックを合成できる可能性を持つ新奇 NRPS

様酵素、ポリリジン合成酵素 Pls の L-リジン特異的な活性化メカニズムと、Pls 全長の立体構造解明に向けた取り組みについての研究成果をまとめた。

第一章 膜内在性アルカン水酸化酵素 AlkB の構造解析に向けた取り組み及び機能改変を目指した変異体解析

緒言

膜内在性アルカン水酸化酵素 AlkB は、炭素数 5-12 の直鎖状アルカンだけでなく、シクロアルカンや芳香族化合物も水酸化することができるため、工業的応用が期待されている。また、これらの基質は無極性であり水への溶解度が非常に低く、生体環境下では脂質二重膜中に存在することから、微生物での物質変換に膜内在性酵素の AlkB を用いた場合、可溶性酵素と比べて基質との接触確率が高く、反応効率が向上することが予想される。AlkB を工業利用する価値を更に高めるためには、基質特異性を改変し、より多様な化合物の水酸化能を付与することや、活性を向上させることが必要である。特に、低級アルカンやベンゼンの水酸化反応は化学的に難しく、高温・高圧条件が必要なため、より温和な代替案が求められている。海洋細菌の *Alcanivorax borkumensis* が持つ AlkB (*AbAlkB*) は低活性ではあるがベンゼンを水酸化できることが知られている。そこで本研究では AlkB の様々な炭化水素を水酸化する反応機構を解明し、AlkB に低級アルカンの水酸化能を付与することを目的とした。

序章でも述べたように *P. putida* GPo1 由来 AlkB (*PpAlkB*) が水酸化できるアルカンの炭素鎖長の上限は、55 残基目に存在するトリプトファンによって決定されている。このトリプトファンは *AbAlkB* にも存在しており、AlkB に共通したメカニズムであると推定されている。また、P450cam や P450BM3 は基質結合ポケットを狭めることで、野生型では水酸化できなかった低級アルカンの水酸化を触媒することが可能になっていた。これらの先行研究から、*PpAlkB* の W55 と活性中心の二核非ヘム鉄の間に存在する小さな側鎖を持つアミノ酸残基に変異を導入することで、*PpAlkB* に低級アルカン水酸化能を付与できると考えた。この実験を行うためには構造情報が必要になるが、AlkB の立体構造は未解明である。そのため、本研究ではまず初めに *AbAlkB* と *PpAlkB* いずれかの立体構造の解明を目指した。膜タンパク質の構造解析は主に X 線結晶構造解析または Cryo-EM 単粒子解析で行われており、本研究においても、これら 2 つの手法による AlkB の立体構造の解明を試みた。また、AlkB の水酸化可能なアルカンの炭素鎖長の上限を決定している W55 の情報を基に、基質結合ポケットを形成しているアミノ酸残基を予測し、変異体解析を行った。第一章ではこれらの成果についてまとめた。

結果・考察

1-1. AlkB の精製と結晶化

まず初めに、*PpAlkB* 及び *AbAlkB* の大腸菌発現系を構築し、結晶化に向けた高純度試料調製法の確立を行った。*AlkB* に、*Streptactin* と特異的な相互作用を形成するペプチドタグの **Strep** タグを付加し、アフィニティクロマトグラフィーを行うことで、1ステップで高純度に精製できることが分かった。タンパク質の結晶化は、状態が均一な試料が望まれるため、ゲルろ過クロマトグラフィーにより会合状態の確認を行った。その結果、*PpAlkB* と *AbAlkB* のどちらも状態が均一で単分散であることが分かった (図 27)。

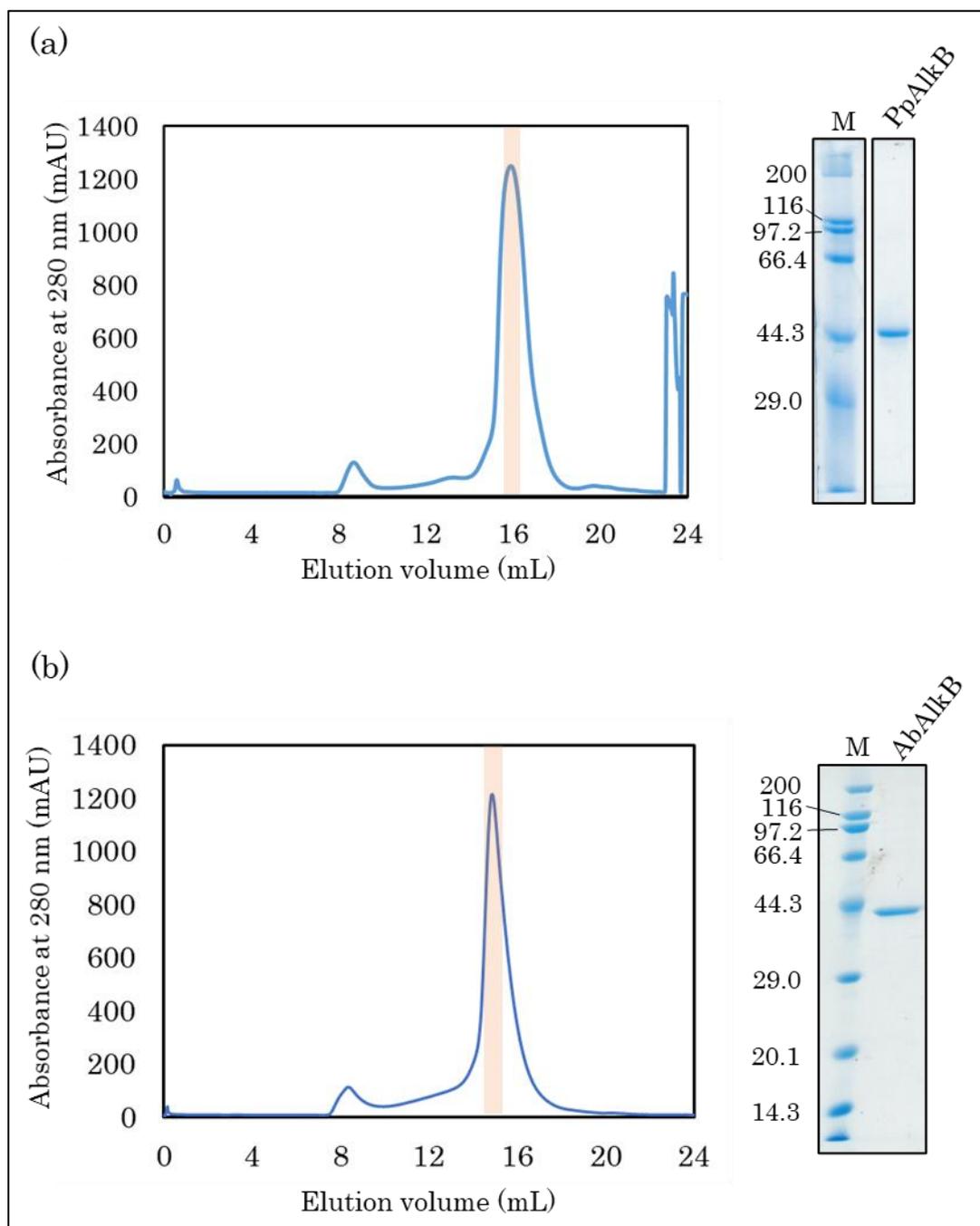


図 27 | (a) *PpAlkB*、(b) *AbAlkB* のゲルろ過クロマトグラムと SDS-PAGE 像、M は分子量マーカを示す (単位 : kDa)。カラムは (a) Superose6 increase 10/300 (b) Superdex200 increase 10/300 を使用した。

この精製試料を用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法で結晶化条件のスクリーニングを行ったが、結晶は得られなかった。*AlkB* の結晶が得られないのは、安定性の低さと、細胞外領域の小ささが原因であると考えた。

調製法の確立を行った際に、AlkB は非常に凝集しやすいことが明らかとなった。そこで、AlkB の熱安定性をオクタン水酸化活性で評価したところ *PpAlkB* は 30 °C、*AbAlkB* は 40 °C で活性が半減していることが判明した (図 28)。

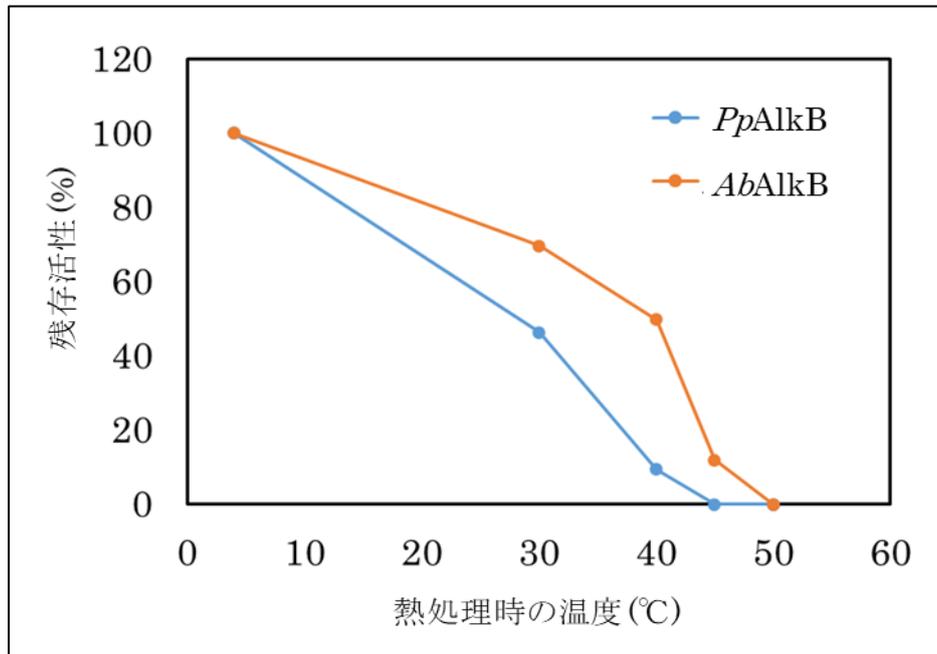


図 28 | AlkB の熱安定性測定。縦軸は熱処理していない AlkB の比活性を 100 % とした時の、各温度で熱処理した AlkB の比活性を算出したものを示し、横軸は熱処理の温度を示す。

この熱安定性の低さが原因で、AlkB 分子が規則正しく整列せず無秩序に凝集するために結晶が得られなかったと考えられる。また、AlkB は先行研究で膜に対する配向が調べられており、その結果と、隠れマルコフモデルを用いてアミノ酸配列から膜貫通領域を予測するサーバーの TMHMM^[146] (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) の結果から、AlkB の細胞外領域は膜貫通ヘリックスを繋ぐ数残基しかないことが分かった (図 29)。*AbAlkB* の膜貫通領域の予測結果は、細胞外領域と細胞内領域が反転して予測された。これは膜貫通領域以外の予測精度が低いためであると考えられる。

膜タンパク質は膜貫通領域の周囲が界面活性剤で覆われているため、他分子と相互作用を形成できる領域は細胞内と細胞外のみしかない。AlkB はその細胞外ドメインがほとんど存在しないため、相互作用を形成することが困難であると推察した。そのため、AlkB の構造解析は結晶化が必要な X 線結晶構造解析ではなく、Cryo-EM 単粒子解析による構造解析を目指すことにした。

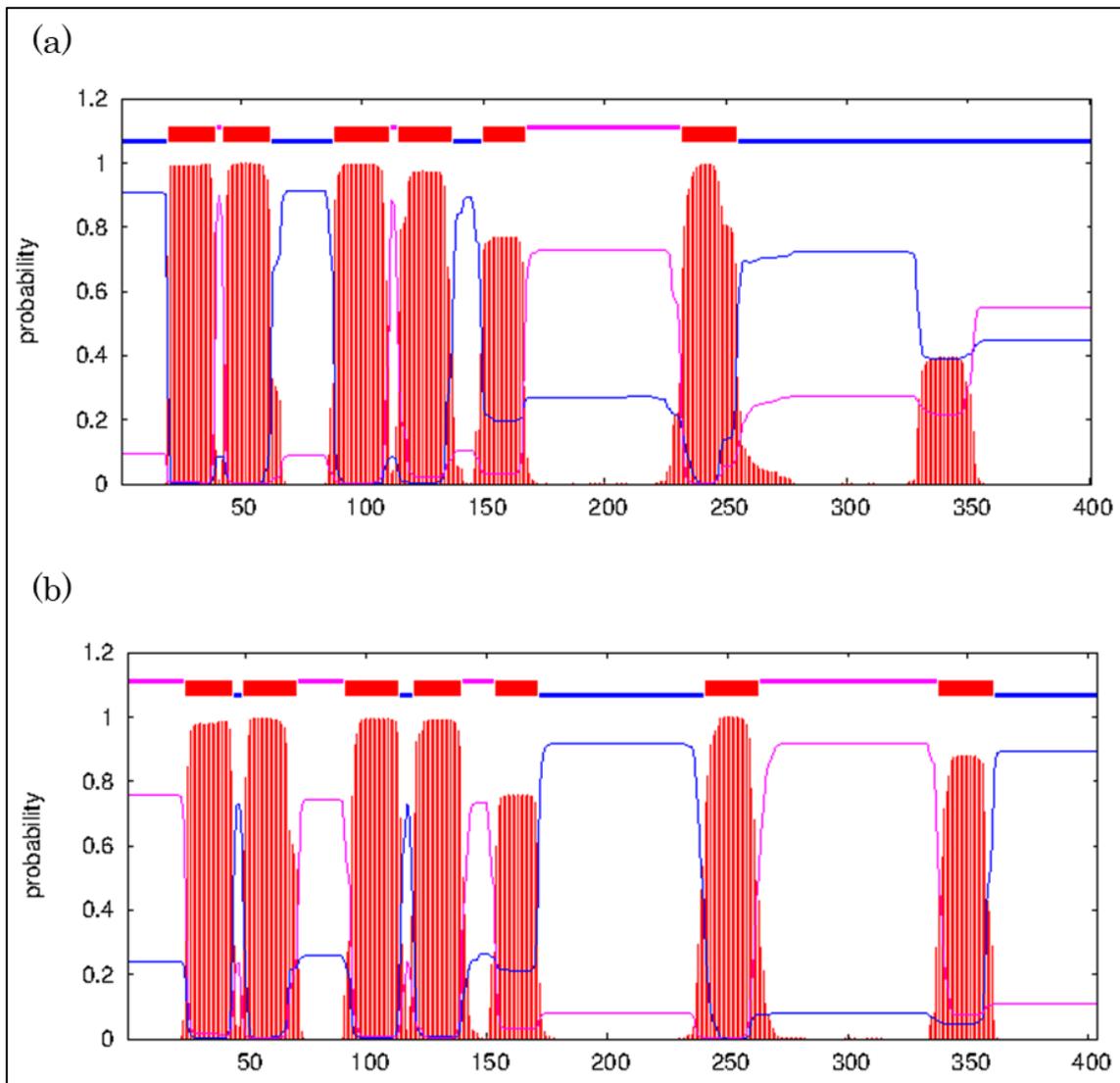


図 29 | (a) *PpAlkB* (b) *AbAlkB* の TMHMM サーバーによる膜貫通領域の予測結果。膜貫通領域は赤のバー、細胞内領域は青の線、細胞外領域はマゼンタの線で示されている。

1-2. AlkB の構造解析に向けた新たな取り組み

Cryo-EM 単粒子解析によるタンパク質の構造解析は、X 線結晶構造解析と同じく高純度で単分散な試料が必要であるが、結晶化は不必要でありごく少量のタンパク質溶液で実施できる。その一方で、測定試料の分子量が 100 kDa 以上である必要があり^[147]、対称性を持つオリゴマーが好ましいとされている。AlkB は分子量 43 kDa で、精製すると単量体であるため、Cryo-EM 単粒子解析に適した試料とは言えない。しかしながら、近年では、AlkB より小さい GFP や GPCR を、足場タンパク質や抗体と複合体を形成させることで、対称

性を持たせ、見かけの分子量を増やすことで人為的に測定に適した状態にし、構造解析した報告が増えてきている^{[148][149]}。そこで本研究では、AlkB に対称性を持つオリゴマーを形成する膜タンパク質を融合させることで、Cryo-EM 単粒子解析が可能になると考えた。またこの手法は、他の小さな膜タンパク質に適応できる可能性があり、Cryo-EM 単粒子解析における新規試料調製法となることが期待される。

まず初めに、AlkB に融合させる膜タンパク質の選定を行った。Protein Data Bank (PDB) から、高分解能で構造決定されていて、高い対称性を持つオリゴマーの膜タンパク質を探索し、五量体を形成するギ酸トランスポーターの FocA^[150]、四量体を形成するグリセロールチャネルの GlpF^[151] の 2 種を選定した (図 30)。

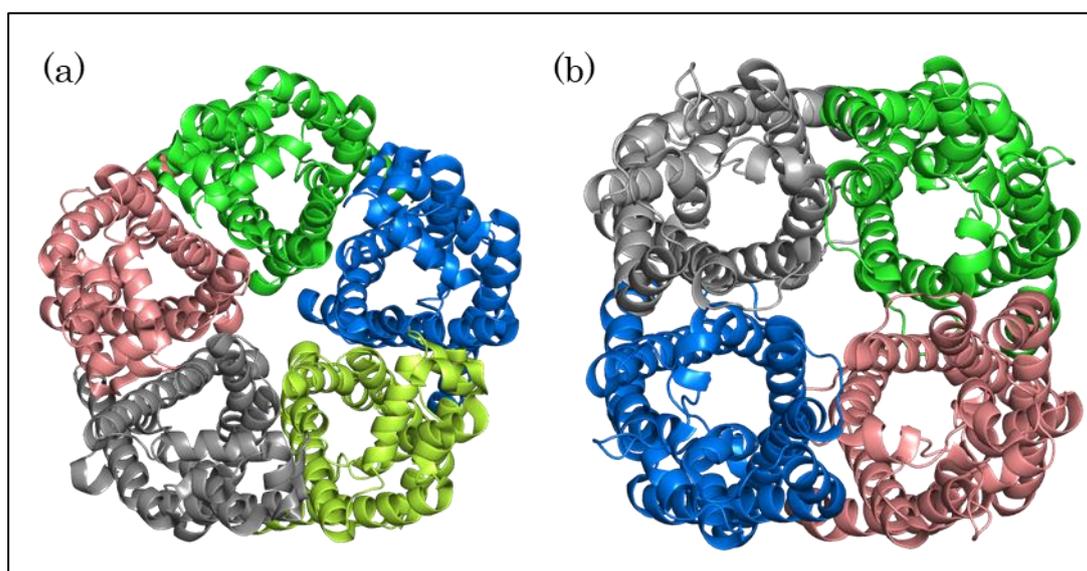


図 30 | AlkB に融合させる (a) FocA (PDB ID: 3KCU) と (b) GlpF (PDB ID: 1FX8) の結晶構造。単量体ごとに色を変えて表示した。

FocA 及び GlpF は N 末端と C 末端が細胞質側に存在するため AlkB の C 末端に融合し、更にその C 末端に検出を容易にするために GFP を融合した、(*PplAb*)AlkB-FocA-GFP と (*PplAb*)AlkB-GlpF-GFP (以降 GFP の表記は省略) の大腸菌発現系を構築した。いずれも大腸菌の細胞膜に発現することを確認できたため、AlkB-FocA は五量体、AlkB-GlpF は四量体を形成しているか評価するために、これらが発現した細胞膜を *n*-ドデシル- β -D-マルトシド (DDM) で可溶化した上清を、GFP の蛍光を検出できる蛍光検出ゲルろ過クロマトグラフィー (FSEC) で分析し、溶出体積から会合状態を評価した。AlkB-FocA は単量体が 109 kDa で、五量体を形成すると 545 kDa となり、約 14 mL 付近で溶出する。また、AlkB-GlpF は単量体が 108 kDa で、四量体を形成すると 432 kDa となり、同じく 14 mL

付近で溶出する。可溶化前後の GFP の蛍光値から可溶化効率を算出したところ、どのコンストラクトも 60 %以上の効率で可溶化できていることが分かった。これらの可溶化試料の FSEC の結果から、*PpAlkB* に融合させたコンストラクトは、14 mL より後に複数のピークが見られ、オリゴマーが解離したと考えられる様々な会合状態を取っていたのに対して、*AbAlkB* に融合させたコンストラクトは比較的単分散な状態であることが分かった(図 31)。*PpAlkB* に融合させたコンストラクトが複数の会合状態を取っているのは、*PpAlkB* の熱安定性の低さが原因であると考えた。そのため、今後の実験では *AbAlkB* に FocA と GlpF を融合させたコンストラクトを用いた。

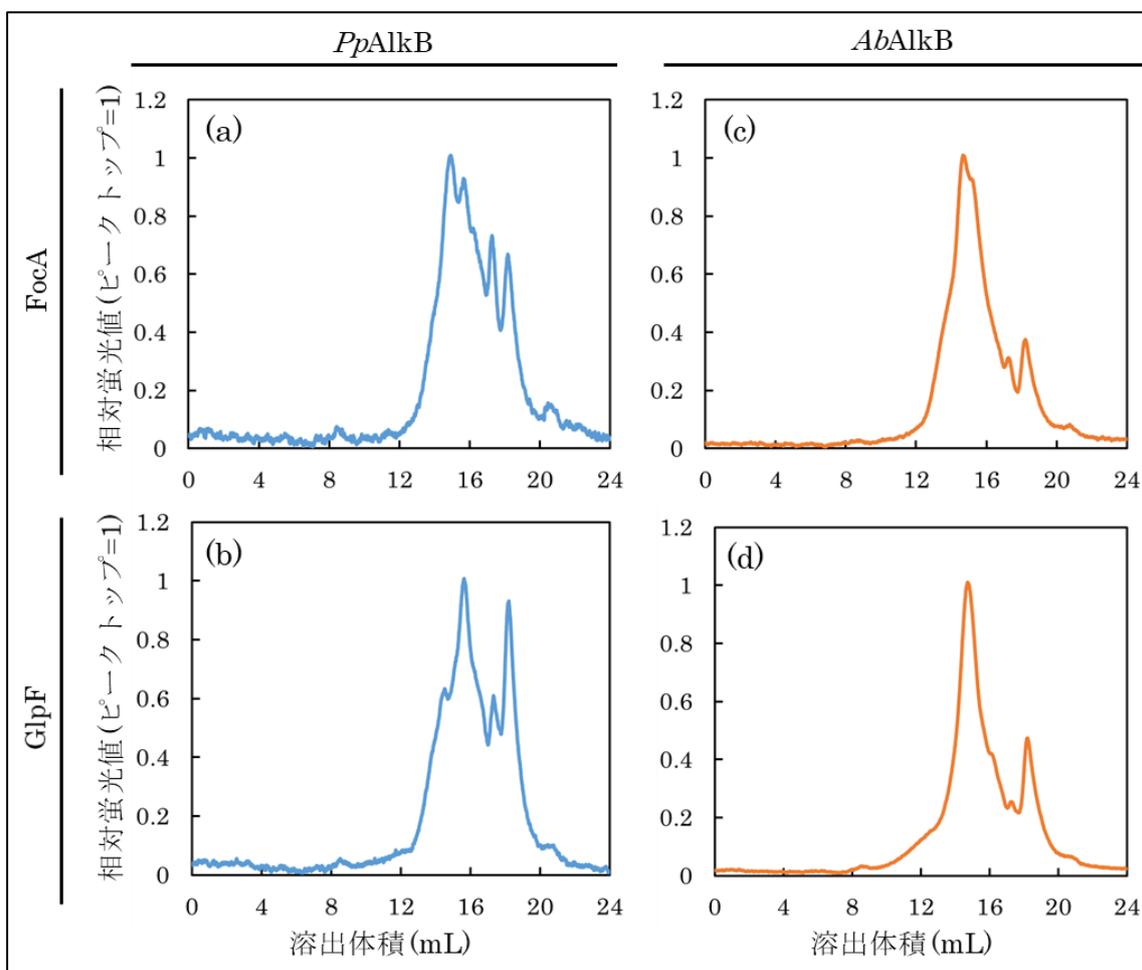


図 31 | AlkB 融合体の FSEC を用いた会合状態の確認。(a) *PpAlkB*-FocA、(b) *PpAlkB*-GlpF、(c) *AbAlkB*-FocA、(d) *AbAlkB*-GlpF のクロマトグラム。縦軸はピークトップを 1 としたときの相対蛍光値、横軸は溶出体積を示す。カラムは Superose6 increase 10/300 を使用した。

次に、*AbAlkB*-FocA と *AbAlkB*-GlpF の精製を行った。*AbAlkB* に融合させた GFP の

C 末端に His タグが付加してあるため、固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー (IMAC) による精製を行った。その結果、*AbAlkB*-FocA と *AbAlkB*-GlpF のどちらも純度が低く、切断が生じていることが判明した。プロテアーゼ阻害剤を添加して精製を行ったにもかかわらず切断が生じていたため、発現時に生じていることが示唆された (図 32)。

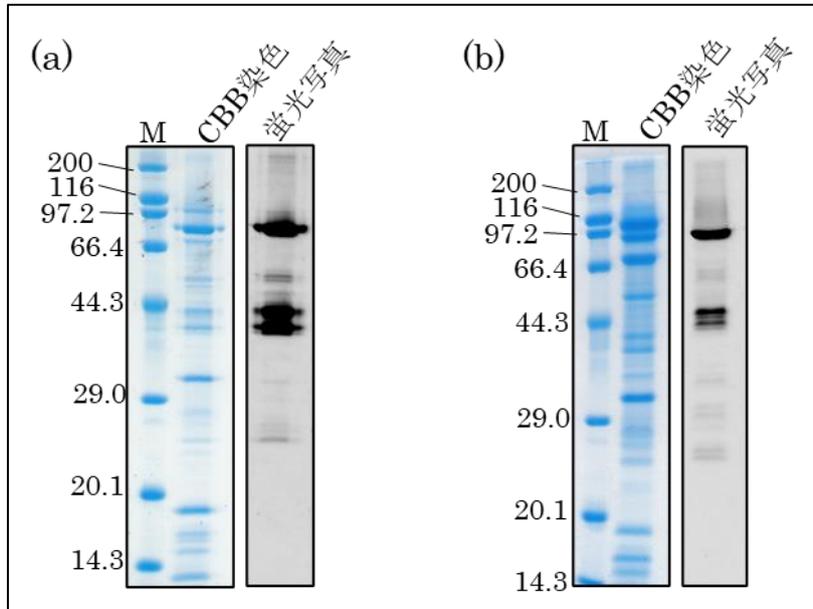


図 32 | (a) *AbAlkB*-FocA (109 kDa) と (b) *AbAlkB*-GlpF (108 kDa) の IMAC による精製後の SDS-PAGE 像。M は分子量マーカを示す (単位 : kDa)。

続いてこれらの会合状態を、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて確認を行った。その際、蛋白質の吸収波長である 280 nm に加えて GFP の吸収波長である 492 nm の吸光度をモニターすることで *AbAlkB* 融合体の挙動を観測した。その結果、どちらの *AbAlkB* 融合体も均一な会合状態ではなく、*AbAlkB* 融合体の切断やオリゴマーの解離が生じていることが判明した (図 33)。また、ゲルろ過クロマトグラフィーを行っても分離できていないことから、切断は *AbAlkB* と FocA または GlpF の間で生じており、*AbAlkB* が切断された単量体と、切断されていない単量体が混在したオリゴマーを形成していると推察される。これらの結果から、FocA と GlpF は AlkB に融合する膜タンパク質として不適當であることが分かった。

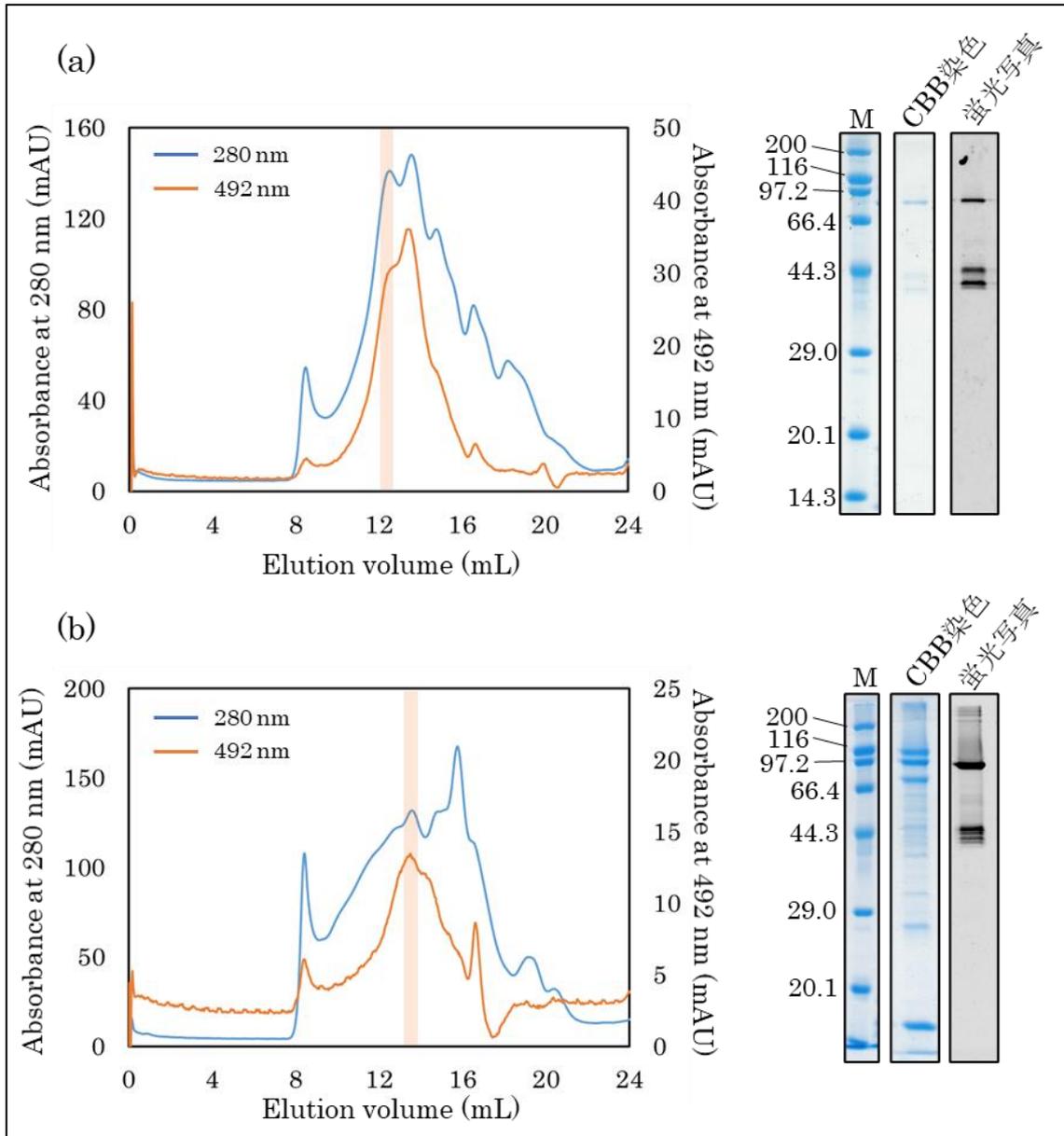


図 33 | (a) *AbAlkB-FocA* と (b) *AbAlkB-GlpF* のゲルろ過クロマトグラフィの結果と SDS-PAGE 像。クロマトグラム中の色付き部分を SDS-PAGE 像で示している。M は分子量マーカを示す (単位 : kDa)。カラムは Superose6 increase 10/300 を使用した。

1-3. アンモニアトランスポーター AmtB 融合 *AbAlkB* の調製法の確立

FocA 及び *GlpF* は *AlkB* に融合させる膜タンパク質として適していないことが判明したため、再度 PDB から高い対称性を持つオリゴマーの膜タンパク質の探索を行い、三量体を形成するアンモニアトランスポーターの *AmtB* を選定した (図 34)。*AmtB* は N 末端が細胞外、C 末端が細胞内に存在するため、*AmtB* の C 末端に *AlkB* を融合させ、更に *AlkB* の

C 末端に検出用の GFP を融合させたコンストラクトを作製した。FocA と GlpF を用いた際に *PpAlkB* を融合させるとオリゴマーが解離していたため、AmtB-AbAlkB-GFP (以降 GFP の表記は省略) を作製した。

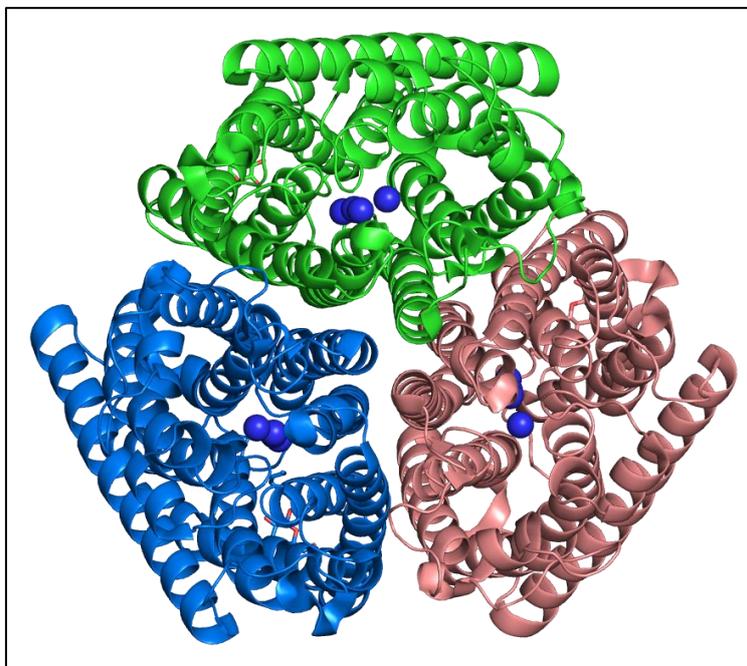


図 34 | AmtB (PDB ID: 1U7G) の結晶構造。単量体ごとに色を変えて表示した。

大腸菌の細胞膜に発現することが確認できたため、DDM での可溶化と IMAC による精製を行った。AmtB-AbAlkB の DDM による可溶化効率は 19 %であり、以前のコンストラクトと比べて効率が 1/3 以下になっていた。AmtB-AbAlkB の精製を IMAC で行ったところ、以前のコンストラクトと同様に切断が生じていることが分かった (図 35)。続いてこの試料のゲルろ過クロマトグラフィー精製を行い、会合状態を評価した。AmtB-AbAlkB は単量体が 121 kDa で、三量体を形成すると 363 kDa となり、約 13mL 付近で溶出する。AmtB-AbAlkB は、三量体以上のオリゴマーも存在するが、以前のコンストラクトと比較して単分散な状態であった (図 35)。更に、ゲルろ過クロマトグラフィーを行うことで切断された AmtB-AbAlkB を除去できていた。ゲルろ過クロマトグラフィー後の SDS-PAGE 像から、AmtB-AbAlkB のバンドが複数見られるが、AmtB は非常に安定なため SDS と混合しても一部のオリゴマーが解離せず二量体と三量体のバンドが生じることが過去に報告されており、これらのバンドも二量体または三量体の AmtB-AbAlkB であると推察した。

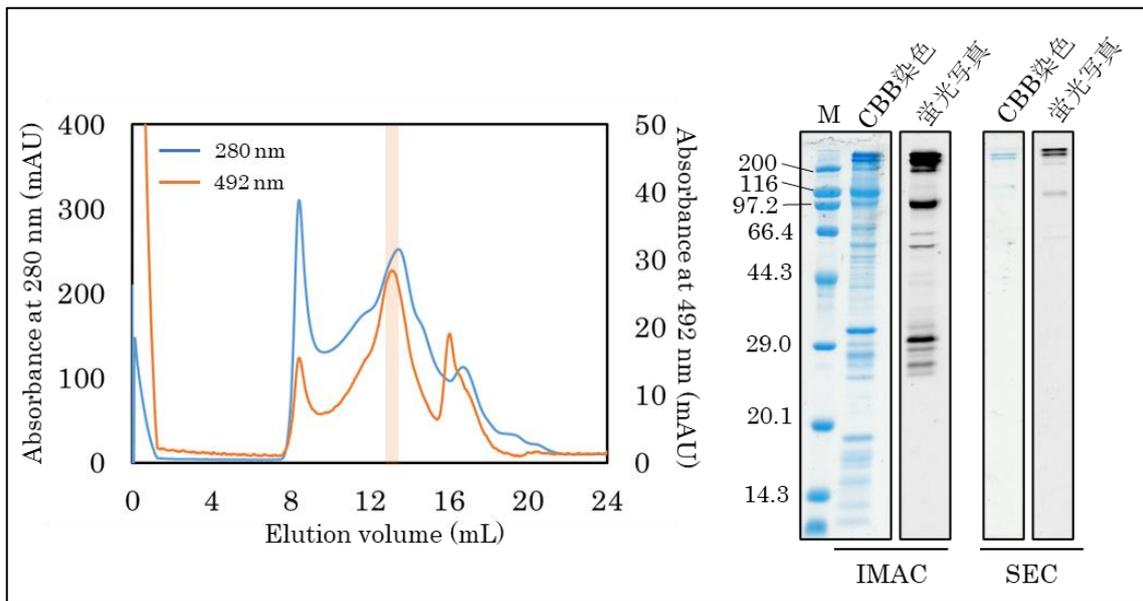


図 35 | AmtB-AbAlkB のゲルろ過クロマトグラフィーの結果と IMAC、SEC 後の SDS-PAGE 像。SEC 後の SDS-PAGE にはクロマトグラム中の色付き部分のサンプルを用いた。Mは分子量マーカを示す (単位 : kDa)。カラムは Superose6 increase 10/300 を使用した。

精製した AmtB-AbAlkB の形状を調べるために、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察を行った。その結果、AmtB の直径約 80 \AA より大きい、直径 $130\text{-}150 \text{ \AA}$ 程度の円状の粒子が多数観測され、これらは AmtB-AbAlkB であると考えられる (図 36)。中には AmtB の中心の孔と思われる構造が見える粒子像も確認できた。しかしながら、粒子径が不均一で非常に小さい粒子も多数観測され、これらは精製後にオリゴマーが解離したものであると推察した。

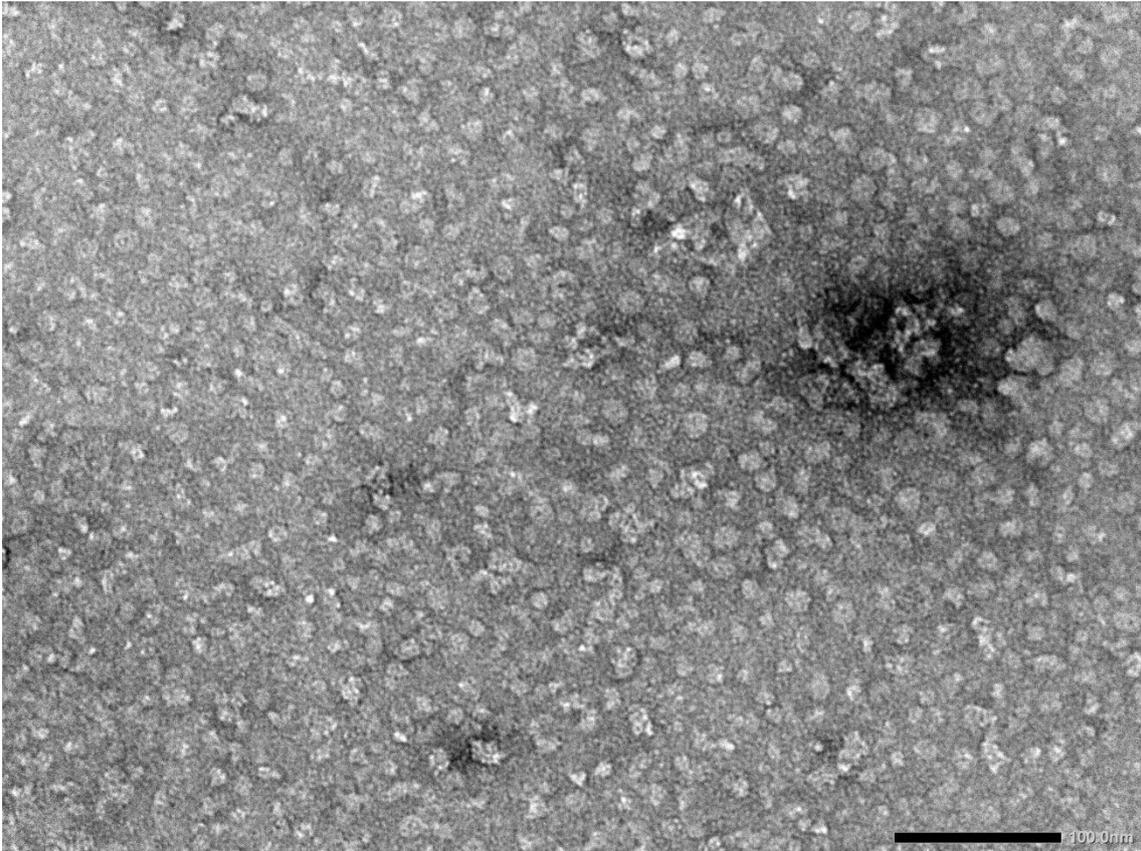


図 36 | AmtB-AbAlkB の TEM 観察像。右下のスケールバーは 100 nm を示す。

高純度で単分散な AmtB-AbAlkB を調製することができたが、可溶化の効率が低いため、大腸菌 22 g から AmtB-AbAlkB が約 0.3 mg しか得られず、収量が非常に少ないことが問題となった。そこで、可溶化の際に用いる界面活性剤を変更することで可溶化効率の改善を試みた。DDM を含む界面活性剤と両親媒性ポリマーのスチレンマレイン酸コポリマー (SMA) など、計 8 種類の条件 (図 37) で AmtB-AbAlkB を可溶化したところ、Fos-Choline14 (FC14) を用いた際に最も高い可溶化効率を示した (図 38)。FC14 で可溶化した AmtB-AbAlkB の会合状態を FSEC で分析したところ、三量体以上のオリゴマーや解離した AmtB-AbAlkB も存在しているが、主に三量体として存在していることが分かった (図 39)。

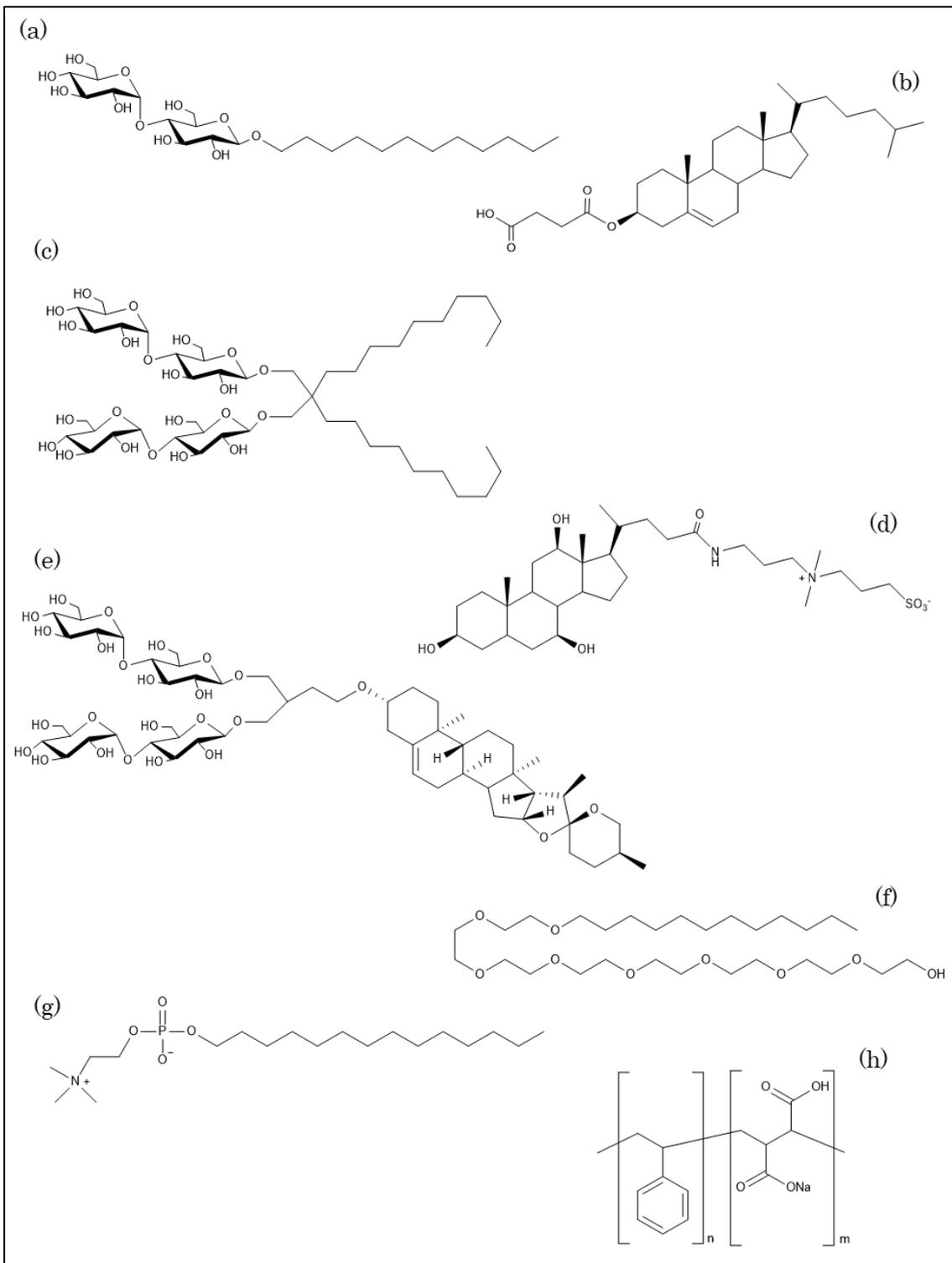


図 37 | 界面活性剤の構造式 (a) *n*-Dodecyl-β-D-maltoside (DDM), (b) Cholesteryl hemisuccinate (CHS), (c) Lauryl maltose neopentyl glycol (LMNG), (d) CHAPS, (e) Glycodiosgenin (GDN), (f) C₁₂E₈, (g) Fos-choline 14 (FC14), (h) Styrene-maleic acid copolymer (n : m = 2 : 1) (SMA)

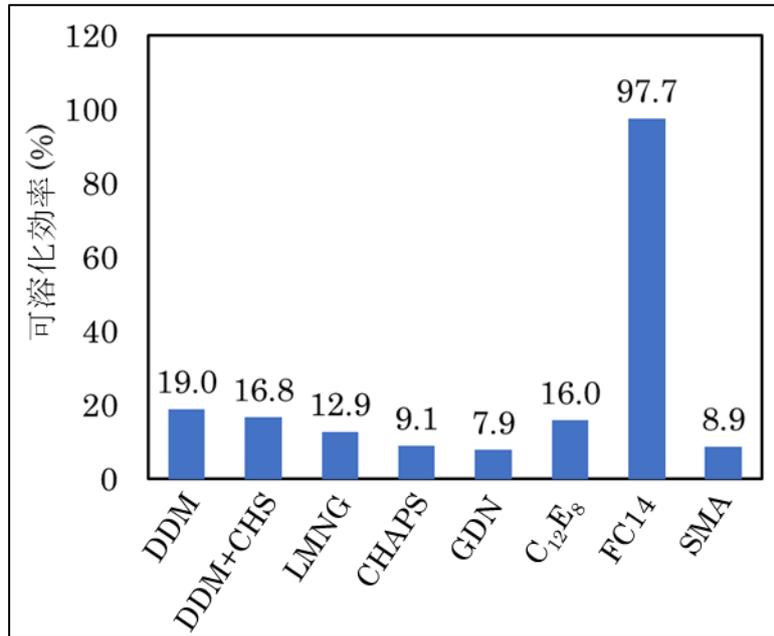


図 38 | AmtB-*AbAlkB* の可溶化効率。縦軸は可溶化効率、横軸は使用した界面活性剤を示す。棒グラフ上の数値は可溶化効率 (%) を示す。

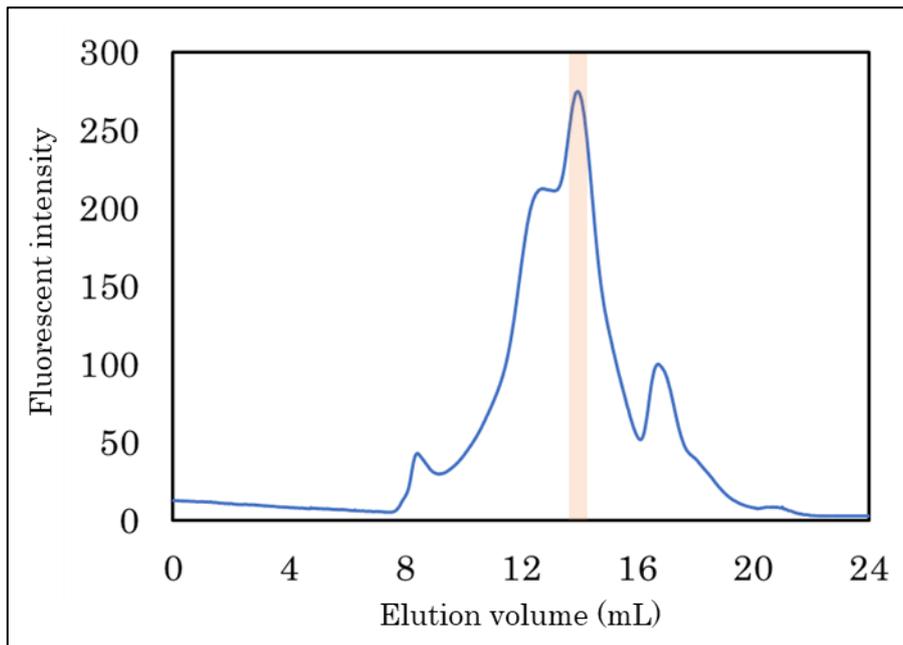


図 39 | FC14 で可溶化した AmtB-*AbAlkB* の FSEC による会合状態の確認。縦軸は蛍光強度、横軸は溶出体積を示す。クロマトグラム中の色付き部分は三量体 AmtB-*AbAlkB* の溶出位置を示す。カラムは Superose6 increase 10/300 を使用した。

次に、FC14 で可溶化した AmtB-AbAlkB の精製をこれまでと同様の方法で行った。高純度な AmtB-AbAlkB を調製することができたが、三量体以上のオリゴマーが存在していた (図 40)。界面活性剤を変えることで三量体以上のオリゴマーが増えているが、ゲルろ過クロマトグラフィーで分離できており、Cryo-EM 単粒子解析の際に大きな分子は排除できるため問題ないと判断した。また、FC14 で可溶化・精製を行うことで、大腸菌 25 g から AmtB-AbAlkB が約 4.2 mg 得られ、収量を 10 倍以上に増やすことができた。今後、精製条件を検討し三量体以上にオリゴマー化した AmtB-AbAlkB を減らすことができれば、更に収量が向上することが期待される。

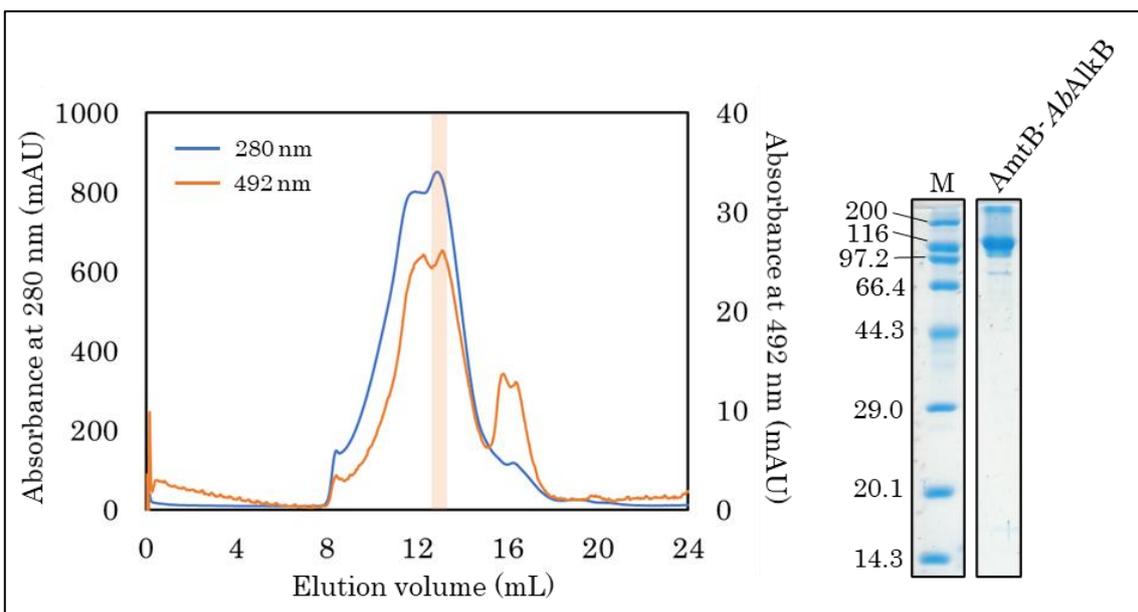


図 40 | FC14 で可溶化した AmtB-AbAlkB のゲルろ過クロマトグラフィーの結果と SDS-PAGE 像。クロマトグラム中の色付き部分は三量体 AmtB-AbAlkB の溶出位置を示し、このサンプルの SDS-PAGE 分析を行った。M は分子量マーカを示す (単位 : kDa)。カラムは Superose6 increase 10/300 を使用した。

三量体の AmtB-AbAlkB のみを回収し、TEM による観察を行った。DDM で精製した AmtB-AbAlkB と同じく直径 130-150 Å 程度の円状の粒子が多数観測され、それより小さい三量体が解離したと思われる粒子も存在した (図 41)。

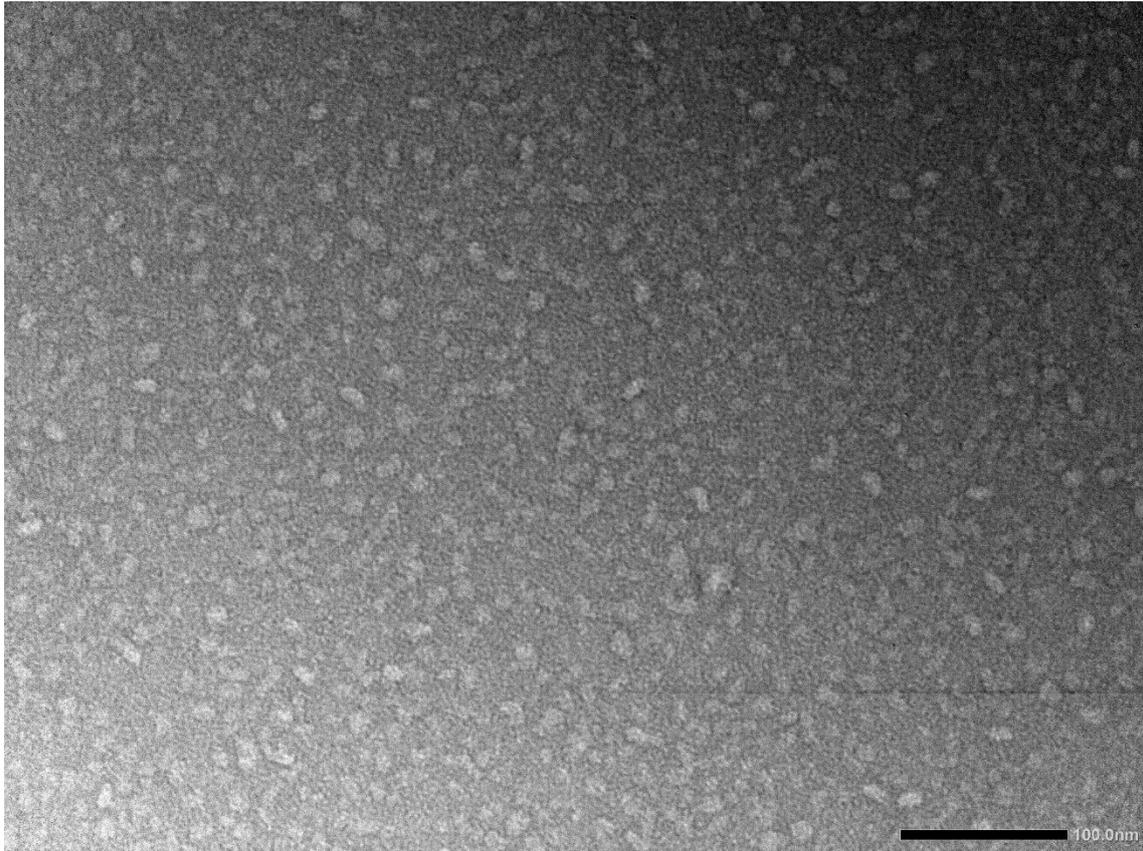


図 41 | FC14 で可溶化した AmtB-AbAlkB の TEM 観察像。右下のスケールバーは 100 nm を示す。

精製後に AmtB-AbAlkB が解離する原因として、AmtB と AbAlkB を繋ぐリンカー部分の揺らぎが大きく不安定になっていることが考えられた。そこで、ディスク状の脂質粒子に膜タンパク質を埋め込み、可溶化した状態で脂質環境を再現可能な Nanodisc 再構成法を AmtB-AbAlkB に対して行うことで揺らぎを抑えることができ、安定化すると予測した。Nanodisc 再構成法は、再構成時の膜タンパク質と膜骨格タンパク質 (MSP) と脂質の混合比が重要であるため、様々な条件で再構成した後ゲルろ過クロマトグラフィーを行い、三量体の AmtB-AbAlkB が最も多い条件を探索した。その結果、AmtB-AbAlkB : MSP : 脂質 = 1 : 3 : 100 (モル比) で再構成した AmtB-AbAlkB が最も三量体が多く存在していることが分かった (図 42)。また、MSP の量が少ない、または脂質の量が多い条件で凝集体が増える傾向が見られた。

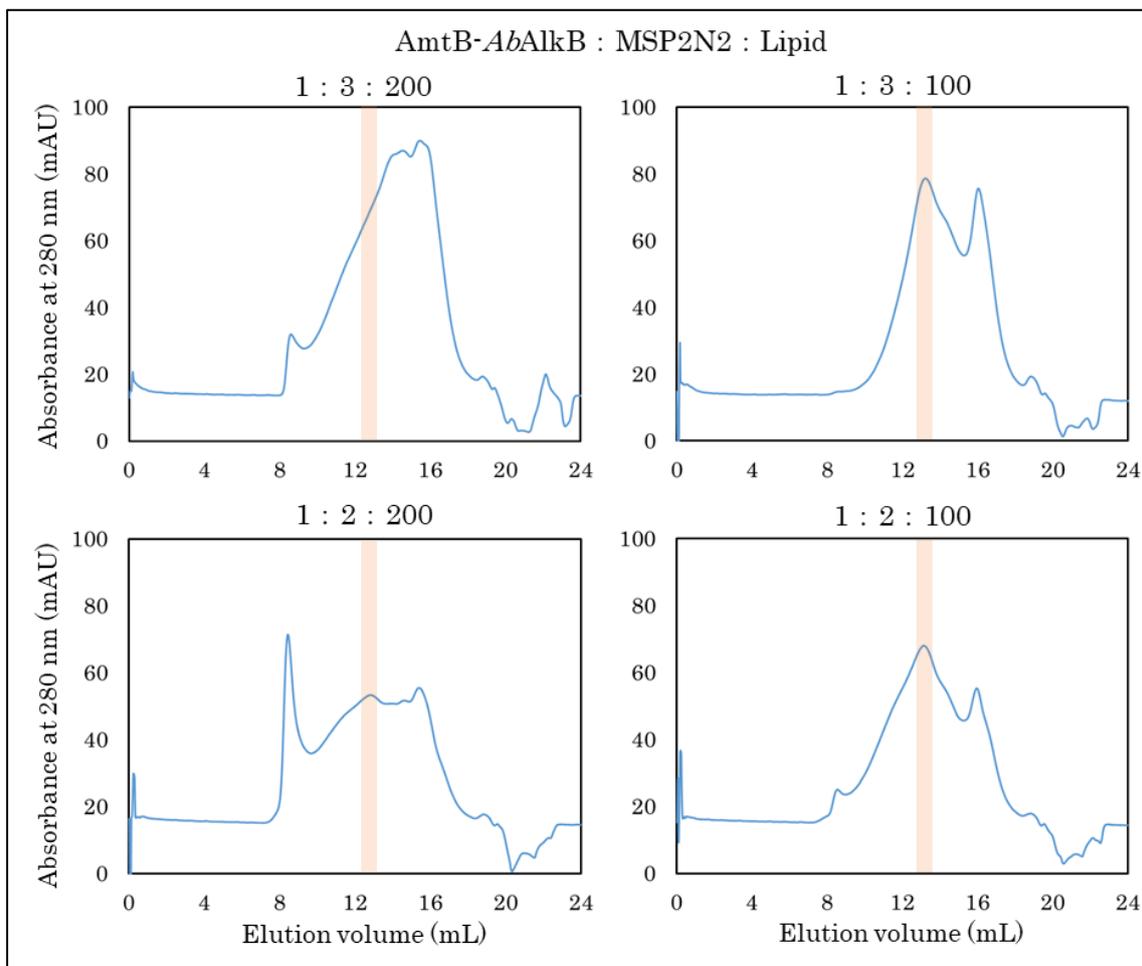


図 42 | AmtB-AbAlkB の Nanodisc 再構成の条件検討。各クロマトグラムの上に混合比を示した。クロマトグラム中の色付き部分は Nanodisc 再構成された AmtB-AbAlkB の溶出位置を示す。カラムは Superose6 increase 10/300 を使用した。

Nanodisc 再構成した AmtB-AbAlkB を TEM で観察したところ、直径 150 Å 前後の均一な粒子が多く見られた (図 43)。今回用いた MSP2N2 は直径 150-170 Å 程度の脂質ディスクを形成することが知られており、観察された粒子は妥当な大きさであった。一部小さな粒子も見られるが、DDM 及び FC14 で精製した AmtB-AbAlkB より、存在する割合が低くなっていた。したがって、FC14 で可溶化、精製した AmtB-AbAlkB を Nanodisc 再構成することで三量体を形成した均一な粒子径の試料が得られることが分かった。

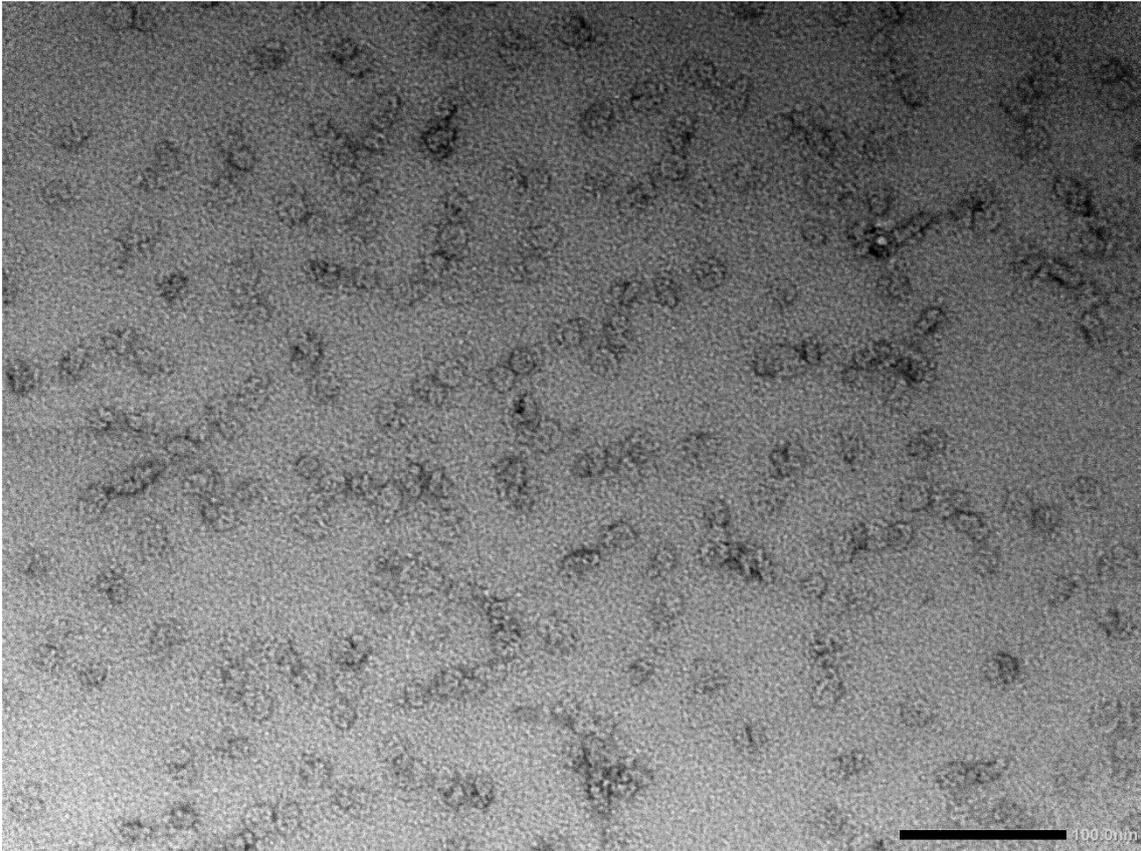


図 43 | Nanodisc 再構成した AmtB-AbAlkB の TEM 観察像。右下のスケールバーは 100 nm を示す。

1-4. *PpAlkB* の変異体解析

これまでに AlkB の構造解析に向けて結晶化や、Cryo-EM 単粒子解析に向けた新規手法の開発などを行ってきたが未だに立体構造を明らかにできていない。そこで、van Beilen らの先行研究^[104]を参考に、*PpAlkB* のアミノ酸配列、二次構造予測、膜貫通領域予測から基質結合ポケットを形成する残基を推定し、変異体の作製及び解析を行った。

まず初めに、本研究で調製した野生型 *PpAlkB* が先行研究と同じく炭素数 5-12 の直鎖状アルカンの水酸化活性があるか調べるために活性測定を行った。その結果、本研究で調製した *PpAlkB* は炭素数 5-12 の直鎖状アルカンの水酸化し 1-アルコールを生成することを確認できた (図 44)。また、野生型 *PpAlkB* はヘプタン水酸化活性が最も高く、ヘプタンより炭素鎖長が短くまたは長くなるにつれて徐々に活性が低くなることが分かった。

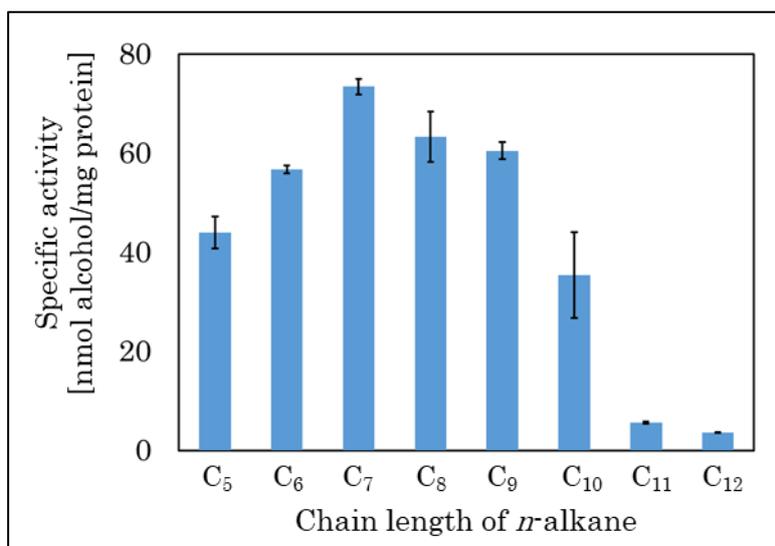


図 44 | 野生型 *PpAlkB* の活性測定 ($n=3$)。縦軸は *PpAlkB* の比活性、横軸は反応に用いた直鎖状アルカンの炭素鎖長を示す。

これは基質または生成物と *AlkB* の親和性の違いによって生じていると考えられる。*AlkB* と基質及び生成物の相互作用は疎水性相互作用であるため、炭素数が多いほどその相互作用は強くなる。炭素数が少ないペンタンは他のアルカンより親和性が低く反応効率が落ちるため活性が低くなり、逆に炭素数が多いドデカンは親和性が高く反応効率も高いが生成物の 1-アルコールの親和性も高いため、基質結合ポケットからの脱離が起こりにくく結果として反応効率の低下が引き起こされると考えられる。ヘプタンが基質の結合と生成物の脱離のバランスが取れていたため最も比活性が高くなったと推察した。

次に、*PpAlkB* の変異体を設計するために二次構造予測と膜貫通領域の予測を行った。二次構造予測には PSIPRED サーバー^[152] (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)、膜貫通領域の予測には TMHMM サーバー (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) を用いた。

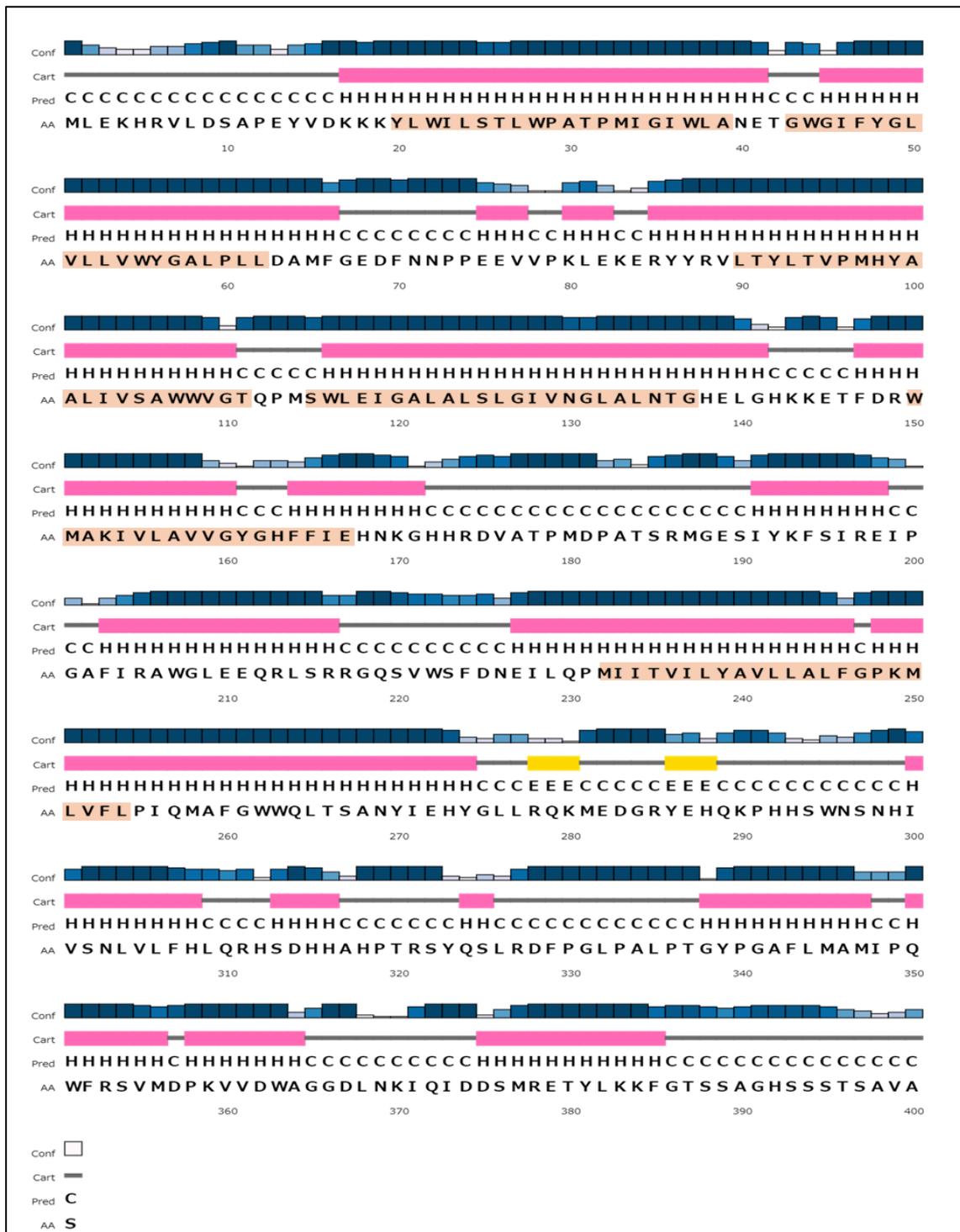


図 45 | *PpAlkB* の二次構造予測と膜貫通領域の予測。図中のピンクのバーはヘリックス、黄色のバーはストランドを示す。配列中の色付き部分は予測された膜貫通領域を示す。

PpAlkB の水酸化可能なアルカンの炭素鎖長の上限を決めている Trp55 は二本目の膜貫通ヘリックスの中心付近に存在していた (図 45)。この Trp55 と活性中心の間に存在する

基質結合ポケットを埋めるような変異を導入することで低級アルカンの水酸化能を付与した AlkB を作製できると考えた。変異導入によって基質結合ポケットが埋まり狭まっていることは、水酸化可能なアルカンの炭素数の上限を調べることで、取り扱いが困難な低級アルカンを使わず、簡易的に確認することができる。変異体を作製し、水酸化可能なアルカンの炭素鎖長の上限の変化を調べることで、低級アルカン水酸化能が付与されている可能性のある変異体の目星をつけることを目的とした。

膜貫通ヘリックスが α ヘリックスであると仮定すると、Trp55 から 3-4 残基後のアミノ酸側鎖は、Trp55 と隣接し、活性中心が存在する細胞質側に位置すると予測される。そこでまず初めに、Trp55 の 4 残基後の Leu59 を Phe に変異させることで水酸化可能なアルカンの炭素鎖長の上限が短くなることを期待し、この変異体を作製した。野生型 *PpAlkB* と同様に、炭素数 5-12 の直鎖状アルカンを経験に用いて L59F 変異体の活性測定を行った。その結果、L59F 変異体は野生型 *PpAlkB* と比べて活性が向上しており、オクタンを経験として用いた際に比活性が最も高いことが分かった (図 46)。更に、基質にドデカンを経験を用いて反応を行ったが、1-ドデカノールは検出されなかった。

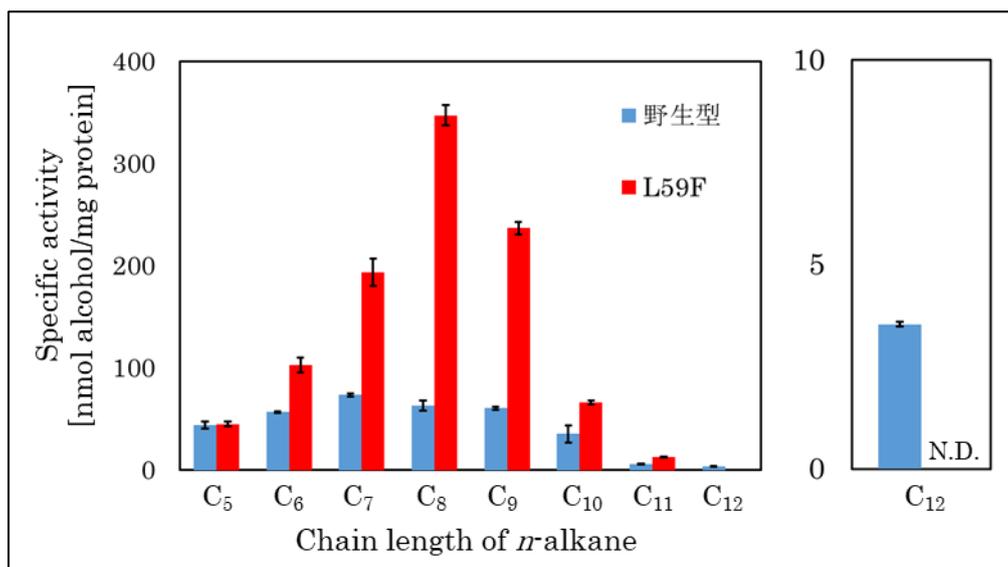


図 46 | L59F 変異体の活性測定 ($n=3$)。右の棒グラフはドデカン水酸化活性の拡大図を示す。縦軸は *PpAlkB* の比活性、横軸は反応に用いた直鎖状アルカンの炭素鎖長を示す。N.D.= not detected.

予想した通り、L59F 変異体は水酸化可能なアルカンの炭素鎖長の上限が短くなるように変化した。 α ヘリックスの 1 ピッチは約 5.4 Å で、アルカンの C-C 結合の距離は約 1.5 Å であるため、炭素 3 つ分程度の空間が埋まると予測していたが、実際に水酸化可能なアル

カンの炭素数の上限から変化した炭素数は 1 つ分であった。これは第二膜貫通ヘリックスが細胞膜に対して垂直ではなく少し斜めになっていて Phe 側鎖の一部しか基質結合ポケットに面していなかった、または基質結合ポケットに面しておらず、側鎖が大きくなったことで立体構造が少し変化して間接的に基質結合ポケットを埋めた可能性があるかと推察した。活性の向上の原因は、基質と AlkB の相互作用が強まったことや、基質結合ポケットが埋まり AlkB の安定性が向上したなど、様々な可能性が考えられるが、詳細は不明である。

更に水酸化可能なアルカンの炭素鎖長の上限を短くするために Trp55 から 7 残基後に存在する Leu62 を Phe に変異させた L62F 変異体を作製した。L62F 変異体の活性測定を行ったところ、水酸化可能なアルカンの炭素鎖長の上限は野生型と同じであった (図 47)。また、L62F 変異体は L59F 変異体と同様に、野生型より比活性が向上していた。

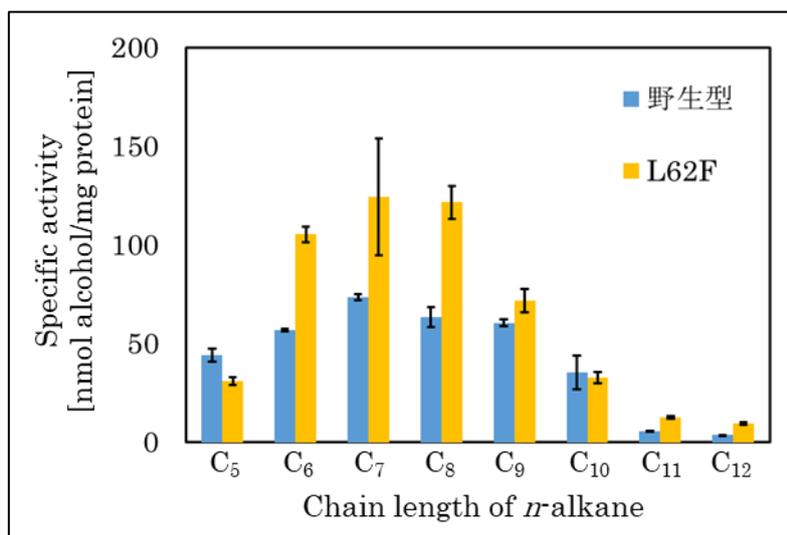


図 47 | L62F 変異体の活性測定 ($n=3$)。縦軸は *PpAlkB* の比活性、横軸は反応に用いた直鎖状アルカンの炭素鎖長を示す。

Leu62 は Leu59 より更に活性中心に近い場所に位置すると予測されるが、水酸化可能なアルカンの炭素鎖長の上限に変化はなかった。これは Leu62 が基質結合ポケットに面していない、または L62F では埋めることができないほどの空洞が存在することが原因として考えられる。また、L62F 変異体の活性も向上しており、L59F 変異体の活性の向上と同様の原因であると考えられる。

Leu62 は膜貫通領域の細胞質側の端であるため、ヘリックスの 1 ピッチ後の残基に変異導入することは不可能である。そこで、Trp55 が膜貫通領域の細胞外側から 13 残基目に存

在することから、他の膜貫通ヘリックスの細胞外側から 13 残基目近傍にあるアミノ酸に変異導入することを試みた。第四膜貫通ヘリックスの 13 残基目は Gly127 であり、Trp55 と向かい合っていると仮定すると、立体障害が起こらないような構造になっていると考えられる。この Gly127 から 4 残基後は Gly131 であり Phe などの大きな側鎖を持つアミノ酸に変異させると構造が壊れ発現しなくなることが予測される。そのため、Gly131 の近くに位置し、小さな疎水性側鎖を持つ Val129 を Phe に変異させた V129F 変異体を作製した。V129F 変異体の活性測定を行ったところ、水酸化可能なアルカンの炭素鎖長の上限は野生型と同じくドデカンであったが、他の変異体と同様に活性が向上していることが分かった (図 48)。

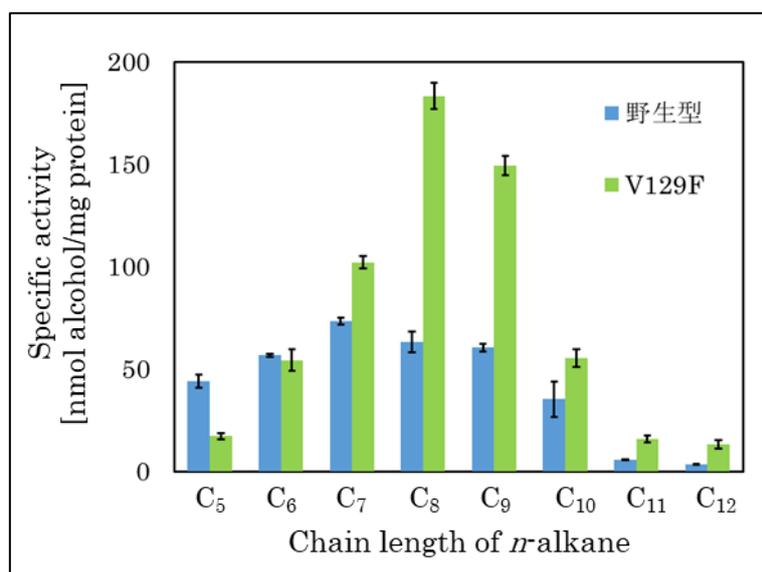


図 48 | V129F 変異体の活性測定 ($n=3$)。縦軸は *PpAlkB* の比活性、横軸は反応に用いた直鎖状アルカンの炭素鎖長を示す。

V129F 変異体は水酸化可能なアルカンの炭素鎖長の上限が変化しなかった。これは、Val129 が Trp55 と近い位置に存在する、または基質結合ポケットに面していないことが原因として考えられる。また、Val129 の位置の予測は膜貫通ヘリックスが細胞膜に対して垂直に配向していることを前提にしているため、この結果から膜貫通ヘリックスは細胞膜に対して斜めに配向していると予測される。

これまでに作製した変異体はいずれも野生型より活性が向上していた。これらの変異体は全て小さい疎水性側鎖を持つアミノ酸残基を芳香族アミノ酸の Phe に変異させており、基質と CH \cdot π 相互作用を形成し基質親和性が向上したこと、または膜貫通ヘリックス間の相互作用が強まり AlkB の熱安定性が向上したことなどが生じていると推察した。

操作

1-5. AlkB の発現・精製

PpAlkB 及び *AbAlkB* 遺伝子のコドンが大腸菌発現系に最適化し、人工合成した。以降の操作は *PpAlkB* と *AbAlkB* で共通である。AlkB の C 末端に Strep タグを付加するように発現ベクター-pET28b に導入し発現ベクターを構築した。このベクターをヒートショック法で大腸菌 C41(DE3) 株に導入し、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ カナマイシン (Kana) を含む LB 培地を用いて 30 $^{\circ}\text{C}$ で培養を行った。OD₆₀₀=0.5 で Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度 0.5 mM となるように添加した後、更に 6 時間培養を行った。その後、培養液を 4 $^{\circ}\text{C}$ 、6,640 $\times g$ で遠心分離し、菌体を回収した。

菌体を 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Sm2 ヌクレアーゼを含む AlkB Buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 15 % (v/v) Glycerol) で懸濁し氷上で超音波破碎を行った。破碎液を 4 $^{\circ}\text{C}$ 、6,640 $\times g$ で 30 分間遠心分離し、上清を回収した。上清を更に 117,300 $\times g$ で 1 時間、超遠心分離を行い、沈殿した細胞膜を回収した。細胞膜を再び AlkB Buffer で懸濁し、これを膜画分とした。膜画分のタンパク質濃度を BCA アッセイキット (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定し、AlkB Buffer で 5 mg/mL に調製した。その後、界面活性剤の DDM を 0.5 % となるように添加し、4 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間攪拌して可溶化を行った。可溶化後、117,300 $\times g$ で 30 分間、超遠心分離を行い、上清を回収した。上清を 5 mL の Strep-tactin 担体にアプライし、AlkB を吸着させた後、10 カラム体積 (cv) の AlkB Wash Buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 15 % Glycerol, 0.02 % DDM) で担体を洗浄した。その後 AlkB Elution Buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 15 % Glycerol, 0.02 % DDM, 5 mM Desthiobiotin) で AlkB を溶出させた。溶出試料を 50 kDa cut-off Amicon Ultra-15 concentrator (Merck) で体積が 300 μL 以下になるまで濃縮し、*PpAlkB* は Superose6 increase 10/300 (GE Healthcare)、*AbAlkB* は Superdex200 10/300 (GE Healthcare) でゲルろ過クロマトグラフィーを行った。カラムはそれぞれ AlkB Wash Buffer で平衡化したものを使用した。単量体の AlkB のピークフラクションを回収し、それぞれ 10 mg/mL 程度まで 50 kDa cut-off Amicon Ultra-4 concentrator で濃縮し、-80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

1-6. FocA、GlpF 融合 AlkB の発現と会合状態の確認

FocA、GlpF の遺伝子を大腸菌 DH5 α 株から PCR でクローニングした。FocA と GlpF

は *AbAlkB* と *PpAlkB* の C 末端に融合するように、各遺伝子断片を Hi-Fi Assembly システム (NEB) で pWaldo ベクターに組み込んだ。これらの発現ベクターを C41(DE3) 株に導入し、25 μg/mL Kana を含む LB 培地を用いて 37°C で培養を行った。OD₆₀₀=0.5 で IPTG を終濃度 0.5 mM となるように添加した後、30°C で 6 時間培養した。その後、培養液を 4 °C、6,640 xg で遠心分離し、菌体を回収した。

菌体を 5 μg/mL Sm2 ヌクレアーゼとプロテアーゼ阻害剤 A (1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 μM E-64, 10 μM Pepstatin A) を含む buffer A (20 mM Tris-HCl pH7.5, 200 mM NaCl, 20 % Glycerol) で懸濁し氷上で超音波破碎を行った。破碎液を 4 °C、6,640 xg で 30 分間遠心分離し、上清を回収した。上清を更に 117,300 xg で 1 時間、超遠心分離を行い、沈殿した細胞膜を回収した。細胞膜を再び buffer A で懸濁し、これを膜画分とした。膜画分のタンパク質濃度を BCA アッセイキット (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定し、buffer A で 5 mg/mL に調製した。その後、界面活性剤の DDM を 1.0 % となるように添加し、4 °C で 1 時間攪拌して可溶化を行った。可溶化後、117,300 xg で 30 分間、超遠心分離を行い、上清を回収した。上清 10 μL を、0.02 % DDM を含む buffer A で平衡化した Superose6 increase 10/300 カラムと、蛍光検出器 (RF-20A, 島津製作所) を用いた蛍光検出ゲルろ過クロマトグラフィー (FSEC) により分析した。その際、GFP の蛍光を検出するために、励起波長 : 492 nm、蛍光波長 : 512 nm でモニターした。

1-7. FocA、GlpF 融合 *AbAlkB* の精製

タンパク質濃度 5 mg/mL の膜画分に終濃度 1.0 % DDM となるように添加し、4 °C で 1 時間攪拌して可溶化を行った。可溶化後、117,300 xg で 30 分間、超遠心分離を行い、上清を回収した。上清と TALON 担体を混合し、ローテーターを用いて 4 °C で一晩攪拌した。これを空のカラムに充填し、0.04 % DDM 及びプロテアーゼ阻害剤 B (0.5 mM 4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF), 10 μM E-64, 10 μM Pepstatin A) を含む IMAC wash buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5, 200 mM NaCl, 20 % Glycerol, 5 mM Imidazole) で担体を洗浄した後、0.04 % DDM 及びプロテアーゼ阻害剤 B を含む IMAC elution buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5, 200 mM NaCl, 20 % Glycerol, 200 mM Imidazole) で融合体 AlkB を溶出させた。その後、100 kDa cut-off Amicon Ultra-4 concentrator で試料の体積が 400 μL 以下になるまで濃縮し、0.02 % DDM を含む buffer A で平衡化した Superose6 increase 10/300 カラムにアプライした。ピークフラクションを 100 kDa cut-off Amicon Ultra-4 concentrator で濃縮し、-80 °C で保存した。

1-8. AmtB-AbAlkB の発現・精製

AmtB の遺伝子を大腸菌 DH5 α 株から PCR でクローニングした。AmtB の C 末端に AbAlkB を融合するように、各遺伝子断片を Hi-Fi Assembly システムで pWaldo ベクターに組み込んだ。この発現ベクターをヒートショック法で大腸菌 C43(DE3) 株に導入し、25 $\mu\text{g/mL}$ Kana を含む LB 培地を用いて 37°C で培養を行った。OD₆₀₀=0.5 で IPTG を終濃度 0.1 mM となるように添加した後、22°C で 20 時間培養した。その後、培養液を 4 °C、6,640 $\times g$ で遠心分離し、菌体を回収した。

菌体を 5 $\mu\text{g/mL}$ Sm2 ヌクレアーゼとプロテアーゼ阻害剤 A を含む buffer A (20 mM Tris-HCl pH7.5, 200 mM NaCl, 20 % Glycerol) で懸濁し氷上で超音波破碎を行った。破碎液を 4 °C、6,640 $\times g$ で 30 分間遠心分離し、上清を回収した。上清を更に 117,300 $\times g$ で 1 時間、超遠心分離を行い、沈殿した細胞膜を回収した。細胞膜を再び buffer A で懸濁し、これを膜画分とした。膜画分のタンパク質濃度を BCA アッセイキット (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定し、buffer A で 5 mg/mL に調製した。その後、DDM または FC14 を終濃度 1.0 % となるように添加し、4 °C で 1 時間攪拌して可溶化を行った。可溶化後、117,300 $\times g$ で 30 分間、超遠心分離を行い、上清を回収した。上清と TALON 担体を混合し、ローテーターを用いて 4 °C で一晩攪拌した。これを空のカラムに充填し、0.04 % DDM または FC14、プロテアーゼ阻害剤 B を含む IMAC wash buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5, 200 mM NaCl, 20 % Glycerol, 5 mM Imidazole) で担体を洗浄した後、0.04 % DDM 及びプロテアーゼ阻害剤 B を含む IMAC elution buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5, 200 mM NaCl, 20 % Glycerol, 200 mM Imidazole) で融合体 AlkB を溶出させた。その後、100 kDa cut-off Amicon Ultra-4 concentrator で試料の体積が 400 μL 以下になるまで濃縮し、0.02 % DDM または FC14 を含む buffer A で平衡化した Superose6 increase 10/300 カラムにアブライした。ピークフラクションを 100 kDa cut-off Amicon Ultra-4 concentrator で濃縮し、-80 °C で保存した。

1-9. AmtB-AbAlkB の界面活性剤の検討

AmtB-AbAlkB が発現した膜画分に、1 % DDM、1 % DDM+0.2 % CHS、1 % LMNG、1.5 % CHAPS、1 % GDN、1 % C₁₂E₈、1 % FC14、2 % SMA をそれぞれ添加して、4°C で 1 時間、転倒混和することで可溶化した。SMA のみ一晩、転倒混和することで可溶化した。その後、117,300 $\times g$ で 30 分間、超遠心分離を行い、上清を回収した。この上清を、0.02 % DDM、0.02 % DDM+0.004 % CHS、0.01 % LMNG、1 % CHAPS、0.01 % GDN、0.02 %

C₁₂E₈、0.02 % FC14 をそれぞれ含む buffer A でそれぞれ平衡化した Superose6 increase カラムを用いた FSEC により分析した。その際、可溶化に用いた界面活性剤と buffer A に含まれる界面活性剤は同じになるようにし、SMA は buffer A を用いて FSEC を行った。

1-10. MSP2N2 の発現・精製

pMSP2N2 (addgene) をヒートショック法で大腸菌 BL21(DE3) 株に導入し、25 µg/mL Kana を含む TB 培地を用いて 37°C で培養を行った。OD₆₀₀=3.0 で IPTG を終濃度 1 mM となるように添加した後、37°C で 3 時間培養した。その後、培養液を 4 °C、6,640 xg で遠心分離し、菌体を回収した。

菌体を 5 µg/mL Sm2 ヌクレアーゼと 1 % Triton X-100 を含む Basal Buffer (40 mM Tris-HCl pH8.0, 300 mM NaCl) で懸濁し氷上で超音波破碎を行った。破碎液を 38,900 xg で 30 分間遠心分離し、上清を回収した。この上清を Basal Buffer で平衡化した 20 mL の Ni-NTA agarose にアプライし MSP2N2 を吸着させた。担体を wash1 Buffer (Basal Buffer + 20 mM Imidazole, 1 % Triton X-100) と、wash2 Buffer (Basal Buffer + 20 mM Imidazole, 50 mM Sodium cholate) と、wash3 Buffer (Basal Buffer + 30 mM Imidazole) でそれぞれ 5 cv ずつアプライして洗浄した。その後、Elute Buffer (Basal Buffer + 400 mM Imidazole) で MSP2N2 を溶出させ、10 kDa cut-off Amicon Ultra-15 concentrator で 10 mL 以下になるまで濃縮した。MSP Buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5, 100 mM NaCl, 0.5 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)) で平衡化した Superdex200 16/60 にアプライし、MSP2N2 を含むピークフラクションを回収した。それを 10 kDa cut-off Amicon Ultra-15 concentrator で 10 mg/mL まで濃縮して -80 °C で保存した。

1-11. Nanodisc 再構成

精製した AmtB-AbAlkB と大腸菌総脂質抽出物を混合し、4 °C で 1 時間攪拌した後、MSP2N2 を加え更に 4 °C で 1 時間攪拌した。その後、SM-2 Bio-Beads (Bio-Rad) を加え、4 °C で一晩攪拌した。この試料を 4 °C、20,630 xg で 10 分間遠心分離して上清を回収した。上清を SEC Buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5, 200 mM NaCl) で平衡化した Superose6 increase 10/300 にアプライして、Nanodisc 再構成された AmtB-AbAlkB を回収し、100 kDa cut-off Amicon Ultra-4 concentrator で濃縮し、-80 °C で保存した。

1-12. 融合体 AlkB の透過型電子顕微鏡観察

観察試料を 0.02-0.05 mg/mL 程度に、試料と同じ界面活性剤を含んだ buffer A で希釈し

た。カーボン支持膜が張り付けられたメッシュグリッド（エクセルサポートフィルム、日新 EM）に対して PIB-10（真空デバイス）で 1 分間グロー放電を行い親水化処理した。希釈した 3 μL の観察試料をグリッドのカーボン支持膜に滴下して 1 分間静置した。ろ紙で観察試料を吸い取った後、3 μL の超純水をカーボン支持膜に滴下してろ紙で吸い取る作業を 2 回繰り返した。その後、3 μL の 1 %酢酸ウランをカーボン支持膜に滴下してろ紙で吸い取る作業を 2 回繰り返し、観察までデシケーター内で保存した。このグリッドを透過型電子顕微鏡（JEM-1400 Plus、JEOL）を用いて、観察倍率 80,000 倍で撮影した。

1-13. ルブレドキシンとルブレドキシン還元酵素の発現・精製

P. putida GPo1 由来 Rub 遺伝子のコドンが大腸菌発現系に最適化し、人工合成した。

Rub の C 末端に 6xHis タグを付加するように、遺伝子をプラスミドベクター pET-28b に導入した。以降の操作では、これを Rub の発現ベクター（pET28-Rub）として用いた。

大腸菌 BL21(DE3) 株に pET28-Rub を導入し、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kana を含む LB 培地を用いて 37°C で培養を行った。OD₆₀₀=0.5 で IPTG を終濃度 0.5 mM となるように添加した後、18 °C で 16 時間培養を行った。その後、培養液を 4 °C、6,640 $\times g$ で遠心分離し、菌体を回収した。

菌体を 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Sm2 ヌクレアーゼを含む Rub A Buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 20 mM Imidazole) で懸濁し氷上で超音波破碎を行った。破碎液を 38,900 $\times g$ で 30 分間遠心分離し、上清を回収した。この上清に対して、20 mL の Ni-NTA agarose を用いた IMAC を行った。Rub を担体に吸着させた後、10 cv の Rub A Buffer で洗浄し、2.5 cv の Rub B Buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 200 mM Imidazole) で Rub を溶出した。溶出試料を 10 kDa cut-off Amicon Ultra-15 concentrator (Merck) で濃縮し -80 °C で保存した。

P. aeruginosa PAO1 由来 RubR 遺伝子をクローニングし、RubR の C 末端に 6xHis タグを付加するように、遺伝子をプラスミドベクター pET-28b に導入した。以降の操作では、これを RubR の発現ベクター（pET28-RubR）として用いた。

大腸菌 BL21(DE3) 株に pET28-Rub を導入し、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kana を含む TB 培地を用いて 37°C で培養を行った。OD₆₀₀=0.5 で IPTG を終濃度 0.1 mM となるように添加した後、26 °C で 48 時間培養を行った。

菌体を 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Sm2 ヌクレアーゼを含む RubR A Buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 20 mM Imidazole, 20 % Glycerol, 1 mM Dithiothreitol (DTT)) で懸濁し氷上で

超音波破碎を行った。破碎液を 38,900 $\times g$ で 30 分間遠心分離し、上清を回収した。この上清に対して、10 mL の Ni-NTA agarose を用いた IMAC を行った。RubR を担体に吸着させた後、10 cv の RubR A Buffer で洗浄し、2.5 cv の RubR B Buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 200 mM Imidazole, 20 % Glycerol, 1 mM DTT) で RubR を溶出した。溶出試料を 30 kDa cut-off Amicon Ultra-15 concentrator (Merck) で濃縮し RubR C Buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5, 20 % Glycerol, 1 mM DTT) で希釈することでバッファー置換を行った。その後、AKTA pure に接続した 5 mL の Hi-Trap Q 担体を用いて陰イオン交換を行った。サンプルをアプライ後、RubR D Buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5, 1 M NaCl, 20 % Glycerol, 1 mM DTT) を用いて徐々にカラム内の塩濃度を上げ RubR を溶出させた。その際、タンパク質由来の 280 nm の吸収と RubR の補因子である FAD 由来の 450 nm の吸収を測定した。溶出試料を濃縮し $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保存した。

1-14. AlkB の活性測定

5 mg/mL の *PpAlkB* が発現した膜画分に 0.5 % DDM を添加して 1 時間、氷上で静置したものを反応に使用した。0.5 mg/mL 膜画分、30 μM Rub、6.0 μM RubR、0.8 mM 基質となるように活性測定 Buffer (20 mM Tris-HCl pH8.0, 50 mM NaCl, 10 % Glycerol) と混合し、30 $^{\circ}\text{C}$ で 2 分間インキュベートした。Rub と RubR の濃度はモル吸光係数 (Rub (497 nm); $\epsilon=6,300\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, RubR (450 nm); $\epsilon=11,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)^[96] から算出した。その後、終濃度 5 mM NADH となるように反応液に添加して、30 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間インキュベートした。反応終了後に氷上で 5 分間静置した後、反応液と等量のジクロロメタンを添加して 1 分間激しく混合して生成物を抽出した。これを 4 $^{\circ}\text{C}$ 、20,630 $\times g$ で 10 分間遠心分離して、ジクロロメタン層を回収した。抽出物を、HP-5 キャピラリーカラム (Agilent Technology) と水素炎イオン化検出器を接続したガスクロマトグラフィー (GC-2014AFsc、島津製作所) で分析した。基質に C₅~C₉ を使用した際は、カラム温度を 40 $^{\circ}\text{C}$ で 3 分間保持した後、10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速度で 120 $^{\circ}\text{C}$ まで上昇させ、更に 5 分間保持した条件で分析を行った。同様に基質に C₁₀~C₁₂ を使用した際は、カラム温度を 40 $^{\circ}\text{C}$ で 3 分間保持した後、20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速度で 200 $^{\circ}\text{C}$ まで上昇させ、更に 5 分間保持した条件で分析を行った。各炭素数の 1-アルコールを用いて検量線を作製し、これを用いて抽出物の 1-アルコール量を算出した。

第二章 ε-ポリ-L-リジン合成酵素 Pls の L-リジン特異的な活性化メカニズムの解明と Pls 全長の構造解析に向けた取り組み

緒言

Pls は、複数の L-リジンをイソペプチド結合で縮合し、25-35 量体からなるアミノ酸ホモポリマーのε-PL を合成する、巨大なマルチドメイン型膜内在性酵素である。ε-PL は、伸長すると同時に Pls の膜貫通ドメインが形成するチャネルを通り細胞外へ放出されるため、工業生産時において容易に回収可能な利点がある。このように合成されるε-PL は、食品の防腐剤だけでなく、農薬^[153]や、その高い膜透過性を活かしたドラッグデリバリーシステム^[154]としての用途もあり、非常に価値のあるバイオポリマーである。また、ε-PL は、ポリアミド系プラスチックのナイロン 6 と構造が非常に類似しているため、初めてのポリアミド系バイオプラスチックになりうる素材として注目を集めている。しかし、*S. albulus* が生産するε-PL は重合度が低く、現状ではプラスチックとして利用することは不可能である。この問題を解決するには、蛋白質工学による Pls の機能改変が必要であるが、ポリマー伸長反応の詳細なメカニズムは明らかでないため困難である。そこで本研究では、Pls の詳細な反応機構を明らかにして機能改変を行うために、立体構造の解明を目指した。

第二章では、Pls の基質である、L-リジンの認識と ATP を用いた活性化を担う、Pls のアデニル化ドメイン (Pls-A) の結晶構造解析の結果と、全長 Pls の構造解析に向けた試料調製法の取り組みについてまとめた。

結果・考察

2-1. Pls アデニル化ドメインの結晶構造解析

まず初めに Pls-A の結晶化に向けて熱安定性測定を行ったところ、Pls-A の熱変性温度 (Tm) は 43 °C であることが分かった (図 49) (表 1)。さらに、基質の L-リジンと ATP を添加すると、両者が存在する条件でのみ Tm が約 4.5 °C 上昇することが明らかとなった (表 1)。

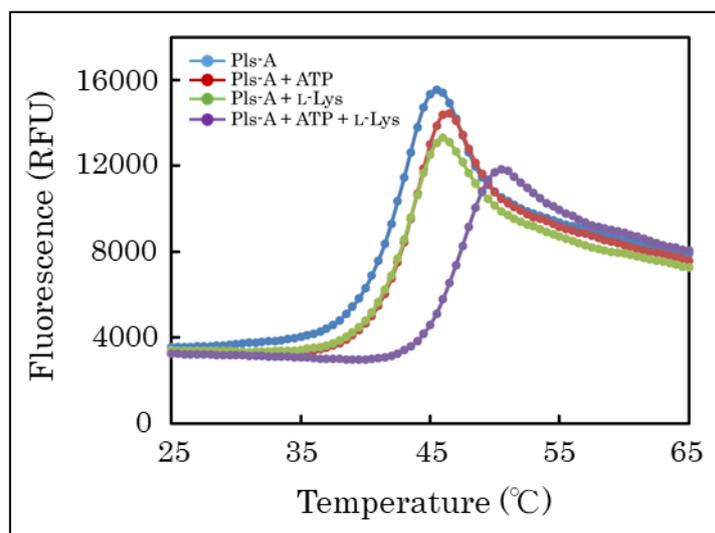


図 49 | Pls-A の熱変性曲線。縦軸は蛍光値、横軸は温度を示す。

表 1 | Pls-A の熱変性温度 (Tm)

	Tm (°C)	Δ Tm (°C)
Pls-A	43	—
Pls-A + ATP	44	1
Pls-A + L-Lys	44	1
Pls-A + ATP + L-Lys	47.5	4.5

そのため、Pls-A は基質との共結晶化を行った。また、Pls-A は反応に Mg イオンを必要とするため、Mg イオン存在下と非存在下の 2 条件で結晶化し、X 線回折実験を行った。その結果、Mg イオン非存在下で L-リジン、ATP 結合型 Pls-A (図 50a) を 2.2 Å 分解能、Mg イオン存在下でアデニル化リジン結合型 Pls-A の結晶構造を 2.3 Å 分解能で決定することができた。Pls-A の全体構造は NRPS A ドメインやホタルルシフェラーゼを含むアデニル酸形成酵素スーパーファミリーと類似していた。1-403 残基の N 末端サブドメインと 404-508 残基の C 末端サブドメインの間に大きなポケットがあり、その内部に L-リジン、ATP またはアデニル化リジンの電子密度が観測された (図 50b, c)。しかし、ATP の γ リン酸基の電子密度が確認できなかったため、基質結合型のリガンドのモデリングは ATP の代わりに ADP を用いた。モデルには ADP を配置しているが、以降は ATP として取り扱った。

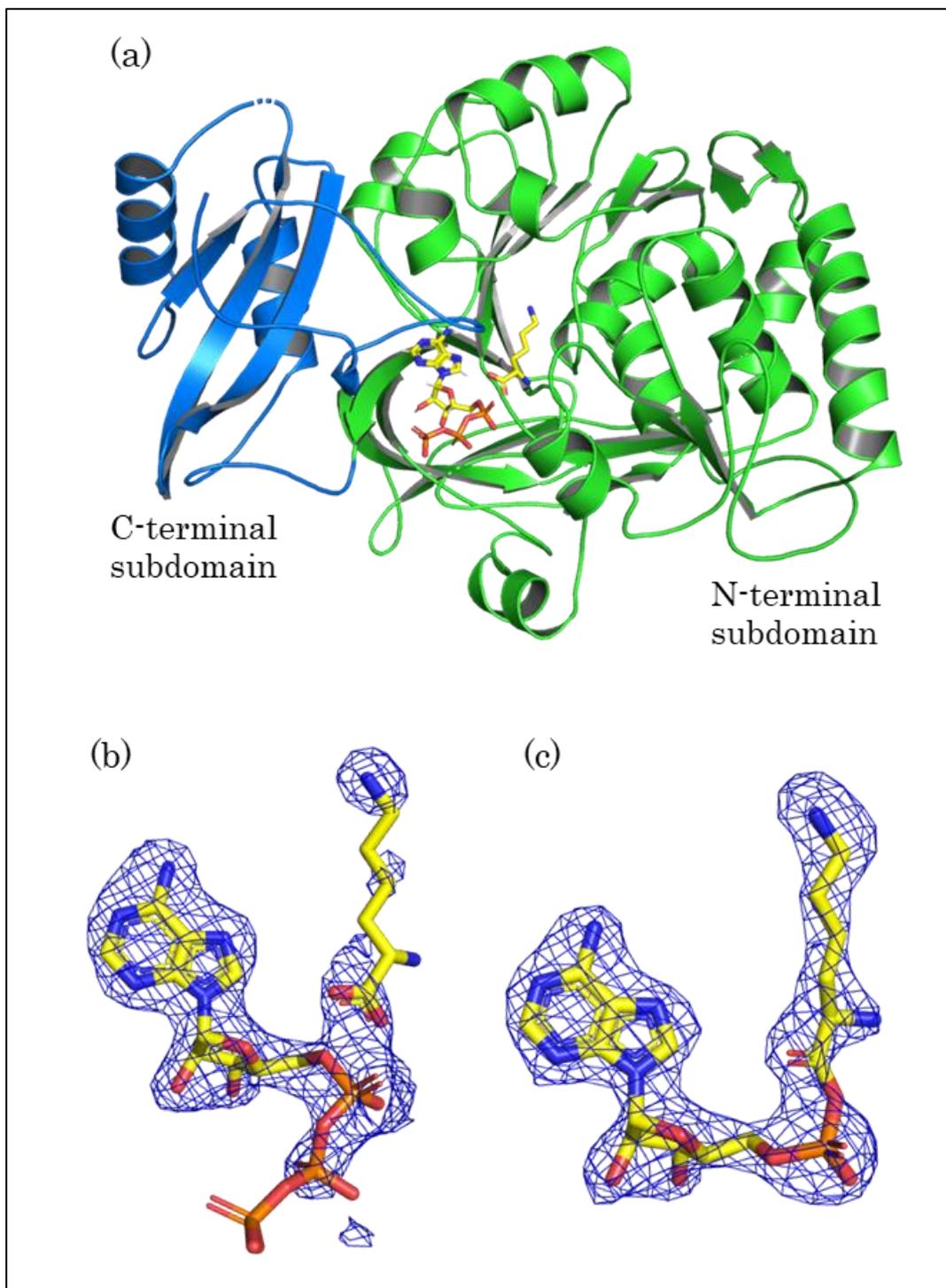


図 50 | (a) Mg イオン非存在下で決定した基質結合型 Pls-A の全体構造。緑で示した N 末端サブドメインと、青で示した C 末端サブドメインから構成されており、その間に L-リジンと ATP が結合していた。(b) ATP と L-リジンのオミットマップ (2.5 σ)、モデル構築には ADP を使用した。(c) アデニル化リジンのオミットマップ (2.5 σ)

基質結合型と生成物結合型の構造を比較したところ、大きな構造変化は観測されなかった (RMSD=0.11 Å) (図 51a)。一方で ATP のリン酸基との結合に関わる P-loop と呼ばれる領域が、基質結合型では2残基、生成物結合型では5残基ディスオーダーしていた (図 51b)。

Pls-A を含むアデニル酸形成酵素スーパーファミリーに属する酵素は反応サイクルに伴って、リガンドフリーの Open form (ホタルルシフェラーゼ;PDB ID: 1LCI)^[155]、基質が結合した Adenylation form (PheA;PDB ID: 1AMU)^[156]、ピロリン酸が脱離し、チオエステル結合の形成を待つ状態の Closed form (DltA;PDB ID: 3E7W)^[157] の3つの状態に C 末端サブドメインが大きく動き、全体構造が変化することが知られている (図 51c)^[158]。しかしながら、Pls-A は基質結合型とピロリン酸が脱離した生成物結合型で構造変化しておらず、どちらも Adenylation form であった (図 51a, d)。生成物結合型 Pls-A は溶液中で Adenylation form と Closed form の2状態を遷移しているが、結晶化のプロセスで Adenylation form に固定されたため、構造変化していなかったと推察した。実際に、Pls-A の C 末端サブドメインは結晶中で隣り合った分子と相互作用を形成していた (図 51e)。

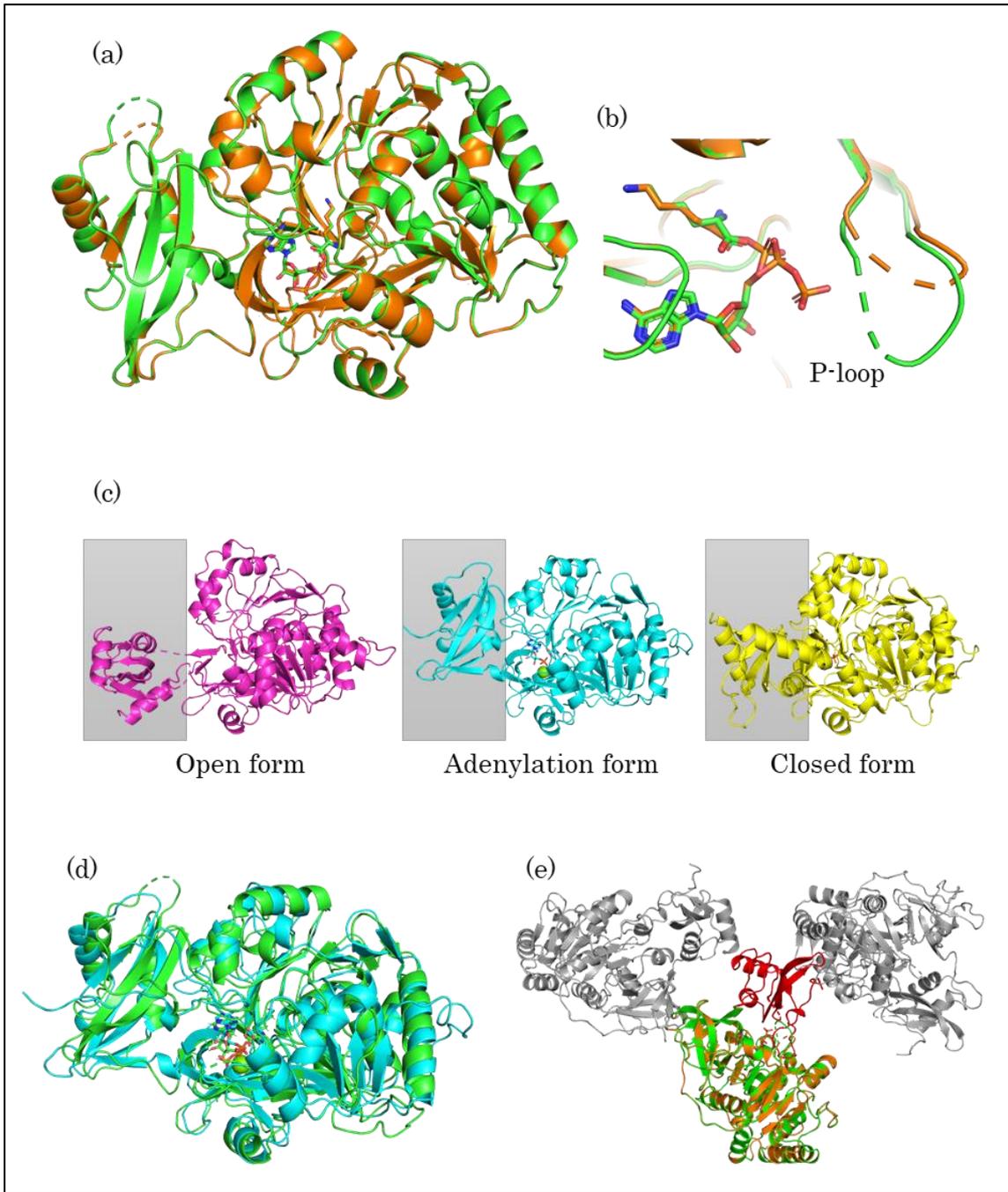


図 51 | (a) 基質結合型 Pls-A (緑) と生成物結合型 Pls-A (オレンジ) の重ね合わせ (b) リン酸基の結合に関与する P-loop (c) アデニル化ドメインの反応に伴う C 末端サブドメインの構造変化、グレーで色付けした部分に存在する C 末端サブドメインが大きく構造変化する。マゼンタ：ホタルルシフェラーゼ、シアン：PheA、黄色：DltA (d) Adenylation form をとる PheA (シアン) と Pls-A (緑) の重ね合わせ (e) Pls-A のクリスタルパッキング、赤は C 末端サブドメイン、グレーは結晶中で隣り合った Pls-A 分子を示す。

ATP と L-リジンの結合様式を図 52 に示した。ATP は塩基のアデニンとリボース、リン酸基の 3 か所で活性部位に固定されていた (図 52a)。アデニン環のアミノ基は Asn300 の側鎖及び Thr301 の主鎖カルボニルと水素結合を形成していた。N7 位は Gly280 の主鎖 NH と水素結合を形成していた。リボースの O2 '及び O3 'ヒドロキシ基は Asp387 の側鎖と水素結合を形成していた。また、リボース環の O4 '及びリボースとリン酸基の間にあるホスホエステル酸素は Lys495 の ϵ アミノ基と水素結合を形成していた。ATP の α , β リン酸基は P-loop の Ser165 の主鎖 NH、Thr305 の主鎖 NH と側鎖ヒドロキシ基、Lys495 の側鎖 ϵ アミノ基と複数個所で相互作用を形成し基質 L-リジンの近く (2.3 Å) に固定されていた (図 52b)。基質結合型では ATP の β リン酸基の電子密度が観測されたが、生成物結合型では見られなかった (図 50b, c)。Mg イオンを添加して結晶化を行うことで反応が進行し、ATP の β , γ リン酸基がピロリン酸として放出されたと推察される。そのため、生成物結合型において P-loop の Ser165 はリン酸基と相互作用していなかった。生成物結合型における P-loop のディスオーダー領域の拡張は、P-loop とリン酸基の相互作用が失われ、揺らぎが増大したためであると推察した。

基質 L-リジンのカルボキシ基は Lys495 と、 α アミノ基は Asp213 と塩橋を形成していた。L-リジン側鎖の炭素鎖は Ala214 及び Val309 の無極性の側鎖を持つアミノ酸に囲まれていた。 ϵ アミノ基は Glu217, Ser256, Thr301 と直接または水分子を介して相互作用可能な距離に位置していた (図 52b)。基質が Pls-A と多くの相互作用を形成し、強固に結合することでサブドメイン間の大きなポケットを埋め、adenylation form に固定されて立体構造がより剛直になったことが、熱安定性向上の要因であると推察した。

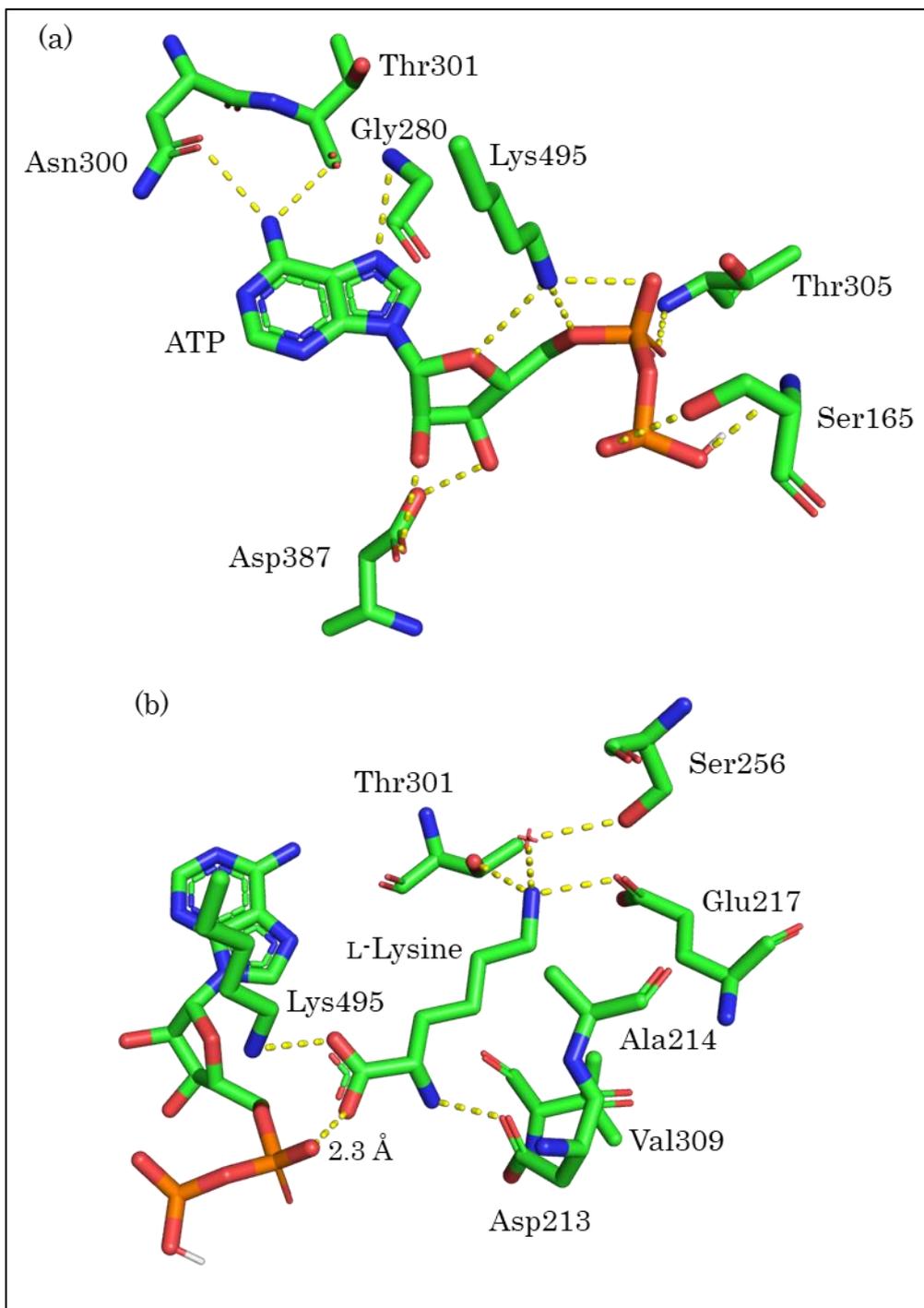


図 52 | (a) ATP と (b) L-リジンの結合に関わるアミノ酸残基、点線は相互作用を示す。

NRPS A ドメインの基質認識は、gramicidin 合成酵素 GrsA の A ドメインで L-フェニルアラニンを活性化する PheA の立体構造を基に作製された、非リボソームコードと呼ばれる 10 アミノ酸残基が関与していると考えられている^[156]。Pls-A の非リボソームコード

を他の NRPS A ドメインと比較した (表 2)。

表 2 | Pls-A と NRPS A ドメインのリボソームコード

protein	substrate	position									
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
Pls-A	L-Lys	D ₂₁₃	A ₂₁₄	E ₂₁₇	S ₂₅₆	I ₂₇₇	G ₂₇₉	T ₃₀₁	V ₃₀₉	V ₃₁₀	K ₄₉₅
BacB	Lys	D	A	E	S	I	G	S	V	C	K
Orf5	β-Lys	D	T	E	V	V	G	T	L	V	K
ApnA-A1	L-Arg/Tyr	D	V	E	S	I	G	V	I	A	K
DltA	D-Ala	D	L	M	T	L	C	T	V	A	K
Thr1	L-Thr	D	F	W	N	V	G	M	V	H	K
PheA	L-Phe	D	A	W	T	I	A	A	I	C	K

L-リジンのアミノ基及びカルボキシ基と相互作用を形成する Asp213 (A1) 及び Lys495 (A10) は他の NRPS A ドメインに高度に保存されていた。L-リジンのεアミノ基と塩橋を形成していた Glu217 (A3) は、塩基性アミノ酸をアデニル化する A ドメインである ApnA-A1^[159]、Orf5^[160]、BacB^[161]に保存されていた。水分子を介して間接的に相互作用を形成する Ser265 (A4) は ApnA-A1, BacB に保存されていた。一方、Thr301 (A7) は、Pls-A と同様に L-リジンを認識する BacB に保存されていなかった。

非リボソームコードの 10 残基の内、DAESTVK の 7 残基が基質 L-リジンと直接的に相互作用を形成していた (図 52b)。特に Thr301 (A7) 及び Lys495 (A10) は、L-リジンだけでなく ATP とも相互作用を形成しており、Pls-A における基質の位置決定に重要な残基であると推察された。残りの IGV は直接的に L-リジンと相互作用はしていないが、基質結合ポケットの形成に貢献していた。また、Pls-A と他の NRPS A ドメインの非リボソームコードの比較により、塩基性アミノ酸を基質とする A ドメインには Glu217 (A3), Ser265 (A4) が高度に保存されていることが明らかとなった。したがって Pls-A は、これらの残基で基質 L-リジンのεアミノ基と相互作用を形成することで、L-リジン特異的な認識を可能にしていると推定した。中でも Ser265 は水分子を介して L-リジンと水素結合を形成しているだけでなく、Glu217 とも相互作用可能な場所に位置しており、L-リジンが結合するまで Glu217 の側鎖を L-リジンと塩橋を形成する位置で固定する役割を担うと推察した。

以前に Yamanaka らは、Pls-A が L-リジンだけでなく、D-リジン (図 53b) や(5R)-5-ヒドロキシ-L-リジン (L-HLY) (図 53c) などの L-リジンアナログもアデニル化することを報告した^[144]。Pls-A の基質結合ポケットは L-リジンのδ炭素の周辺に大きな空洞があり、側

鎖が少し嵩高い L-HLY を許容可能であることを示唆した (図 54a)。更に、L-リジンの α 炭素の水素原子周辺は立体障害が少ないため、D-リジンも結合可能であることが示唆された (図 54b)。

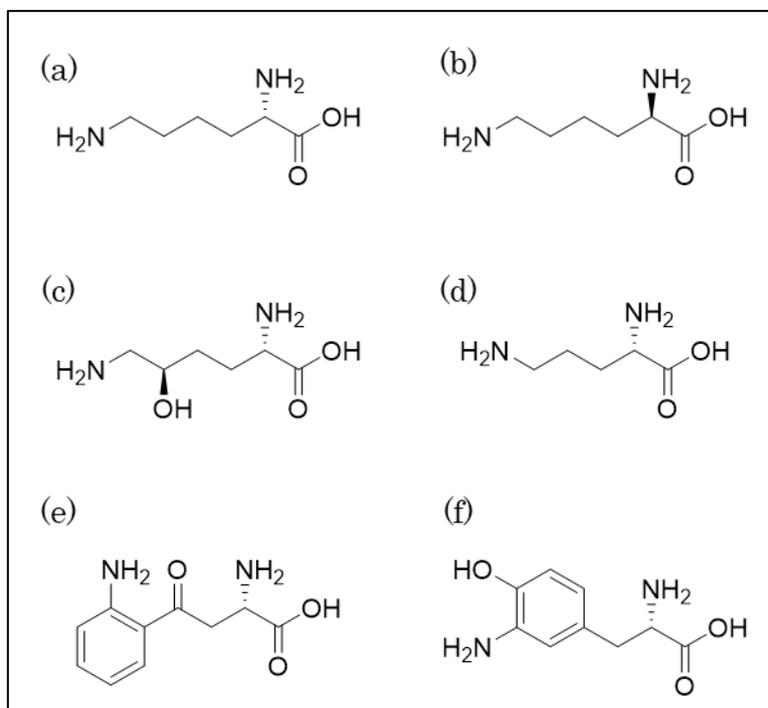


図 53 | リジンアナログの構造式 (a) L-lysine (b) D-lysine (c) (5R)-5-hydroxy-L-lysine (d) L-ornithine (e) L-kynurenine (f) 3-amino-L-tyrosine

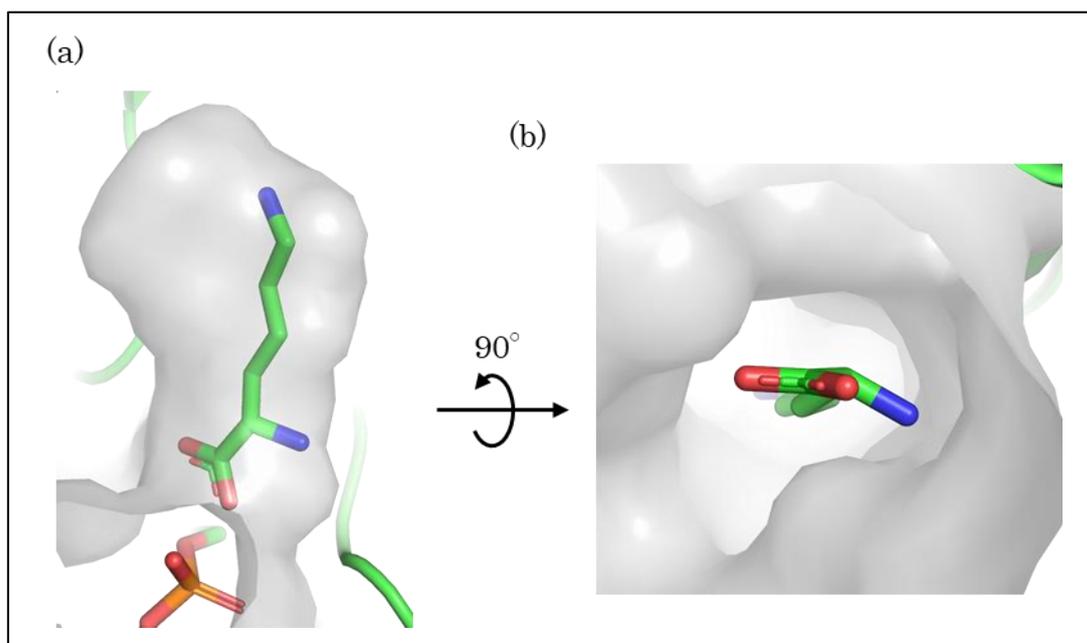


図 54 | Pls-A の基質結合ポケット (a) δ 炭素近傍の空間 (b) α 炭素近傍の空間

一方で、L-オルニチン (L-Orn) (図 53d), L-kynurenine (L-KNR) (図 53e), 3-アミノ-L-チロシン (L-ATY) (図 53f) の、これら 3 つの L-リジンアナログは Pls-A の基質として認識されないことが知られている。L-KNR と L-ATY は側鎖の高さが原因で立体障害を引き起こし、Pls-A の基質ポケットに結合できないと推測された (図 54a)。L-リジンより側鎖が小さい L-Orn が Pls-A の基質として認識されない原因は、L-Orn の δ アミノ基が Glu217 や Ser265 と距離が離れており相互作用を形成できないためであると推察した (図 52b)。Pls-A の立体構造と L-リジンアナログの許容性から、Pls-A が基質を認識するためには、L-リジンの ϵ アミノ基の位置で相互作用を形成することが重要であると推測した。

2-2. Pls アデニル化ドメインのエステラーゼ活性

Yamanaka らは、Pls A ドメインは L-リジンメチルエステルと L-リジンエチルエステルを分解し L-リジンを生成する、エステラーゼ活性を有することを報告した^[44]。一般的なエステラーゼは、Ser, His, Asp の触媒三残基が活性中心となり反応を触媒するが、今回決定した Pls-A の構造において、L-リジン結合部位周辺にこれらの残基は観測されなかった (図 52b)。Pls-A のエステラーゼ活性を調べるため、基質に L-リジンまたは L-リジンメチルエステルを用いて、Pls-A の ATP 消費量を測定した。Pls-A にエステラーゼ活性があれば、基質に L-リジンメチルエステルを用いた場合にも、ATP が Pls-A の濃度依存的に消費されると予測した。活性測定を行った結果、基質に L-リジンを用いた場合、Pls-A の濃度依存的に ATP の消費量が増加した (図 55)。一方、L-リジンメチルエステルを用いた場合は、Pls-A の濃度に関わらず ATP 消費量は変化しなかった。Pls-A の結晶構造と活性測定の結果は、Pls-A がエステラーゼ活性を持たないことを強く示唆した。Yamanaka らが行った実験では Pls-A ではなく、2 つのドメインが連続した Pls-AT が用いられていた。そのため、エステラーゼ反応の触媒残基が T ドメインに存在または、A ドメインと T ドメインの界面に存在すると推察した。

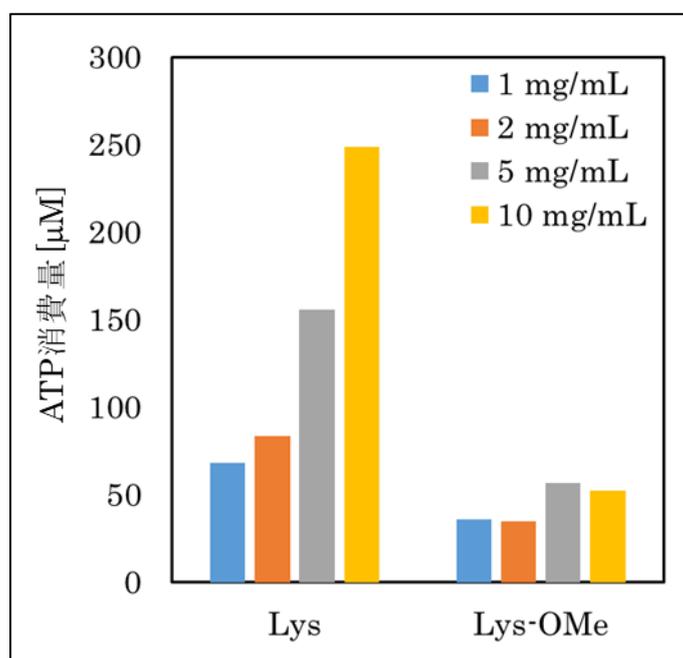


図 55 | Pls-A の活性測定、反応に Lys を用いたときのみ Pls-A の濃度依存的に ATP が消費された。

2-3. クライオ電子顕微鏡単粒子解析に向けた高純度 Pls 調製法の確立

Pls は NRPS 様マルチドメイン型膜タンパク質で、ドメイン間の動きが大きいため結晶化が困難であることが予測される。そのため、Cryo-EM 単粒子解析による Pls の構造解析を目指した。まず初めに、Pls の精製に用いる界面活性剤を検討した。DDM+CHS で可溶化した Pls を、DDM+CHS、LMNG、GDN の 3 種の界面活性剤を用いてそれぞれ精製し、会合状態、熱安定性、TEM 観察像から Cryo-EM 単粒子解析に適した試料を探索した。どの界面活性剤を用いた場合でも精製することができたが、切断が生じていた (図 56)。これは Pls の AT ドメインと TM ドメインの間に HRV3C プロテアーゼ認識配列が挿入されたコンストラクトを用いたため、切断されてしまったと考えられる。精製時にプロテアーゼ阻害剤を添加したにも関わらず切断されているため、発現時に切断が生じていると推察した。

次に精製した Pls の会合状態をゲルろ過クロマトグラフィーにより分析した。その結果、いずれも単分散な状態であることが明らかとなった。特に DDM+CHS と LMNG を用いた場合、切断された Pls を分離することができた (図 56a, b)。

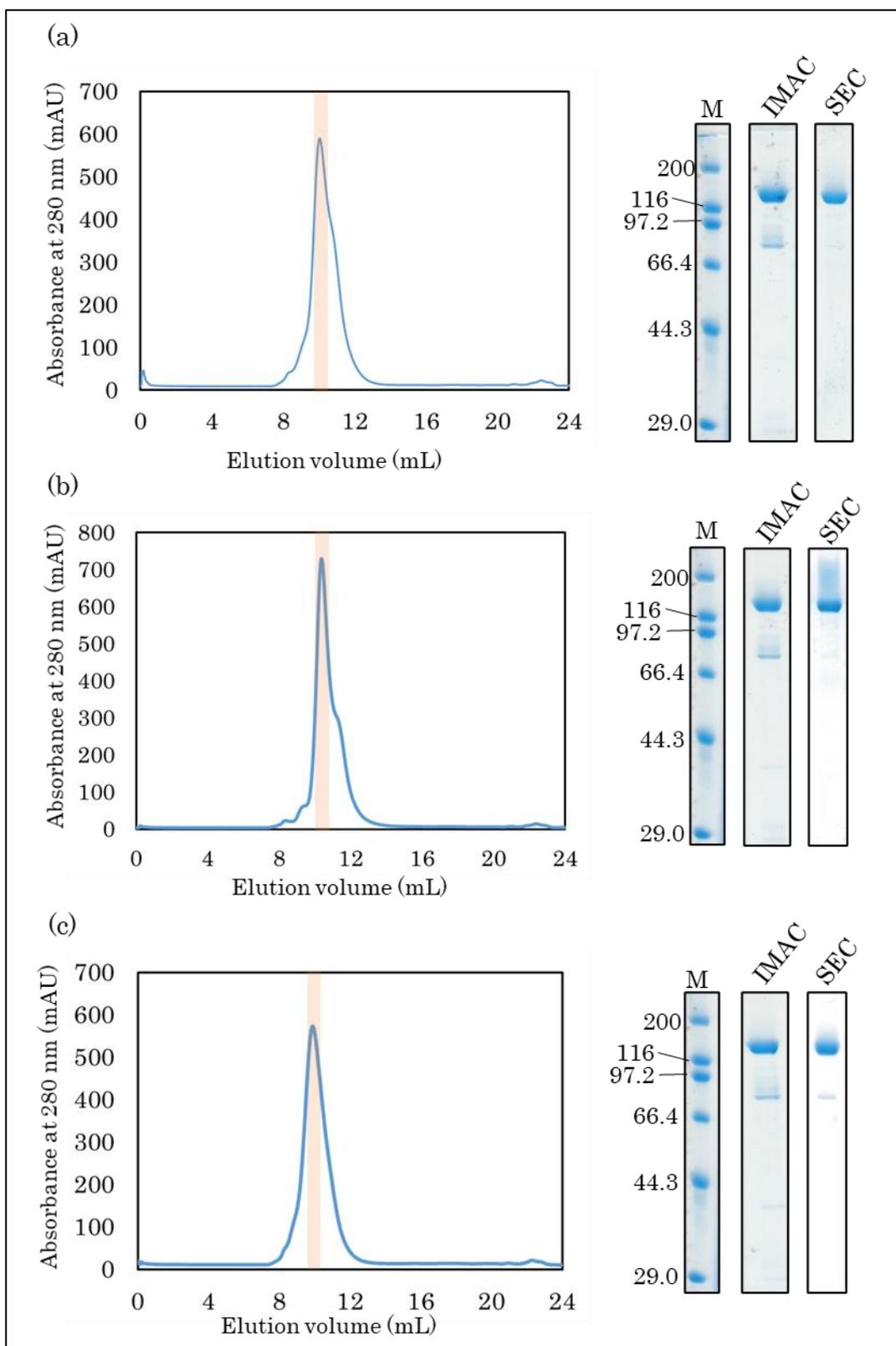


図 56 | 各種界面活性剤を用いた PIs の精製 (a) DDM+CHS (b) LMNG (c) GDN クロマトグラム中の色付き部分は PIs の溶出位置を示す。M は分子量マーカを示す (単位 : kDa)。カラムは Superdex200 10/300 を使用した。

各種界面活性剤を用いて精製した Pls の熱安定性を CPM アッセイにより測定した (図 57a)。熱安定性に大きな差はなかったが、DDM+CHS を用いて精製した Pls が最も高い Tm 値を示した (図 57b)。CPM アッセイは熱で変性して露出したシステインを特異的に蛍光標識する手法であり、界面活性剤の影響を大きく受けると考えられる膜貫通領域に存在するシステインは疎水的な環境に存在するため、熱変性の前から表面に露出して標識されていることが考えられる。そのため、この結果は可溶性の AT ドメインの熱安定性を示している可能性が示唆された。

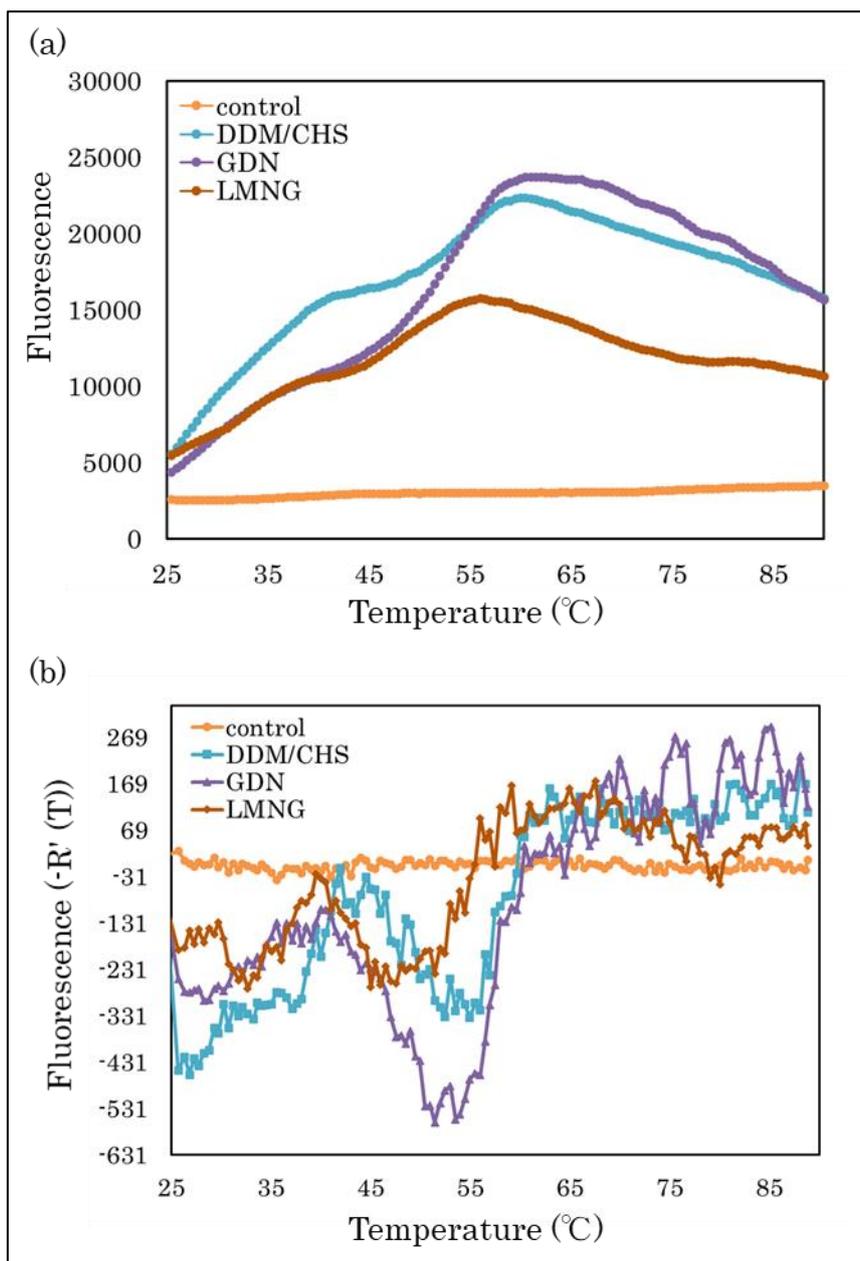


図 57 | Pls の (a) 熱変性曲線 と (b) 熱変性曲線の負の微分曲線、微分曲線の極小値を Tm 値とした。

最後に、各界面活性剤を用いて精製した Pls の TEM 観察を行った。DDM+CHS を用いて精製した Pls を観察したところ、直径 60-100 Å 程度の大きさにバラつきがある粒子が観測された (図 58)。一方、LMNG (図 59) と GDN を用いて精製した Pls は、直径約 80 Å 程度の大きさが均一な粒子であった。しかし、LMNG で精製した Pls 粒子は数が多いためか粒子同士が接着している様子が確認された (図 59)。全て同じタンパク質濃度でグリッドを調製したにもかかわらず、観測された粒子数が大きく異なっていた。これは界面活性剤の親水基の違いが原因であると考えられる。LMNG と GDN は、DDM+CHS と比べて親水基が大きいため、親水化したグリッドに吸着しやすく、洗浄しても粒子が流れにくかったためであると推察した。これらの結果と、膜タンパク質の Cryo-EM 単粒子解析で使用例が多いことから、Pls の精製に用いる界面活性剤を GDN に決定した。

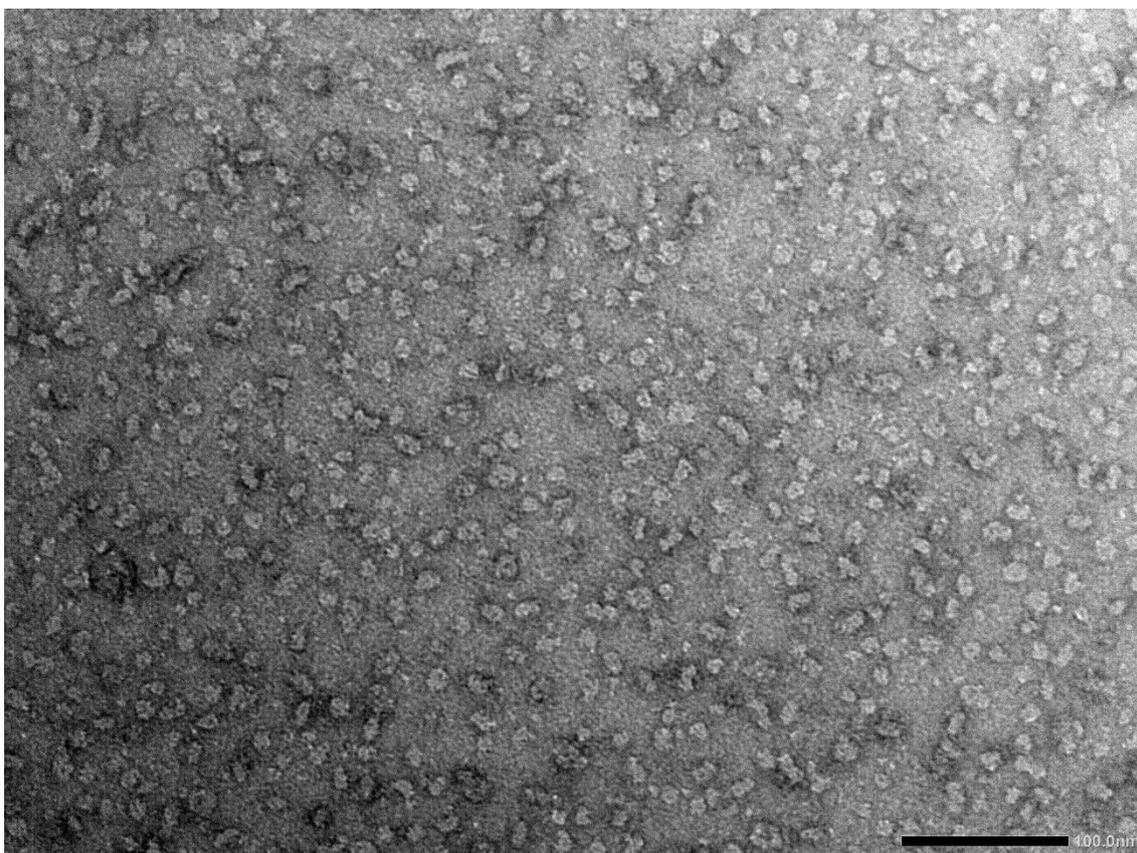


図 58 | DDM+CHS で精製した Pls の TEM 観察像、右下のスケールバーは 100 nm を示す。

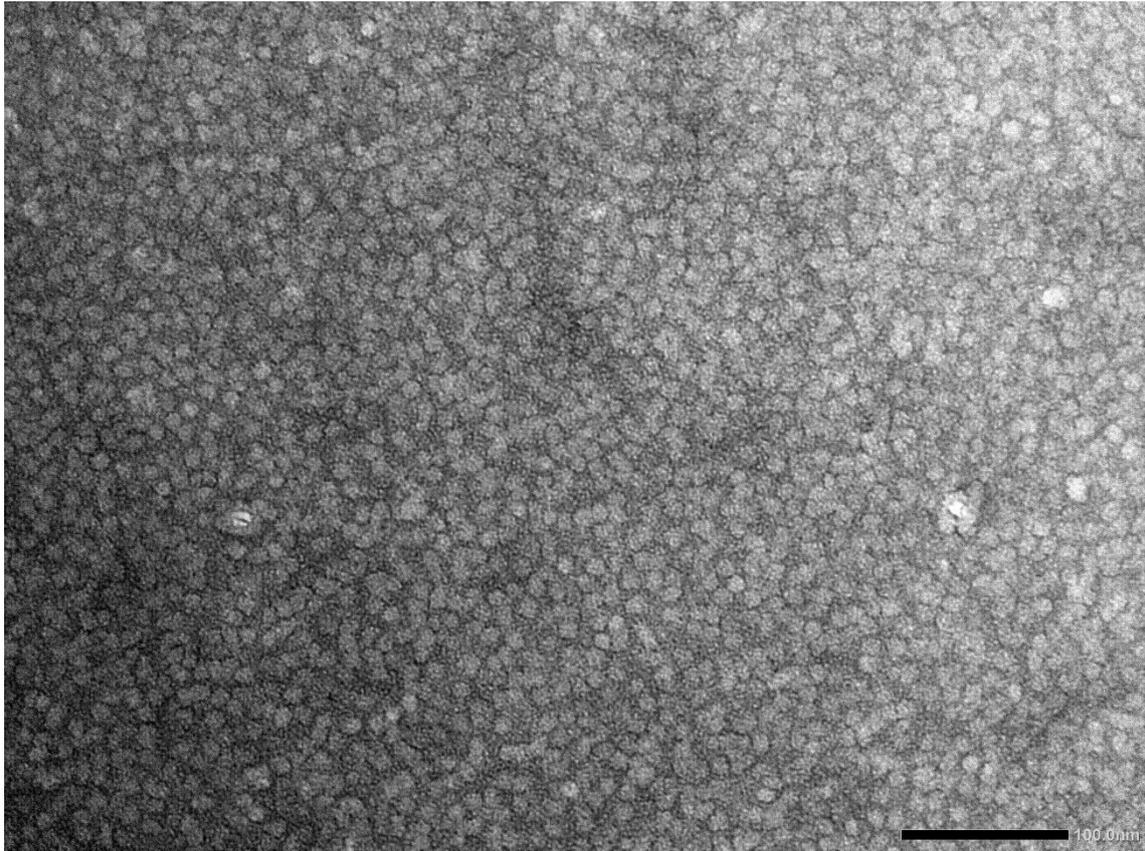


図 59 | LMNG で精製した PIs の TEM 観察像、右下のスケールバーは 100 nm を示す。

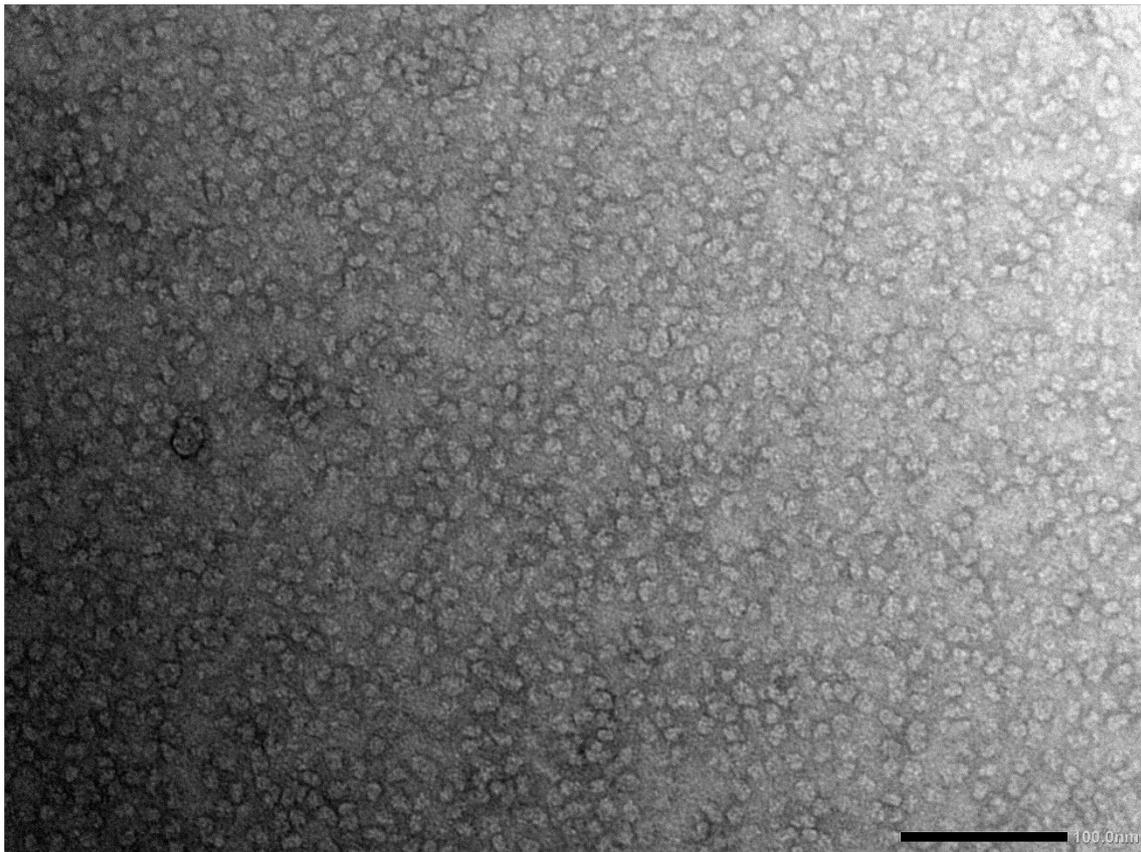


図 60 | GDN で精製した Pls の TEM 観察像、右下のスケールバーは 100 nm を示す。

前述したように Pls はマルチドメインタンパク質であるため、ドメイン間の揺らぎが Cryo-EM 単粒子解析においても問題となることが予測される。水溶性ドメインの Pls-A の表面電荷が一部、正電荷に偏っており、この領域が負電荷を持つ細胞膜表面と静電的な相互作用を形成すると予測される。そこで、精製した Pls の Nanodisc 再構成を行うことで、水溶性ドメインが Nanodisc の脂質表面と相互作用し揺らぎを抑えることができると考えた。MSP1E3 を用いた Pls の Nanodisc 再構成の条件検討を行ったところ、再構成時に脂質を添加するとオリゴマー化することが明らかとなった (図 61a, b)。一方で、脂質を加えずに Nanodisc 再構成した Pls は単分散な状態であることが分かった (図 61c)。これは、精製した Pls に脂質が多く残っており、脂質を介したオリゴマー化が生じていると推察した。脂質を添加していない条件でもわずかにオリゴマー化していることが示唆された (図 61d) ため、今後は精製時の条件を検討する必要があることがわかった。

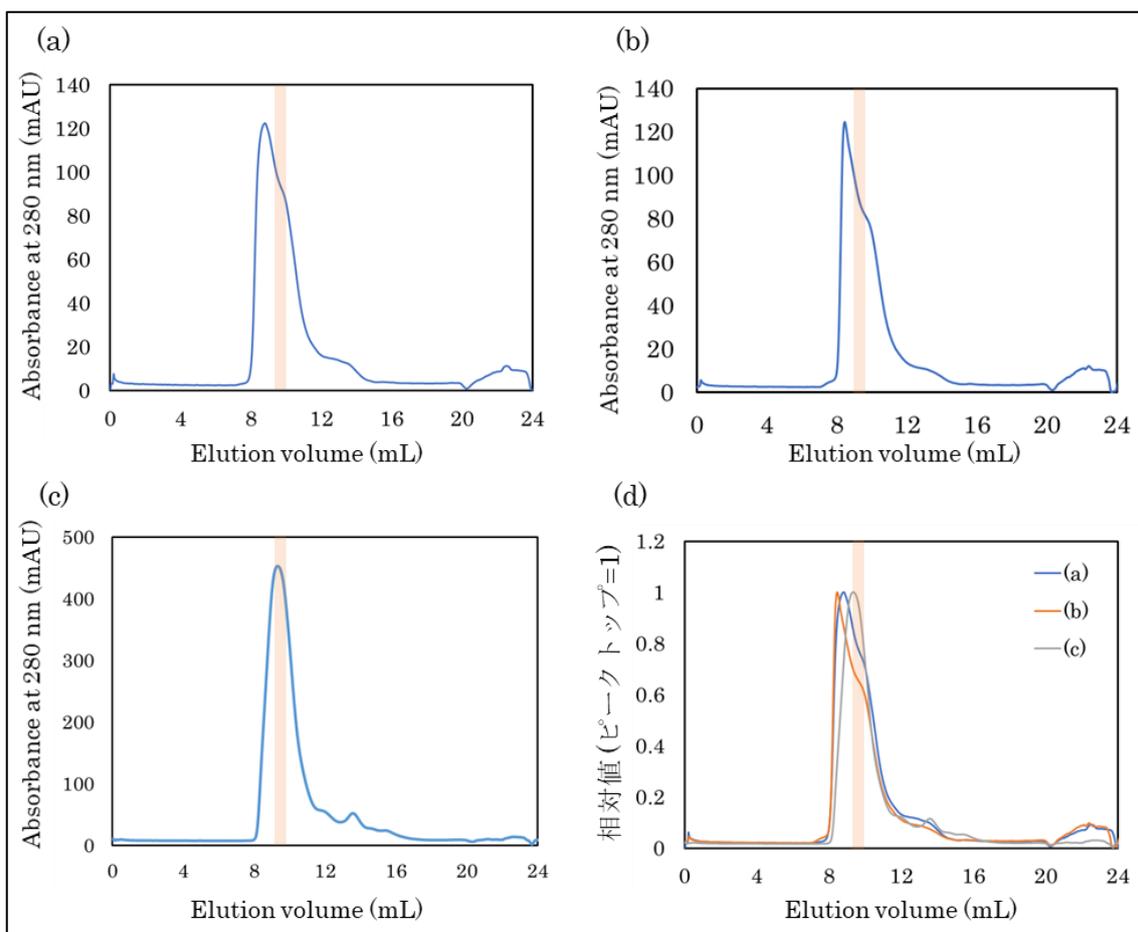


図 61 | Pls の Nanodisc 再構成の条件検討、Pls : MSP1E3 : Lipid = (a) 1 : 3 : 100 (b) 1 : 3 : 200 (c) 1 : 4 : 0 (d) a~c のクロマトグラムの重ね合わせ 各クロマトグラムの色付き部分は単量体 Pls の推定溶出位置を示す。カラムは Superdex200 10/300 を使用した。

Nanodisc 再構成した Pls を TEM で観察したところ、直径が 120-150 Å 程度の粒子が観測された (図 62)。Nanodisc 再構成に用いた MSP1E3 が形成する Nanodisc の直径は 120-130 Å であるため、観測された粒子は妥当な大きさであった。一部、凝集している粒子も存在しているが、大部分は大きさが均一な粒子であるため Cryo-EM 単粒子解析に適した試料であると判断した。しかしながら、MSP1E3 を用いて Nanodisc 再構成した Pls の単粒子解析を行ったが、構造決定には至らなかった。

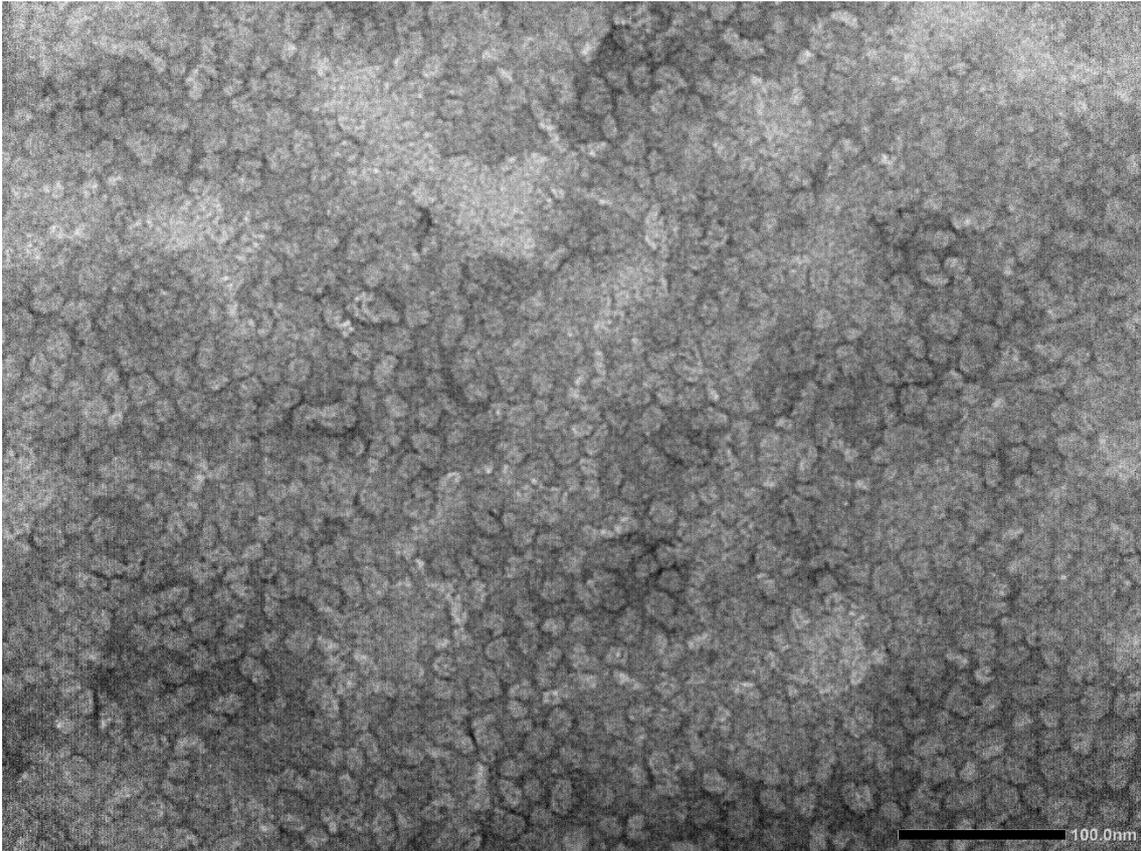


図 62 | MSP1E3 を用いて Nanodisc 再構成した Pls の TEM 観察像、右下のスケールバーは 100 nm を示す。

MSP1E3 が形成する Nanodisc は、7 回膜貫通ヘリックスを有し三量体を形成するバクテリオロドプシン (bR) を再構成することが可能な粒子径であることが知られている^[162]。一方、Pls は膜貫通ヘリックスが 6 本であると予測されており、三量体 bR と比較して膜貫通領域が小さいため、MSP1E3 が形成する Nanodisc に再構成した場合、脂質ディスク内部での自由な移動が生じると考えられる。単粒子解析では、同じ角度かつ同じ位置の粒子像を複数重ね合わせてシグナル強度を上げるため、位置がずれた粒子像が混在していると構造解析が非常に困難となる。つまり、MSP1E3 が形成する Nanodisc に再構成した Pls の構造解析ができなかった原因は、粒子ごとに少しずつ Pls の位置が異なり、構造決定に十分な強度の粒子像が得られなかったためであると推察した。また、調製した Pls には切断されたものも含まれているため、様々な状態が混在していたことも構造解析ができなかった原因として考えられた。

そこで、Pls のアミノ酸配列上にプロテアーゼ認識配列を含まない発現コンストラクト

に変更し、LMNG と GDN を用いて切断されていない Pls の調製を試みた。

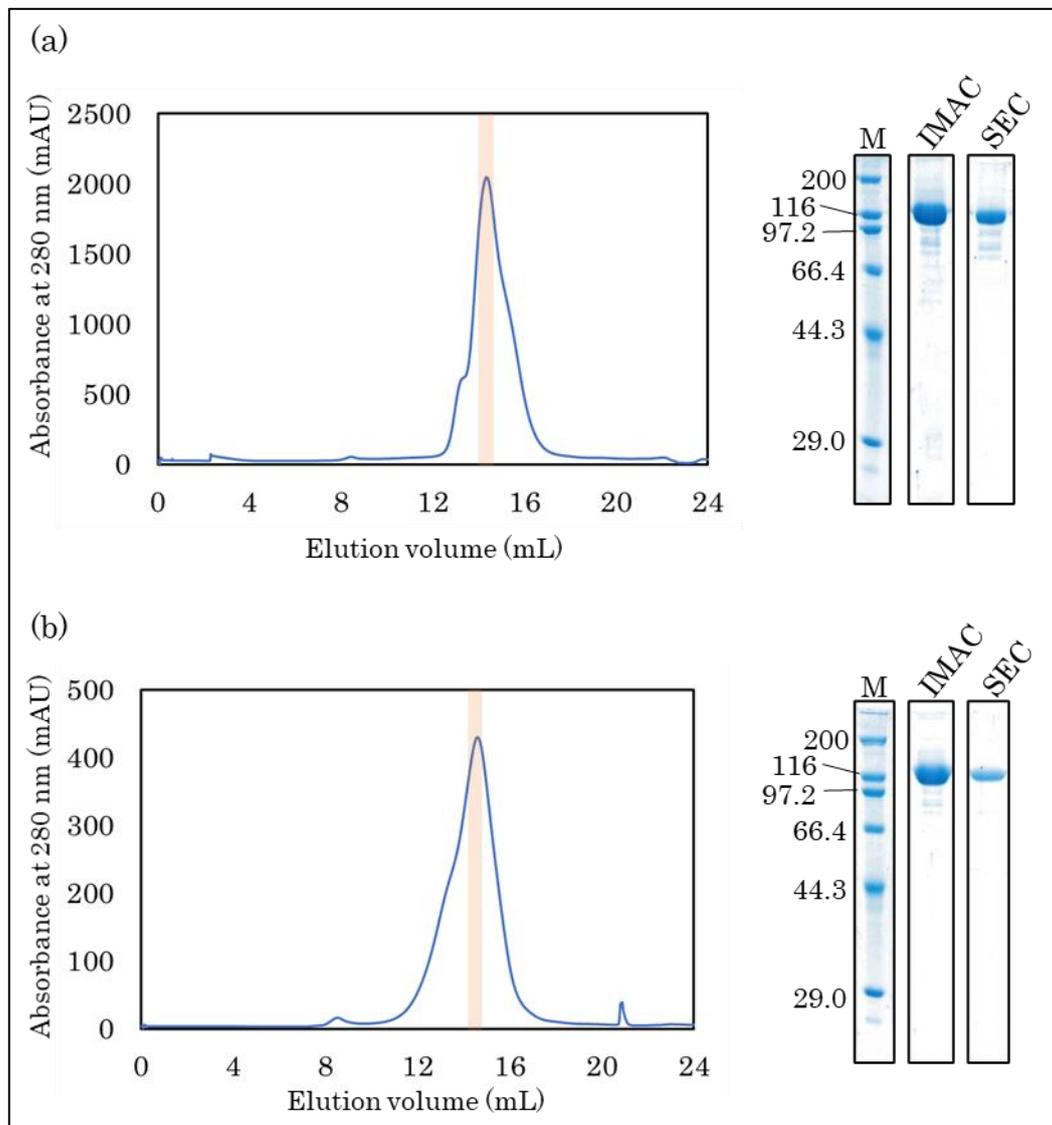


図 63 | 発現コンストラクトを変更した Pls の精製 (a) LMNG (b) GDN

クロマトグラム中の色付き部分は Pls の溶出位置を示す。M は分子量マーカを示す (単位 : kDa)。カラムは Superose6 increase 10/300 を使用した。

発現コンストラクトを変更し、オリゴマー化の原因と考えられる脂質を極力減らすために IMAC 時の担体洗浄量を以前の 3 倍にして Pls の精製を行った結果、ドメイン間の切断がなく均一で高純度な Pls を調製することができた (図 63)。LMNG 及び GDN のどちらを精製に用いた場合にも高純度な Pls が調製できたが、SEC の結果から、洗浄量を増やしたにもかかわらず、一部オリゴマー化していることが判明した。また、ピークの形状から、SEC に使用した界面活性剤によって Pls の会合状態が少し異なっていることが推測された。

LMNG を用いて SEC を行った際、13 mL 付近に単量体ではない Pls のピークが確認でき、溶出体積から二量体 Pls であると推察した。会合状態が異なる Pls を分離できていたため、LMNG で精製した Pls を、より試料の均一性が求められる結晶化に用いた。約 300 条件程度の結晶化スクリーニングを行ったが、現在までに結晶の析出は確認できていない。一方 GDN で精製した Pls は、LMNG で精製した Pls より均一性が低いと考えられるが高純度であるため、この試料を用いて Nanodisc 再構成を行った。その際、MSP1E3 より小さな粒子径の Nanodisc を形成する MSP1D1 に変更した。

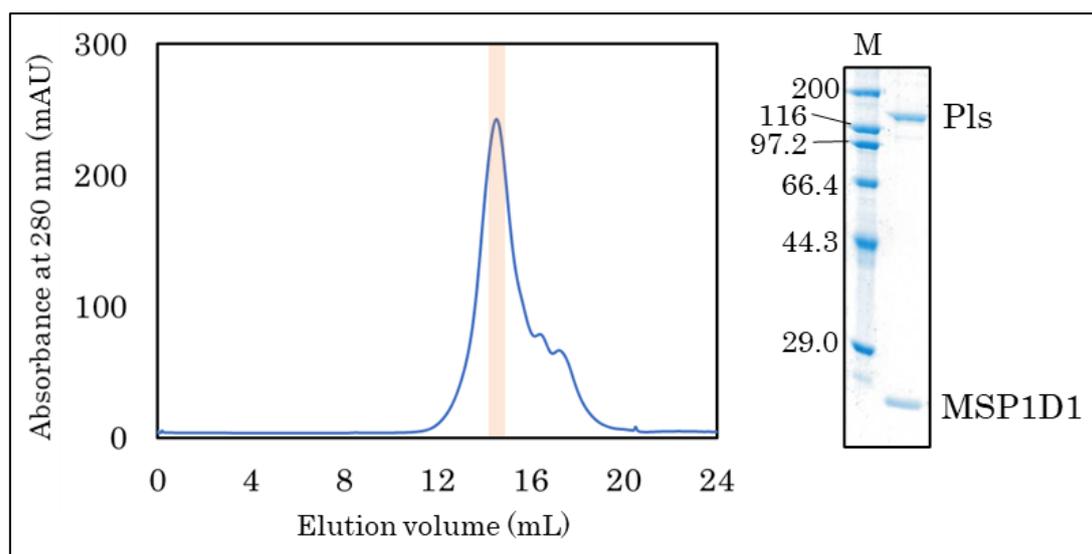


図 64 | Pls の MSP1D1 を用いた Nanodisc 再構成、クロマトグラム中の色付き部分は Pls の溶出位置を示す。M は分子量マーカを示す (単位 : kDa)。カラムは Superose6 increase 10/300 を使用した。

Pls に 6 当量の MSP1D1 を加え、脂質の添加無しで Nanodisc 再構成を行ったところ、非常に均一な Nanodisc 再構成 Pls 試料を調製することができた。MSP1E3 を用いた Nanodisc 再構成ではオリゴマー化が生じていたが、MSP1D1 を用いた場合には確認されなかった。この原因として、IMAC 時の洗浄量を増やして SEC を行うことで過剰量の脂質を除去できたこと、また、MSP1D1 が形成する Nanodisc の粒子径が小さいため脂質間の相互作用が起りにくくなったことが考えられた。

MSP1D1 を用いて Nanodisc 再構成した Pls を TEM で観察したところ、直径が 80-100 Å 程度の粒子が観測された (図 65)。MSP1D1 が形成する Nanodisc の直径は 90-100 Å であるため、観測された粒子は妥当な大きさであった。また、一部凝集も見られるが MSP1E3 を用いた際と比較して少なく非常に均一性が高いことがわかった。

MSP1D1 を用いて Nanodisc 再構成した Pls の Cryo-EM 単粒子解析を行い、TEM 観察

像と同様な形状の粒子を確認することができたため、現在、解析を行っているところである。

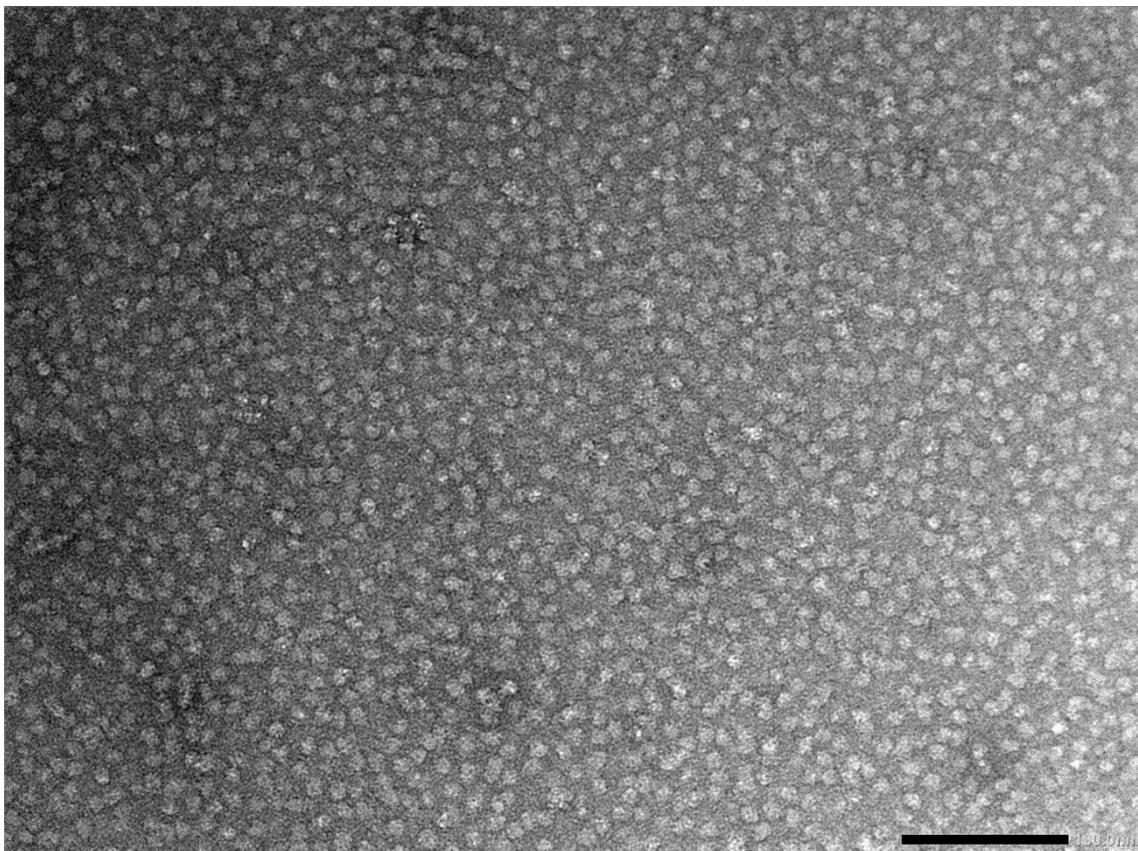


図 65 | MSP1D1 を用いて Nanodisc 再構成した Pls の TEM 観察像、右下のスケールバーは 100 nm を示す。

実験手法

2-4. Pls アデニル化ドメインの発現・精製

S. albulus NBRC14147 のゲノム DNA から Pls-A をコードする遺伝子を、PCR によって増幅した。増幅した DNA 断片を Gibson Assembly システム (NEB) で pET28b ベクターにライゲーションし、N 末端に His タグ、maltose-binding protein (MBP) タグ、TEV プロテアーゼ認識配列を付加した Pls-A の発現ベクターを構築した。この発現ベクターを、ヒートショック法で大腸菌 Rosetta2(DE3) 株に導入した後、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kana 及び 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ クロラムフェニコール (CP) を含む LB 寒天培地に塗布し 37 $^{\circ}\text{C}$ で一晚培養した。得られたコロニーを、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kana 及び 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CP を含む LB 培地に植菌し 37 $^{\circ}\text{C}$ で一晚培養した。培養液を再度 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kana 及び 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CP を含む LB 培地に 100 倍希釈で植菌し、37 $^{\circ}\text{C}$ で振とうした。OD₆₀₀ が 0.5 に達した時点で、0.2 mM IPTG を添加し発現誘導

した後、18℃で一晩培養を続けた。その後、培養液を 4 °C、6,640 xg で遠心分離し、菌体を回収した。

これ以降の操作は記述がない限り 4 °C または氷上で行った。Pls-A を発現させた菌体 1 g に対して 6 mL の buffer A (20 mM Tris-HCl pH7.5, 200 mM NaCl, 20 % glycerol) で懸濁し、1 mM PMSF を添加した後、超音波破碎を行った。菌体破碎液を 30 分間、38,900 xg で遠心分離して上清を回収した。上清を Amylose resin カラム にアプライし、buffer A でカラムを洗浄した。10 mM D(+)-maltose monohydrate を含む buffer A でカラムから Pls-A を溶出させた。His₈-MBP を除去するため、溶出液のタンパク質量と等量の TEV プロテアーゼを加えて、4 °C で一晩インキュベートした。プロテアーゼ処理後の溶液を 38,900 xg で 10 分間遠心分離して、上清を回収し凝集したタンパク質を除去した。上清に 20 mM imidazole を加えて Ni-NTA agarose カラム にアプライした後、20 mM imidazole を含む buffer A でカラムを洗浄し、タグが除去された Pls-A を含む素通り画分と洗浄画分を回収した。これらの画分を Hi-Trap Q HP (GE Healthcare) にアプライし、buffer B1 (20 mM Tris-HCl pH7.5, 20 % glycerol) と buffer B2 (20 mM Tris-HCl pH7.5, 1 M NaCl, 20 % glycerol) を用いて、グラジエント溶出法により Pls-A を溶出させた。Pls-A を 50 kDa cut-off Amicon Ultra-15 concentrator (Merck) で濃縮し、buffer A で平衡化した HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (GE Healthcare) にロードした。精製した Pls-A は 30 mg/mL に濃縮し、-80℃で保存した。

2-5. Pls アデニル化ドメインのサーマルシフトアッセイ

Pls-A の熱変性をモニターするために蛍光色素 SYPRO Orange (Sigma) を使用した。サーマルシフトアッセイは Mx3005P Real-Time QPCR System (Agilent technologies) で行った。1 mM ATP または 1 mM L-lysine またはその両方を含む 18 μL の 0.4 mg/mL Pls-A に 2 μL の 10X SYPRO orange を混合した溶液を、0.2 mL PCR チューブに分注した。チューブを 25-90 °C まで 1 °C/min の速度で加熱した。蛍光強度は Ex/Em:492/516 nm で測定した。MxPro ソフトウェアを用いて蛍光強度の負の一次微分値を算出し、最小値を熱変性温度 (T_m) と定義した。

2-6. Pls アデニル化ドメインの結晶化

Pls-A の結晶化は全て、Pls-A 溶液とリザーバー溶液を 1 μL : 1 μL で混合し、シッティン グドロップ蒸気拡散法を用いて 20 °C で行った。10 mg/mL Pls-A に 1 mM ATP と 2 mM

L-リジンを添加し、2 mM magnesium chloride (MgCl₂) 存在下と非存在下で結晶化を行った。この Pls-A 溶液とリザーバー溶液 (0.2 M potassium sodium tartrate tetrahydrate, 0.1 M sodium citrate tribasic dehydrate pH5.6, 1.8-2.2 M ammonium sulfate) を混合し、1 日インキュベートすることで結晶が得られた。

2-7. Pls アデニル化ドメインの回折データの収集、構造決定

X 線回折実験に用いた結晶は、以下のクライオプロテクト溶液に浸漬した後、100 K の窒素ガス気流下で瞬間凍結し、液体窒素中で保存した。MgCl₂ 非存在下のクライオプロテクトの組成は、0.2 M potassium sodium tartrate tetrahydrate, 0.1 M sodium citrate tribasic dehydrate pH5.6, 2.2 M ammonium sulfate, 15% (v/v) glycerol, 10 mM L-lysine, 5 mM ATP、MgCl₂ が含まれる結晶は、上記のクライオプロテクト溶液に 10 mM MgCl₂ を加えたものを使用した。

X 線回折実験は SPring-8 ビームライン (BL) BL32XU で 100 K の窒素ガス気流下で行った。全てのデータセットの indexing, integration, scaling は ZOO system の KAMO^[163] と CCP4 suite^[164] の Pointless^[165], Aimless^[166] を用いて行った。初期位相の決定は、1.0 M NaBr を含むクライオプロテクト溶液に浸漬した MgCl₂ 非存在下の結晶を用いて、Br 原子の吸収端近傍の波長 0.918 Å の X 線でデータセットを取得し、Br 単波長異常分散 (SAD) 法と SWISS-MODEL^[167] で作製した Pls-A のホモロジーモデルを鋳型に用いた分子置換 (MR) 法を組み合わせた MR-SAD 法で行った。Pls-A のホモロジーモデルは NRPS アデニル化ドメインの ATP 結合型 CytC1 (PDB ID: 3VNQ)^[168] をテンプレートに作製した。Br イオンの数、位置、位相の決定には PHENIX^[169] の Autosol^[170] を用いた。CCP4 suite の Phaser SAD pipeline^[171] を用いて自動モデル構築を行った。手動でのモデル構築は Coot^[172] で行った。構造精密化は CCP4 suite の Refmac5^[173] で行った。

MgCl₂ 非存在下と存在下の高分解能データセットは、MR-SAD で位相付けし、構築したモデルを鋳型として CCP4 suite の Phaser MR^[171] を用いた MR 法で位相決定した。モデル構築は Coot を用いて行った。構造精密化は CCP4 suite の Refmac5 と PHENIX の phenix.refine^[174] を用いて行った。アデニル化 L-リジンの分子モデルは、ChemOffice の Chem3D と PHENIX の eLBOW^[175] で作製した。最終的に決定した構造の統計データは表 3 にまとめた。 R 値は $R_{\text{factor}} = \sum |F_{\text{obs}}(\text{hkl}) - F_{\text{calc}}(\text{hkl})| / \sum F_{\text{obs}}(\text{hkl})$ で算出し、 R_{free} 値は構造精密化に使用していない全反射の 5% を用いて計算した。

2-8. Pls アデニル化ドメインの活性測定

Pls-A の触媒活性は ATP の消費量を算出することで測定した。20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.2 U/mL inorganic pyrophosphatase (NEB), 1-10 mg/mL Pls-A, 1 mM ATP と 1 mM L-リジンまたは 1 mM L-リジンメチルエステルを含む反応液 (100 μL) を 25 °C, 10 分間インキュベートした。1 M HCl (100 μL) を反応液に添加して反応を停止させた。反応液を 20,630 xg で遠心分離した後、上清 (20 μL) に 1 M NaOH (10 μL) を添加した。この上清を超純水で 10 倍希釈した後、Hi-Trap Q HP (GE Healthcare) にアプライし 0-1 M の範囲の NaCl 濃度のグラジエントにより ATP を溶出した。AKTA pure system を用いて ATP の吸収波長の 260 nm をモニターし、ピーク面積から ATP の量を算出した。ATP のモル吸光係数は製品情報に記載されていた 15,400 M⁻¹cm⁻¹ を使用した。

2-9. Pls の精製

組換え Pls を発現させた *Streptomyces albulus* CRM003 を関西大学の山中一也准教授から提供してもらった。菌体を破碎 Buffer (100 mM Tris-HCl pH8.0, 200 mM NaCl, 20 % Glycerol, 2 mM EDTA, 5 mM DTT) で懸濁し、超音波破碎した。破碎液を 4 °C、117,300 xg で 1 時間、超遠心分離を行い、沈殿した細胞膜を回収した。細胞膜を膜画分 Buffer (50 mM Tris-HCl pH8.0, 500 mM NaCl, 30 % Glycerol) で懸濁した。膜画分に終濃度 1 % DDM+0.2 % CHS となるように添加した後、4 °C で 1 時間攪拌することで Pls を可溶化した。4 °C、117,300 xg で 30 分間、超遠心分離を行い、上清を回収した。上清と TALON 担体を混合し、ローテーターを用いて 4 °C で一晩攪拌した。これを空のカラムに充填し、5 mM Imidazole, といずれかの界面活性剤 (0.04 % DDM+0.008 % CHS、0.01 % LMNG、0.01 % GDN) を含む、10 cv または 30 cv の膜画分 Buffer で担体を洗浄した。次に、200 mM Imidazole, といずれかの界面活性剤 (0.04 % DDM+0.008 % CHS、0.01 % LMNG、0.01 % GDN) を含む、3 cv の膜画分 Buffer で Pls を溶出させた。Pls を 100 kDa cut-off Amicon Ultra-4 concentrator で 400 μL 以下になるまで濃縮し、いずれかの界面活性剤 (0.02 % DDM+0.004 % CHS、0.01 % LMNG、0.01 % GDN) を含むゲルろ過 Buffer (50 mM Tris-HCl pH8.0, 200 mM NaCl, 20 % Glycerol) で平衡化した Superdex200 increase 10/300 または Superose6 increase 10/300 にアプライした。Pls が含まれるピークフラクションを回収して 100 kDa cut-off Amicon Ultra-4 concentrator で濃縮して、-80°C で保存した。

2-10. MSP1E3 と MSP1D1 の発現、精製

pMSP1E3 (addgene) または pMSP1D1 (addgene) をヒートショック法で大腸菌 BL21(DE3) 株に導入し、25 µg/mL Kana を含む TB 培地を用いて 37°C で培養を行った。OD₆₀₀=3.0 で IPTG を終濃度 1 mM となるように添加した後、37°C で 3 時間培養した。その後、培養液を 4 °C、6,640 xg で遠心分離し、菌体を回収した。

菌体を 5 µg/mL Sm2 ヌクレアーゼと 1 % Triton X-100 を含む Basal Buffer (40 mM Tris-HCl pH8.0, 300 mM NaCl) で懸濁し氷上で超音波破碎を行った。破碎液を 38,900 xg で 30 分間遠心分離し、上清を回収した。この上清を Basal Buffer で平衡化した 20 mL の Ni-NTA agarose にアプライし各 MSP を吸着させた。担体を wash1 Buffer (Basal Buffer + 20 mM Imidazole, 1 % Triton X-100) と、wash2 Buffer (Basal Buffer + 20 mM Imidazole, 50 mM Sodium cholate) と、wash3 Buffer (Basal Buffer + 30 mM Imidazole) でそれぞれ 5 cv ずつアプライして洗浄した。その後、Elute Buffer (Basal Buffer + 400 mM Imidazole) で各 MSP を溶出させ、10 kDa cut-off Amicon Ultra-15 concentrator で 10 mL 以下になるまで濃縮した。MSP Buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5, 100 mM NaCl, 0.5 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)) で平衡化した Superdex200 16/60 にアプライし、MSP1E3 または MSP1D1 を含むピークフラクションを回収した。それを 10 kDa cut-off Amicon Ultra-15 concentrator で 10 mg/mL まで濃縮して -80 °C で保存した。

2-11. Pls の Nanodisc 再構成

精製した Pls と大腸菌総脂質抽出物、MSP1E3 または MSP1D1 を任意のモル比で混合し 4 °C で 1 時間攪拌した。その後、SM-2 Bio-Beads (Bio-Rad) を加え、4 °C で一晩攪拌した。この試料を 4 °C、20,630 xg で 10 分間遠心分離して上清を回収した。Glycerol を含まないゲルろ過 Buffer で平衡化した Superose6 increase 10/300 に上清をアプライして、Nanodisc 再構成された Pls を回収し、100 kDa cut-off Amicon Ultra-4 concentrator で濃縮した後、-80 °C で保存した。

2-12. Pls の透過型電子顕微鏡観察の試料調製

観察試料を 0.02-0.05 mg/mL 程度に、試料と同じ界面活性剤を含んだゲルろ過 Buffer で希釈した。カーボン支持膜が張り付けられたメッシュグリッドに対して PIB-10 で 1 分間グロー放電を行い親水化処理した。希釈した 3 µL の観察試料をグリッドのカーボン支持膜に滴下して 1 分間静置した。ろ紙で観察試料を吸い取った後、3 µL の超純水をカーボン支持膜に滴下してろ紙で吸い取る作業を 2 回繰り返した。その後、3 µL の 1 % 酢酸ウランをカ

一ボン支持膜に滴下してろ紙で吸い取る作業を 2 回繰り返し、観察までデシケーター内で保存した。このグリッドを透過型電子顕微鏡を用いて、観察倍率 80,000 倍で撮影した。

表 3 | Pls-A の結晶構造解析に用いた各データの結晶学的統計値

	Br-SAD data	Substrate binding form	AMP-Lys binding form
Wavelength (Å)	0.91800	1.000000	1.000000
Resolution range (Å)	45.2 - 2.91 (3.014 - 2.91)	45.25 - 2.2 (2.279 - 2.2)	45.28 - 2.3 (2.38 - 2.3)
Space group	P 321	P 321	P 321
Unit cell a, b, c (Å)	a = 151.2, b = 151.2, c = 48.157	a = 152.612, b = 152.612, c = 48.159	a = 152.511, b = 152.511, c = 48.202
Unit cell α , β , γ (°)	$\alpha = \beta = 90, \gamma = 120$	$\alpha = \beta = 90, \gamma = 120$	$\alpha = \beta = 90, \gamma = 120$
Total reflections	144941 (14641)	339942 (34127)	266357 (24234)
Unique reflections	14105 (1388)	32883 (3260)	28702 (2842)
Multiplicity	10.3 (10.5)	10.3 (10.5)	8.2 (8.0)
Completeness (%)	99.92 (99.86)	99.98 (100.00)	99.61 (99.93)
Mean I / $\sigma(I)$	10.84 (2.46)	17.27 (2.29)	5.9 (1.5)
Wilson B-factor	43.82	39.60	39.04
R_{merge}	0.234 (1.025)	0.1026 (0.8798)	0.224 (1.275)
R_{meas}	0.2465 (1.077)	0.108 (0.925)	0.239 (1.366)
$CC_{1/2}$	0.99 (0.747)	0.999 (0.822)	0.984 (0.741)
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$		0.186 / 0.224	0.186 / 0.220

終章 結言

本研究ではバイオプロセスによる物質生産の発展を目指し、研究途上にある膜内在性酵素の立体構造や反応機構を理解、機能改変するために、工業的な応用が期待されている中鎖アルカン水酸化酵素 AlkB と、抗菌性ポリマーの ϵ -PL を合成するポリリジン合成酵素 Pls の構造生物学的な実験を行ってきた。

不活性な中鎖アルカンを位置特異的に水酸化する AlkB は、合成化学的な反応と比べて省エネルギーであるため工業応用が期待されている。本研究では AlkB の利用価値を更にも高めるために、低級アルカンの水酸化能の付与を目指して、基質特異性の改変や、立体構造の解析を試みた。AlkB の水酸化可能なアルカンの炭素鎖長の上限は、Trp55 が基質結合ポケットの底部を形成することで決定していると推定されている。AlkB のアミノ酸配列に基づく二次構造予測や膜貫通領域予測から Trp55 近傍に位置すると推定されるアミノ酸残基に変異を導入し基質特異性の改変を試みた。その結果、野生型より短いウンデカンまでしか水酸化できない L59F 変異体を作製することに成功しただけでなく、副次的ではあるが、活性を向上させることにも成功した。変異体解析から、AlkB の基質結合ポケットの近傍に位置すると予測される小さい疎水性側鎖を持つアミノ酸を、嵩高いアミノ酸に置換することで基質特異性の改変や、活性の向上が可能であることが示唆された。また本研究では、結晶化が不要なクライオ電子顕微鏡単粒子解析法による AlkB の構造決定を目指した。この手法は測定試料の分子量が 100 kDa 以上で、対称性を持つ試料であるほど高分解能で構造決定できる。そこで、AlkB に対称性を持つ多量体の膜タンパク質を融合させることで対称性を高めつつ高分子量化する手法を考案し、AlkB に三量体を形成するアンモニアトランスポーターの AmtB を融合させた AmtB-AlkB を作製した。AmtB-AlkB を様々な界面活性剤で可溶化・精製することで、試料調製方法を最適化し、収量を当初の 10 倍以上に増やすことができた。更に、可溶化状態で脂質環境を再現できる Nanodisc 再構成を行うことで、三量体を維持した高純度試料を得ることができ、透過型電子顕微鏡で観察したところ、均一な粒子径を持つことが分かった。今後、AlkB の構造を決定することで、より合理的な変異体設計が可能になり、工業応用に向けて大きく進展させることができる。また、この新規手法による構造解析が可能であれば、AlkB 以外の小さな膜タンパク質に幅広く応用することで、数多く存在する膜内在性酵素の研究を加速させる基盤技術になることが期待される。

ϵ -PL は抗菌性と生分解性を活かした食品防腐剤としての利用価値があるだけでなく、ポリアミド系プラスチックのナイロン 6 と化学構造が非常に類似していることから、これを合成する Pls は、今までにないポリアミド系バイオプラスチックを生産できる可能性のある

酵素として注目されている。Pls のポリマー伸長反応のメカニズムは明らかになっておらず、機能改変は困難であるため、Pls の反応機構を明らかにして機能改変を行うために、構造決定を目指した。まず初めに基質の L-リジンの認識と ATP を用いた活性化を担う、Pls のアデニル化ドメイン (Pls-A) の結晶構造解析を行った。その結果、Pls-A は、基質 L-リジンの ϵ アミノ基と Glu217 が塩橋を形成することで、L-リジン特異的な反応を可能にしていることが明らかとなった。この成果は L-リジン特異的 A ドメインの最初の構造及び NRPS A ドメインの特異性を決める非リボソームコードの情報の提供に貢献した。A ドメインは NRPS のドメインスワップによる新規機能性ポリペプチド合成において非常に重要な要素である。そのため、本研究で得られた Pls A ドメインの立体構造や基質認識機構の知見は、Pls の応用だけでなく、既存のバイオプロセスによる物質生産の改良にも繋がるのが期待される。また、Pls 全長の構造解析に向けて高純度 Pls の調製法を確立することができた。現在はクライオ電子顕微鏡単粒子解析を行っており、構造決定に向けて大きく進展させることができた。

本研究では、バイオプロセスによる物質生産の要となる酵素の中でも、研究途上にある膜内在性酵素について構造生物学的研究を行ってきた。研究対象にした膜内在性酵素は特に工業的な応用が期待されており、本研究は、これらの応用研究の進展に寄与することができたと考えられる。本研究で提案したような新規試料調製法や、近年急激に発展した機械学習を用いたタンパク質構造の予測などを使い、膜内在性酵素の応用研究が今後さらに進展することで、既存のバイオプロセスの改良だけでなく新規有用化合物の生産が期待される。

参考文献

- 1 Mori, Y., Noda, S., Shirai, T. & Kondo, A. Direct 1,3-butadiene biosynthesis in *Escherichia coli* via a tailored ferulic acid decarboxylase mutant. *Nat. Commun.* **12**, 12, doi:10.1038/s41467-021-22504-6 (2021).
- 2 Bhandari, S. *et al.* Microbial Enzymes Used in Bioremediation. *J. Chem.* **2021**, 17, doi:10.1155/2021/8849512 (2021).
- 3 UPDIKE, S., HICKS, G. The Enzyme Electrode. *Nature* **214**, 986-988, doi:<https://doi.org/10.1038/214986a0> (1967).
- 4 Anastas, P. T. & Warner, J. C. *Green Chemistry: Theory and Practice*. (Oxford University Press, 1998).
- 5 Estell, D. A., Graycar, T. P. & Wells, J. A. ENGINEERING AN ENZYME BY SITE-DIRECTED MUTAGENESIS TO BE RESISTANT TO CHEMICAL OXIDATION. *J. Biol. Chem.* **260**, 6518-6521 (1985).
- 6 So, C. M. & Young, L. Y. Initial reactions in anaerobic alkane degradation by a sulfate reducer, strain AK-01. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5532-5540 (1999).
- 7 Cravo-Laureau, C., Grossi, V., Raphel, D., Matheron, R. & Hirschler-Rea, A. Anaerobic n-alkane metabolism by a sulfate-reducing bacterium, *Desulfatibacillum aliphaticivorans* strain CV2803. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3458-3467, doi:10.1128/aem.71.7.3458-3467.2005 (2005).
- 8 Aeckersberg, F., Bak, F. & Widdel, F. ANAEROBIC OXIDATION OF SATURATED-HYDROCARBONS TO CO₂ BY A NEW TYPE OF SULFATE-REDUCING BACTERIUM. *Arch. Microbiol.* **156**, 5-14, doi:10.1007/bf00418180 (1991).
- 9 Aeckersberg, F., Rainey, F. A. & Widdel, F. Growth, natural relationships, cellular fatty acids and metabolic adaptation of sulfate-reducing bacteria that utilize long-chain alkanes under anoxic conditions. *Arch. Microbiol.* **170**, 361-369, doi:10.1007/s002030050654 (1998).
- 10 Rabus, R. *et al.* Anaerobic initial reaction of n-alkanes in a denitrifying bacterium: Evidence for (1-methylpentyl)succinate as initial product and for involvement of an organic radical in n-hexane metabolism. *J. Bacteriol.* **183**, 1707-1715, doi:10.1128/jb.183.5.1707-1715.2001 (2001).
- 11 Callaghan, A. V. *et al.* Diversity of Benzyl- and Alkylsuccinate Synthase Genes in Hydrocarbon-Impacted Environments and Enrichment Cultures. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 7287-7294, doi:10.1021/es1002023 (2010).
- 12 Callaghan, A. V., Wawrik, B., Chadhain, S. M. N., Young, L. Y. & Zylstra, G. J.

- Anaerobic alkane-degrading strain AK-01 contains two alkylsuccinate synthase genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **366**, 142-148, doi:10.1016/j.bbrc.2007.11.094 (2008).
- 13 Grundmann, O. *et al.* Genes encoding the candidate enzyme for anaerobic activation of n-alkanes in the denitrifying bacterium, strain HxN1. *Environ. Microbiol.* **10**, 376-385, doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01458.x (2008).
- 14 Zedelius, J. *et al.* Alkane degradation under anoxic conditions by a nitrate-reducing bacterium with possible involvement of the electron acceptor in substrate activation. *Environ. Microbiol. Rep.* **3**, 125-135, doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00198.x (2011).
- 15 Bian, X. Y. *et al.* Insights into the Anaerobic Biodegradation Pathway of n-Alkanes in Oil Reservoirs by Detection of Signature Metabolites. *Sci Rep* **5**, 12, doi:10.1038/srep09801 (2015).
- 16 Agrawal, A. *et al.* Toluene Depletion in Produced Oil Contributes to Souring Control in a Field Subjected to Nitrate Injection. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 1285-1292, doi:10.1021/es203748b (2012).
- 17 Duncan, K. E. *et al.* Biocorrosive Thermophilic Microbial Communities in Alaskan Worth Slope Oil Facilities. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 7977-7984, doi:10.1021/es9013932 (2009).
- 18 Gieg, L. M., Davidova, I. A., Duncan, K. E. & Suflita, J. M. Methanogenesis, sulfate reduction and crude oil biodegradation in hot Alaskan oilfields. *Environ. Microbiol.* **12**, 3074-3086, doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02282.x (2010).
- 19 Davidova, I. A., Gieg, L. M., Nanny, M., Kropp, K. G. & Suflita, J. M. Stable isotopic studies of n-alkane metabolism by a sulfate-reducing bacterial enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8174-8182, doi:10.1128/aem.71.12.8174-8182.2005 (2005).
- 20 So, C. M., Phelps, C. D. & Young, L. Y. Anaerobic transformation of alkanes to fatty acids by a sulfate-reducing bacterium, strain Hxd3. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 3892-3900, doi:10.1128/aem.69.7.3892-3900.2003 (2003).
- 21 Ball, H. A., Johnson, H. A., Reinhard, M. & Spormann, A. M. Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB1. *J. Bacteriol.* **178**, 5755-5761, doi:10.1128/jb.178.19.5755-5761.1996 (1996).
- 22 Rabus, R. & Heider, J. Initial reactions of anaerobic metabolism of alkylbenzenes in denitrifying and sulfate reducing bacteria. *Arch. Microbiol.* **170**, 377-384, doi:10.1007/s002030050656 (1998).
- 23 Callaghan, A. V. Enzymes involved in the anaerobic oxidation of n-alkanes: from methane to long-chain paraffins. *Front. Microbiol.* **4**, 9, doi:10.3389/fmicb.2013.00089

- (2013).
- 24 van Beilen, J. B., Li, Z., Duetz, W. A., Smits, T. H. M. & Witholt, B. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil Gas Sci. Technol.* **58**, 427-440, doi:10.2516/ogst:2003026 (2003).
- 25 Foster, J. W. & Davis, R. H. A Methane-Dependent Coccus, with Notes on Classification and Nomenclature of Obligate, Methane-Utilizing Bacteria. *J. Bacteriol.* **91**, 1924-1931, doi:doi:10.1128/jb.91.5.1924-1931.1966 (1966).
- 26 Lieberman, R. L. & Rosenzweig, A. C. Biological methane oxidation: Regulation, biochemistry, and active site structure of particulate methane monooxygenase. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **39**, 147-164, doi:10.1080/10409230490475507 (2004).
- 27 Watkinson, R. J. & Morgan, P. Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Biodegradation* **1**, 79-92, doi:10.1007/bf00058828 (1990).
- 28 Kester, A. S. & Foster, J. W. DITERMINAL OXIDATION OF LONG-CHAIN ALKANES BY BACTERIA. *J. Bacteriol.* **85**, 859-869, doi:doi:10.1128/jb.85.4.859-869.1963 (1963).
- 29 Forney, F. W. & Markovetz, A. J. Subterminal Oxidation of Aliphatic Hydrocarbons. *J. Bacteriol.* **102**, 281-282, doi:doi:10.1128/jb.102.1.281-282.1970 (1970).
- 30 Kotani, T., Yamamoto, T., Yurimoto, H., Sakai, Y. & Kato, N. Propane monooxygenase and NAD(+)-dependent secondary alcohol dehydrogenase in propane metabolism by *Gordonia* sp strain TY-5. *J. Bacteriol.* **185**, 7120-7128, doi:10.1128/jb.185.24.7120-7128.2003 (2003).
- 31 Kotani, T., Yurimoto, H., Kato, N. & Sakai, Y. Novel acetone metabolism in a propane-utilizing bacterium, *Gordonia* sp strain TY-5. *J. Bacteriol.* **189**, 886-893, doi:10.1128/jb.01054-06 (2007).
- 32 McDonald, I. R. *et al.* Diversity of soluble methane monooxygenase-containing methanotrophs isolated from polluted environments. *FEMS Microbiol. Lett.* **255**, 225-232, doi:10.1111/j.1574-6968.2005.00090.x (2006).
- 33 Elliott, S. J. *et al.* Regio- and stereoselectivity of particulate methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 9949-9955, doi:10.1021/ja971049g (1997).
- 34 Stanley, S. H., Prior, S. D., Leak, D. J. & Dalton, H. COPPER STRESS UNDERLIES THE FUNDAMENTAL CHANGE IN INTRACELLULAR LOCATION OF METHANE MONO-OXYGENASE IN METHANE-OXIDIZING ORGANISMS - STUDIES IN BATCH AND CONTINUOUS CULTURES. *Biotechnol. Lett.* **5**, 487-492, doi:10.1007/bf00132233 (1983).
- 35 Prior, S. D. & Dalton, H. THE EFFECT OF COPPER IONS ON MEMBRANE

- CONTENT AND METHANE MONOOXYGENASE ACTIVITY IN METHANOL-GROWN CELLS OF METHYLOCOCCUS-CAPSULATUS (BATH). *J. Gen. Microbiol.* **131**, 155-163 (1985).
- 36 Nguyen, H. H. T. *et al.* THE NATURE OF THE COPPER IONS IN THE MEMBRANES CONTAINING THE PARTICULATE METHANE MONOOXYGENASE FROM METHYLOCOCCUS-CAPSULATUS (BATH). *J. Biol. Chem.* **269**, 14995-15005 (1994).
- 37 Murrell, J. C., McDonald, I. R. & Gilbert, B. Regulation of expression of methane monooxygenases by copper ions. *Trends Microbiol.* **8**, 221-225, doi:10.1016/s0966-842x(00)01739-x (2000).
- 38 Green, J., Prior, S. D. & Dalton, H. COPPER IONS AS INHIBITORS OF PROTEIN-C OF SOLUBLE METHANE MONOOXYGENASE OF METHYLOCOCCUS-CAPSULATUS (BATH). *Eur. J. Biochem.* **153**, 137-144, doi:10.1111/j.1432-1033.1985.tb09279.x (1985).
- 39 Lieberman, R. L. & Rosenzweig, A. C. Crystal structure of a membrane-bound metalloenzyme that catalyses the biological oxidation of methane. *Nature* **434**, 177-182, doi:10.1038/nature03311 (2005).
- 40 Semrau, J. D. *et al.* PARTICULATE METHANE MONOOXYGENASE GENES IN METHANOTROPHS. *J. Bacteriol.* **177**, 3071-3079, doi:10.1128/jb.177.11.3071-3079.1995 (1995).
- 41 Stolyar, S., Costello, A. M., Peeples, T. L. & Lidstrom, M. E. Role of multiple gene copies in particulate methane monooxygenase activity in the methane-oxidizing bacterium *Methylococcus capsulatus* Bath. *Microbiology-(UK)* **145**, 1235-1244, doi:10.1099/13500872-145-5-1235 (1999).
- 42 Cao, L. L., Caldararu, O., Rosenzweig, A. C. & Ryde, U. Quantum Refinement Does Not Support Dinuclear Copper Sites in Crystal Structures of Particulate Methane Monooxygenase. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **57**, 162-166, doi:10.1002/anie.201708977 (2018).
- 43 Ross, M. O. *et al.* Particulate methane monooxygenase contains only mononuclear copper centers. *Science* **364**, 566+, doi:10.1126/science.aav2572 (2019).
- 44 Nguyen, H. H. T., Elliott, S. J., Yip, J. H. K. & Chan, S. I. The particulate methane monooxygenase from *methylococcus capsulatus* (Bath) is a novel copper-containing three-subunit enzyme - Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* **273**, 7957-7966, doi:10.1074/jbc.273.14.7957 (1998).
- 45 Chang, W. H. *et al.* Copper Centers in the Cryo-EM Structure of Particulate Methane Monooxygenase Reveal the Catalytic Machinery of Methane Oxidation. *J. Am. Chem.*

- Soc.* **143**, 9922-9932, doi:10.1021/jacs.1c04082 (2021).
- 46 Wang, V. C. C. *et al.* Alkane Oxidation: Methane Monooxygenases, Related Enzymes, and Their Biomimetics. *Chem. Rev.* **117**, 8574-8621, doi:10.1021/acs.chemrev.6b00624 (2017).
- 47 Chan, S. I. *et al.* Efficient Oxidation of Methane to Methanol by Dioxygen Mediated by Tricopper Clusters. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **52**, 3731-3735, doi:10.1002/anie.201209846 (2013).
- 48 Lu, Y. J. *et al.* The PmoB subunit of particulate methane monooxygenase (pMMO) in *Methylococcus capsulatus* (Bath): The Cu-I sponge and its function. *J. Inorg. Biochem.* **196**, 14, doi:10.1016/j.jinorgbio.2019.04.005 (2019).
- 49 Fox, B. G., Froland, W. A., Dege, J. E. & Lipscomb, J. D. METHANE MONOOXYGENASE FROM METHYLOSINUS-TRICHOSPORIUM OB3B - PURIFICATION AND PROPERTIES OF A 3-COMPONENT SYSTEM WITH HIGH SPECIFIC ACTIVITY FROM A TYPE-II METHANOTROPH. *J. Biol. Chem.* **264**, 10023-10033 (1989).
- 50 Rosenzweig, A. C., Frederick, C. A., Lippard, S. J. & Nordlund, P. CRYSTAL-STRUCTURE OF A BACTERIAL NONHEME IRON HYDROXYLASE THAT CATALYZES THE BIOLOGICAL OXIDATION OF METHANE. *Nature* **366**, 537-543, doi:10.1038/366537a0 (1993).
- 51 Liu, K. E. *et al.* KINETIC AND SPECTROSCOPIC CHARACTERIZATION OF INTERMEDIATES AND COMPONENT INTERACTIONS IN REACTIONS OF METHANE MONOOXYGENASE FROM METHYLOCOCCUS-CAPSULATUS (BATH). *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 10174-10185, doi:10.1021/ja00146a002 (1995).
- 52 Lee, S. K., Fox, B. G., Froland, W. A., Lipscomb, J. D. & Munck, E. A TRANSIENT INTERMEDIATE OF THE METHANE MONOOXYGENASE CATALYTIC CYCLE CONTAINING AN FE(IV)FE(IV) CLUSTER. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 6450-6451, doi:10.1021/ja00067a086 (1993).
- 53 Banerjee, R., Proshlyakov, Y., Lipscomb, J. D. & Proshlyakov, D. A. Structure of the key species in the enzymatic oxidation of methane to methanol. *Nature* **518**, 431-434, doi:10.1038/nature14160 (2015).
- 54 Wang, W. X., Iacob, R. E., Luoh, R. P., Engen, J. R. & Lippard, S. J. Electron Transfer Control in Soluble Methane Monooxygenase. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 9754-9762, doi:10.1021/ja504688z (2014).
- 55 Gherman, B. F., Dunietz, B. D., Whittington, D. A., Lippard, S. J. & Friesner, R. A. Activation of the C-H bond of methane by intermediate Q of methane monooxygenase: A theoretical study. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 3836-3837, doi:10.1021/ja0055108 (2001).

- 56 Colby, J., Stirling, D. I. & Dalton, H. The soluble methane mono-oxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath). Its ability to oxygenate n-alkanes, n-alkenes, ethers, and alicyclic, aromatic and heterocyclic compounds. *Biochem. J.* **165**, 395-402, doi:10.1042/bj1650395 (1977).
- 57 Valentine, A. M., Stahl, S. S. & Lippard, S. J. Mechanistic studies of the reaction of reduced methane monooxygenase hydroxylase with dioxygen and substrates. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 3876-3887, doi:10.1021/ja9839522 (1999).
- 58 Hur, D. H., Na, J. G. & Lee, E. Y. Highly efficient bioconversion of methane to methanol using a novel type I Methylomonas sp DH-1 newly isolated from brewery waste sludge. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **92**, 311-318, doi:10.1002/jctb.5007 (2017).
- 59 Henard, C. A. *et al.* Bioconversion of methane to lactate by an obligate methanotrophic bacterium. *Sci Rep* **6**, 9, doi:10.1038/srep21585 (2016).
- 60 Tao, L. *et al.* Expression of bacterial hemoglobin genes to improve astaxanthin production in a methanotrophic bacterium *Methylomonas* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 625-633, doi:10.1007/s00253-006-0708-8 (2007).
- 61 CLARKE, E., Jane ZHU, Baolong GREENFIELD, Derek, Lorin JONES, Stephanie, Rhianon HELMAN, Noah, Charles. Functional expression of monooxygenases and methods of use. (2017).
- 62 Kimura, J. J. H. T. Adrenal steroid hydroxylases. Oxidation-reduction properties of adrenal iron-sulfur protein (adrenodoxin). *Biochem.* **12**, 406-409, doi:10.1021/bi00727a007 (1973).
- 63 Craft, D. L., Madduri, K. M., Eshoo, M. & Wilson, C. R. Identification and characterization of the CYP52 family of *Candida tropicalis* ATCC 20336, important for the conversion of fatty acids and Alkanes to alpha,omega-dicarboxylic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5983-5991, doi:10.1128/aem.69.10.5983-5991.2003 (2003).
- 64 大村恒雄, 石村巽 & 藤井義明. *P450 の分子生物学*. 2 edn, (講談社, 2009).
- 65 Maier, T., Forster, H. H., Asperger, O. & Hahn, U. Molecular characterization of the 56-kDa CYP153 from *Acinetobacter* sp EB104. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, 652-658, doi:10.1006/bbrc.2001.5449 (2001).
- 66 Scheps, D., Malca, S. H., Hoffmann, H., Nestl, B. M. & Hauer, B. Regioselective omega-hydroxylation of medium-chain n-alkanes and primary alcohols by CYP153 enzymes from *Mycobacterium marinum* and *Polaromonas* sp strain JS666. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 6727-6733, doi:10.1039/c1ob05565h (2011).
- 67 Uchio, R. & Shiio, I. Microbial Production of Long-chain Dicarboxylic Acids from n-Alkanes: Part II. Production by *Candida cloacae* Mutant Unable to Assimilate Dicarboxylic Acid. *AGRIC BIOL CHEM* **36**, 426-433,

- doi:10.1080/00021369.1972.10860272 (1972).
- 68 Poulos, T. L., Finzel, B. C., Gunsalus, I. C., Wagner, G. C. & Kraut, J. THE 2.6-Å CRYSTAL-STRUCTURE OF PSEUDOMONAS-PUTIDA CYTOCHROME-P-450. *J. Biol. Chem.* **260**, 6122-6130 (1985).
- 69 Stevenson, J. A., Westlake, A. C. G., Whittock, C. & Wong, L. L. The catalytic oxidation of linear and branched alkanes by cytochrome P450(cam). *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 12846-12847, doi:10.1021/ja963087q (1996).
- 70 Stevenson, J. A., Bearpark, J. K. & Wong, L. L. Engineering molecular recognition in alkane oxidation catalysed by cytochrome P450(cam). *New J. Chem.* **22**, 551-552, doi:10.1039/a801637b (1998).
- 71 Bell, S. G. *et al.* Engineering cytochrome P450cam into an alkane hydroxylase. *Dalton Trans.*, 2133-2140, doi:10.1039/b300869j (2003).
- 72 Nagano, S., Tosha, T., Ishimori, K., Morishima, I. & Poulos, T. L. Crystal structure of the cytochrome P450cam mutant that exhibits the same spectral perturbations induced by putidaredoxin binding. *J. Biol. Chem.* **279**, 42844-42849, doi:10.1074/jbc.M404217200 (2004).
- 73 Xu, F. *et al.* The heme monooxygenase cytochrome P450(cam) can be engineered to oxidize ethane to ethanol. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **44**, 4029-4032, doi:10.1002/anie.200462630 (2005).
- 74 Narhi, L. O. & Fulco, A. J. CHARACTERIZATION OF A CATALYTICALLY SELF-SUFFICIENT 119,000-DALTON CYTOCHROME-P-450 MONOOXYGENASE INDUCED BY BARBITURATES IN BACILLUS-MEGATERIUM. *J. Biol. Chem.* **261**, 7160-7169 (1986).
- 75 Glieder, A., Farinas, E. T. & Arnold, F. H. Laboratory evolution of a soluble, self-sufficient, highly active alkane hydroxylase. *Nat. Biotechnol.* **20**, 1135-1139, doi:10.1038/nbt744 (2002).
- 76 Haines, D. C., Tomchick, D. R., Machius, M. & Peterson, J. A. Pivotal role of water in the mechanism of P450BM-3. *Biochemistry* **40**, 13456-13465, doi:10.1021/bi011197q (2001).
- 77 Meinhold, P., Peters, M. W., Chen, M. M. Y., Takahashi, K. & Arnold, F. H. Direct conversion of ethane to ethanol by engineered cytochrome P450BM3. *Chembiochem* **6**, 1765-1768, doi:10.1002/cbic.200500261 (2005).
- 78 Fasan, R., Chen, M. M., Crook, N. C. & Arnold, F. H. Engineered alkane-hydroxylating cytochrome P450(BM3) exhibiting natively like catalytic properties. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **46**, 8414-8418, doi:10.1002/anie.200702616 (2007).
- 79 Kawakami, N., Shoji, O. & Watanabe, Y. Use of Perfluorocarboxylic Acids To Trick

- Cytochrome P450BM3 into Initiating the Hydroxylation of Gaseous Alkanes. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **50**, 5315-5318, doi:10.1002/anie.201007975 (2011).
- 80 Cong, Z. Q. *et al.* Activation of Wild-Type Cytochrome P450BM3 by the Next Generation of Decoy Molecules: Enhanced Hydroxylation of Gaseous Alkanes and Crystallographic Evidence. *ACS Catal.* **5**, 150-156, doi:10.1021/cs501592f (2015).
- 81 Shoji, O. *et al.* Direct Hydroxylation of Benzene to Phenol by Cytochrome P450BM3 Triggered by Amino Acid Derivatives. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **56**, 10324-10329, doi:10.1002/anie.201703461 (2017).
- 82 Shoji, O., Kunimatsu, T., Kawakami, N. & Watanabe, Y. Highly Selective Hydroxylation of Benzene to Phenol by Wild-type Cytochrome P450BM3 Assisted by Decoy Molecules. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **52**, 6606-6610, doi:10.1002/anie.201300282 (2013).
- 83 Karasawa, M., Stanfield, J. K., Yanagisawa, S., Shoji, O. & Watanabe, Y. Whole-Cell Biotransformation of Benzene to Phenol Catalysed by Intracellular Cytochrome P450BM3 Activated by External Additives. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **57**, 12264-12269, doi:10.1002/anie.201804924 (2018).
- 84 Feng, L. *et al.* Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 5602-5607, doi:10.1073/pnas.0609650104 (2007).
- 85 Li, L. *et al.* Crystal structure of long-chain alkane monooxygenase (LadA) in complex with coenzyme FMN: Unveiling the long-chain alkane hydroxylase. *J. Mol. Biol.* **376**, 453-465, doi:10.1016/j.jmb.2007.11.069 (2008).
- 86 Dong, Y. P. *et al.* Engineering of LadA for enhanced hexadecane oxidation using random- and site-directed mutagenesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**, 1019-1029, doi:10.1007/s00253-012-4035-y (2012).
- 87 Baptist, J. N., Gholson, R. K. & Minor J. Coon. Hydrocarbon oxidation by a bacterial enzyme system: I. Products of octane oxidation. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* **69**, 40-47, doi:10.1016/0006-3002(63)91223-X. (1963).
- 88 Chakrabarty, A. M., Chou, G. & Gunsalus, I. C. Genetic Regulation of Octane Dissimilation Plasmid in *Pseudomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **70**, 1137-1140, doi:10.1073/pnas.70.4.1137 (1973).
- 89 Vanbeilen, J. B., Eggink, G., Enequist, H., Bos, R. & Witholt, B. DNA-SEQUENCE DETERMINATION AND FUNCTIONAL-CHARACTERIZATION OF THE OCT-PLASMID-ENCODED ALKJKL GENES OF PSEUDOMONAS-OLEOVORANS. *Mol. Microbiol.* **6**, 3121-3136 (1992).
- 90 Canosa, I., Sanchez-Romero, J. M., Yuste, L. & Rojo, F. A positive feedback

- mechanism controls expression of AlkS, the transcriptional regulator of the *Pseudomonas oleovorans* alkane degradation pathway. *Mol. Microbiol.* **35**, 791-799, doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01751.x (2000).
- 91 Grant, C. *et al.* Identification and use of an alkane transporter plug-in for applications in biocatalysis and whole-cell biosensing of alkanes. *Sci Rep* **4**, 9, doi:10.1038/srep05844 (2014).
- 92 Nie, Y. *et al.* Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments. *Sci Rep* **4**, 11, doi:10.1038/srep04968 (2014).
- 93 Shanklin, J., Achim, C., Schmidt, H., Fox, B. G. & Munck, E. Mossbauer studies of alkane omega-hydroxylase: Evidence for a diiron cluster in an integral-membrane enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 2981-2986, doi:10.1073/pnas.94.7.2981 (1997).
- 94 Vanbeilen, J. B., Kingma, J. & Witholt, B. SUBSTRATE-SPECIFICITY OF THE ALKANE HYDROXYLASE SYSTEM OF PSEUDOMONAS-OLEOVORANS GPO1. *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 904-911, doi:10.1016/0141-0229(94)90066-3 (1994).
- 95 Shanklin, J. & Whittle, E. Evidence linking the *Pseudomonas oleovorans* alkane omega-hydroxylase, an integral membrane diiron enzyme, and the fatty acid desaturase family. *FEBS Lett.* **545**, 188-192, doi:10.1016/s0014-5793(03)00529-5 (2003).
- 96 Lee, H. J., Basran, J. & Scrutton, N. S. Electron transfer from flavin to iron in the *Pseudomonas oleovorans* rubredoxin reductase-rubredoxin electron transfer complex. *Biochemistry* **37**, 15513-15522, doi:10.1021/bi981853v (1998).
- 97 Lovenberg, W. & Sobel, B. E. Rubredoxin: a new electron transfer protein from *Clostridium pasteurianum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **54**, 193-199, doi:10.1073/pnas.54.1.193 (1965).
- 98 Kok, M. *et al.* The *Pseudomonas oleovorans* alkBAC operon encodes two structurally related rubredoxins and an aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **264**, 5442-5451, doi:10.1016/S0021-9258(18)83565-7. (1989).
- 99 van Beilen, J. B. *et al.* Rubredoxins involved in alkane oxidation. *J. Bacteriol.* **184**, 1722-1732, doi:10.1128/jb.184.6.1722-1732.2002 (2002).
- 100 Ueda, T., Lode, E. T. & Coon, M. J. Enzymatic ω -Oxidation: VI. ISOLATION OF HOMOGENEOUS REDUCED DIPHOSPHOPYRIDINE NUCLEOTIDE-RUBREDOXIN REDUCTASE *J. Biol. Chem.* **247**, 2109-2116, doi:10.1016/S0021-9258(19)45497-5. (1972).
- 101 Hagelueken, G. *et al.* Crystal structure of the electron transfer complex rubredoxin-rubredoxin reductase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**,

- 12276-12281, doi:10.1073/pnas.0702919104 (2007).
- 102 Page, C. C., Moser, C. C., Chen, X. X. & Dutton, P. L. Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature* **402**, 47-52 (1999).
- 103 Vanbeilen, J. B., Penninga, D. & Witholt, B. TOPOLOGY OF THE MEMBRANE-BOUND ALKANE HYDROXYLASE OF PSEUDOMONAS-OLEOVORANS. *J. Biol. Chem.* **267**, 9194-9201 (1992).
- 104 van Beilen, J. B. *et al.* Identification of an amino acid position that determines the substrate range of integral membrane alkane hydroxylases. *J. Bacteriol.* **187**, 85-91, doi:10.1128/jb.187.1.85-91.2005 (2005).
- 105 Naing, S. H., Parvez, S., Pender-Cudlip, M., Groves, J. T. & Austin, R. N. Substrate specificity and reaction mechanism of purified alkane hydroxylase from the hydrocarbonoclastic bacterium *Alcanivorax borkumensis* (AbAlkB). *J. Inorg. Biochem.* **121**, 46-52, doi:10.1016/j.jinorgbio.2012.12.012 (2013).
- 106 Tsai, Y. F. *et al.* Electrochemical Hydroxylation of C-3-C-12 n-Alkanes by Recombinant Alkane Hydroxylase (AlkB) and Rubredoxin-2 (AlkG) from *Pseudomonas putida* GPo1. *Sci Rep* **7**, 13, doi:10.1038/s41598-017-08610-w (2017).
- 107 Schrewe, M., Ladkau, N., Buhler, B. & Schmid, A. Direct Terminal Alkylamino-Functionalization via Multistep Biocatalysis in One Recombinant Whole-Cell Catalyst. *Adv. Synth. Catal.* **355**, 1693-1697, doi:10.1002/adsc.201200958 (2013).
- 108 Ladkau, N. *et al.* Efficient production of the Nylon 12 monomer omega-aminododecanoic acid methyl ester from renewable dodecanoic acid methyl ester with engineered *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* **36**, 1-9, doi:10.1016/j.ymben.2016.02.011 (2016).
- 109 Yuan, M. W. *et al.* Selective Electroenzymatic Oxyfunctionalization by Alkane Monooxygenase in a Biofuel Cell. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **59**, 8969-8973, doi:10.1002/anie.202003032 (2020).
- 110 Melzoch, K., Votruba, J., Habova, V. & Rychtera, M. Lactic acid production in a cell retention continuous culture using lignocellulosic hydrolysate as a substrate. *J. Biotechnol.* **56**, 25-31, doi:10.1016/s0168-1656(97)00074-6 (1997).
- 111 Cheng, P., Mueller, R. E., Jaeger, S., Bajpai, R. & Iannotti, E. L. LACTIC-ACID PRODUCTION FROM ENZYME-THINNED CORN STARCH USING LACTOBACILLUS-AMYLOVORUS. *J. Indust. Microbiol.* **7**, 27-34, doi:10.1007/bf01575599 (1991).
- 112 Salminen, S. & von Wright, A. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, Third Edition.* (CRC Press, 2004).
- 113 Tsuji, H. Poly(lactic acid) stereocomplexes: A decade of progress. *Adv. Drug Deliv. Rev.*

- 107, 97-135, doi:10.1016/j.addr.2016.04.017 (2016).
- 114 Garlotta, D. A literature review of poly(lactic acid). *J. Polym. Environ.* **9**, 63-84, doi:10.1023/a:1020200822435 (2001).
- 115 Achmad, F., Yamane, K., Quan, S. & Kokugan, T. Synthesis of polylactic acid by direct polycondensation under vacuum without catalysts, solvents and initiators. *Chem. Eng. J.* **151**, 342-350, doi:10.1016/j.cej.2009.04.014 (2009).
- 116 Jung, Y. K., Kim, T. Y., Park, S. J. & Lee, S. Y. Metabolic Engineering of Escherichia coli for the Production of Polylactic Acid and Its Copolymers. *Biotechnol. Bioeng.* **105**, 161-171, doi:10.1002/bit.22548 (2010).
- 117 Balla, E. *et al.* Poly(lactic Acid): A Versatile Biobased Polymer for the Future with Multifunctional Properties-From Monomer Synthesis, Polymerization Techniques and Molecular Weight Increase to PLA Applications. *Polymers* **13**, 50, doi:10.3390/polym13111822 (2021).
- 118 Turalija, M., Bischof, S., Budimir, A. & Gaan, S. Antimicrobial PLA films from environment friendly additives. *Compos. Pt. B-Eng.* **102**, 94-99, doi:10.1016/j.compositesb.2016.07.017 (2016).
- 119 Marangoni, C., Furigo, A. & de Aragdo, G. M. F. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding. *Process Biochem.* **38**, 137-141, doi:10.1016/s0032-9592(01)00313-2 (2002).
- 120 Page, W. J., Manchak, J. & Rudy, B. FORMATION OF POLY(HYDROXYBUTYRATE-CO-HYDROXYVALERATE) BY AZOTOBACTER-VINELANDII UWD. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2866-2873, doi:10.1128/aem.58.9.2866-2873.1992 (1992).
- 121 McCool, G. J. & Cannon, M. C. Polyhydroxyalkanoate inclusion body-associated proteins and coding region in *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* **181**, 585-592, doi:10.1128/jb.181.2.585-592.1999 (1999).
- 122 Huijberts, G. N. M., Eggink, G., Dewaard, P., Huisman, G. W. & Witholt, B. PSEUDOMONAS-PUTIDA KT2442 CULTIVATED ON GLUCOSE ACCUMULATES POLY(3-HYDROXYALKANOATES) CONSISTING OF SATURATED AND UNSATURATED MONOMERS. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 536-544, doi:10.1128/aem.58.2.536-544.1992 (1992).
- 123 Park, S. J., Choi, J. I. & Lee, S. Y. Engineering of Escherichia coli fatty acid metabolism for the production of polyhydroxyalkanoates. *Enzyme Microb. Technol.* **36**, 579-588, doi:10.1016/j.enzmictec.2004.12.005 (2005).
- 124 Anderson, A. J. & Dawes, E. A. OCCURRENCE, METABOLISM, METABOLIC

- ROLE, AND INDUSTRIAL USES OF BACTERIAL POLYHYDROXYALKANOATES.
Microbiol. Rev. **54**, 450-472, doi:10.1128/membr.54.4.450-472.1990 (1990).
- 125 Fuchtenbusch, B. & Steinbuchel, A. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates from low-rank coal liquefaction products by *Pseudomonas oleovorans* and *Rhodococcus ruber*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 91-95, doi:10.1007/s002530051492 (1999).
- 126 Philip, S., Keshavarz, T. & Roy, I. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **82**, 233-247, doi:10.1002/jctb.1667 (2007).
- 127 Kobayashi, G. *et al.* Fermentative production of P(3HB-co-3HV) from propionic acid by *Alcaligenes eutrophus* in fed-batch culture with pH-stat continuous substrate feeding method. *Biotechnol. Lett.* **22**, 1067-1069, doi:10.1023/a:1005650132371 (2000).
- 128 Anjum, A. *et al.* Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *Int. J. Biol. Macromol.* **89**, 161-174, doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069 (2016).
- 129 Pagliano, G., Galletti, P., Samori, C., Zaghini, A. & Torri, C. Recovery of Polyhydroxyalkanoates From Single and Mixed Microbial Cultures: A Review. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **9**, 28, doi:10.3389/fbioe.2021.624021 (2021).
- 130 Kocianova, S. *et al.* Key role of poly-gamma-DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Invest.* **115**, 688-694, doi:10.1172/jci200523523 (2005).
- 131 Ashiuchi, M. *et al.* Physiological and biochemical characteristics of poly gamma-glutamate synthetase complex of *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* **268**, 5321-5328, doi:10.1046/j.0014-2956.2001.02475.x (2001).
- 132 Ashiuchi, M., Yamamoto, T. & Kamei, T. Pivotal Enzyme in Glutamate Metabolism of Poly-g-Glutamate-Producing Microbes. *Life* **3**, 181-188 (2013).
- 133 Yamashiro, D., Yoshioka, M. & Ashiuchi, M. *Bacillus subtilis* pgsE (Formerly ywtC) Stimulates Poly-gamma-Glutamate Production in the Presence of Zinc. *Biotechnol. Bioeng.* **108**, 226-230, doi:10.1002/bit.22913 (2011).
- 134 Fujita, K. *et al.* Effect of pgsE expression on the molecular weight of poly(gamma-glutamic acid) in fermentative production. *Polym. J.* **53**, 409-414, doi:10.1038/s41428-020-00413-7 (2021).
- 135 Shih, I. L. & Van, Y. T. The production of poly-(gamma-glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresour. Technol.* **79**, 207-225, doi:10.1016/s0960-8524(01)00074-8 (2001).
- 136 Balogun-Agbaje, O. A., Odeniyi, O. A. & Odeniyi, M. A. Drug delivery applications of

- poly-gamma-glutamic acid. *Futur. J. Pharm. Sci.* **7**, 10, doi:10.1186/s43094-021-00280-w (2021).
- 137 Xu, G. Q. *et al.* Engineering *Corynebacterium glutamicum* for the de novo biosynthesis of tailored poly-gamma-glutamic acid. *Metab. Eng.* **56**, 39-49, doi:10.1016/j.ymben.2019.08.011 (2019).
- 138 Luo, Z. T. *et al.* Microbial synthesis of poly-gamma-glutamic acid: current progress, challenges, and future perspectives. *Biotechnol. Biofuels* **9**, 12, doi:10.1186/s13068-016-0537-7 (2016).
- 139 Shima, S., Matsuoka, H., Iwamoto, T. & Sakai, H. ANTIMICROBIAL ACTION OF EPSILON-POLY-L-LYSINE. *J. Antibiot.* **37**, 1449-1455, doi:10.7164/antibiotics.37.1449 (1984).
- 140 Hiraki, J. *et al.* Use of ADME studies to confirm the safety of epsilon-polylysine as a preservative in food. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **37**, 328-340, doi:10.1016/s0273-2300(03)00029-1 (2003).
- 141 Hamano, Y. *et al.* Biological function of the pld gene product that degrades epsilon-poly-L-lysine in *Streptomyces albulus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 173-181, doi:10.1007/s00253-006-0396-4 (2006).
- 142 Kawai, T., Kubota, T., Hiraki, J. & Izumi, Y. Biosynthesis of epsilon-poly-L-lysine in a cell-free system of *Streptomyces albulus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 635-640, doi:10.1016/j.bbrc.2003.10.033 (2003).
- 143 Fischbach, M. A. & Walsh, C. T. Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: Logic, machinery, and mechanisms. *Chem. Rev.* **106**, 3468-3496, doi:10.1021/cr0503097 (2006).
- 144 Yamanaka, K., Maruyama, C., Takagi, H. & Hamano, Y. epsilon-Poly-L-lysine dispersity is controlled by a highly unusual nonribosomal peptide synthetase. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 766-772, doi:10.1038/nchembio.125 (2008).
- 145 Kito, N. *et al.* Mutational analysis of the three tandem domains of epsilon-poly-L-lysine synthetase catalyzing the L-lysine polymerization reaction. *J. Biosci. Bioeng.* **115**, 523-526, doi:10.1016/j.jbiosc.2012.11.020 (2013).
- 146 Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**, 567-580, doi:10.1006/jmbi.2000.4315 (2001).
- 147 Henderson, R. THE POTENTIAL AND LIMITATIONS OF NEUTRONS, ELECTRONS AND X-RAYS FOR ATOMIC-RESOLUTION MICROSCOPY OF UNSTAINED BIOLOGICAL MOLECULES. *Q. Rev. Biophys.* **28**, 171-193, doi:10.1017/s003358350000305x (1995).

- 148 Liu, Y. X., Huynh, D. T. & Yeates, T. O. A 3.8 angstrom resolution cryo-EM structure
of a small protein bound to an imaging scaffold. *Nat. Commun.* **10**, 7,
doi:10.1038/s41467-019-09836-0 (2019).
- 149 Xia, R. X. *et al.* Cryo-EM structure of the human histamine H-1 receptor/G(q) complex.
Nat. Commun. **12**, 9, doi:10.1038/s41467-021-22427-2 (2021).
- 150 Wang, Y. *et al.* Structure of the formate transporter FocA reveals a pentameric
aquaporin-like channel. *Nature* **462**, 467-U158, doi:10.1038/nature08610 (2009).
- 151 Fu, D. X. *et al.* Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its
selectivity. *Science* **290**, 481-486, doi:10.1126/science.290.5491.481 (2000).
- 152 Buchan, D. W. A. & Jones, D. T. The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years
on. *Nucleic Acids Res.* **47**, W402-W407, doi:10.1093/nar/gkz297 (2019).
- 153 Rodrigues, B. *et al.* Antimicrobial activity of Epsilon-Poly-L-lysine against
phytopathogenic bacteria. *Sci Rep* **10**, 9, doi:10.1038/s41598-020-68262-1 (2020).
- 154 Ryser, H. J. P. & Shen, W. C. CONJUGATION OF METHOTREXATE TO POLY(L-
LYSINE) INCREASES DRUG TRANSPORT AND OVERCOMES DRUG-
RESISTANCE IN CULTURED-CELLS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 3867-3870,
doi:10.1073/pnas.75.8.3867 (1978).
- 155 Conti, E., Franks, N. P. & Brick, P. Crystal structure of firefly luciferase throws light
on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure* **4**, 287-298,
doi:10.1016/s0969-2126(96)00033-0 (1996).
- 156 Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M. A. & Brick, P. Structural basis for the
activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *Embo
J.* **16**, 4174-4183, doi:10.1093/emboj/16.14.4174 (1997).
- 157 Yonus, H. *et al.* Crystal Structure of DltA IMPLICATIONS FOR THE REACTION
MECHANISM OF NON-RIBOSOMAL PEPTIDE SYNTHETASE ADENYLATION
DOMAINS. *J. Biol. Chem.* **283**, 32484-32491, doi:10.1074/jbc.M800557200 (2008).
- 158 Strieker, M., Tanovic, A. & Marahiel, M. A. Nonribosomal peptide synthetases:
structures and dynamics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**, 234-240,
doi:10.1016/j.sbi.2010.01.009 (2010).
- 159 Kaljunen, H. *et al.* Structural Elucidation of the Bispecificity of A Domains as a Basis
for Activating Non-natural Amino Acids. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **54**, 8833-8836,
doi:10.1002/anie.201503275 (2015).
- 160 Maruyama, C. *et al.* A stand-alone adenylation domain forms amide bonds in
streptothricin biosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 791-797, doi:10.1038/nchembio.1040
(2012).
- 161 Challis, G. L., Ravel, J. & Townsend, C. A. Predictive, structure-based model of amino

- acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem. Biol.* **7**, 211-224, doi:10.1016/s1074-5521(00)00091-0 (2000).
- 162 Ritchie, T. K. *et al.* in *Methods Enzymol.* Vol. 464 *Methods in Enzymology* (ed N. Duzgunes) 211-231 (Elsevier Academic Press Inc, 2009).
- 163 Hirata, K. *et al.* ZOO: an automatic data-collection system for high-throughput structure analysis in protein microcrystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D-Struct. Biol.* **75**, 138-150, doi:10.1107/s2059798318017795 (2019).
- 164 Winn, M. D. *et al.* Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. Sect. D-Struct. Biol.* **67**, 235-242, doi:10.1107/s0907444910045749 (2011).
- 165 Evans, P. R. An introduction to data reduction: space-group determination, scaling and intensity statistics. *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* **67**, 282-292, doi:10.1107/s090744491003982x (2011).
- 166 Evans, P. R. & Murshudov, G. N. How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* **69**, 1204-1214, doi:10.1107/s0907444913000061 (2013).
- 167 Guex, N., Peitsch, M. C. & Schwede, T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis* **30**, S162-S173, doi:10.1002/elps.200900140 (2009).
- 168 Ueki, M. *et al.* Enzymatic generation of the antimetabolite gamma,gamma-dichloroaminobutyrate by NRPS and mononuclear iron halogenase action in a streptomycete. *Chem. Biol.* **13**, 1183-1191, doi:10.1016/j.chembiol.2006.09.012 (2006).
- 169 Liebschner, D. *et al.* Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in Phenix. *Acta Crystallogr. Sect. D-Struct. Biol.* **75**, 861-877, doi:10.1107/s2059798319011471 (2019).
- 170 Terwilliger, T. C. *et al.* Decision-making in structure solution using Bayesian estimates of map quality: the PHENIX AutoSol wizard. *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* **65**, 582-601, doi:10.1107/s0907444909012098 (2009).
- 171 McCoy, A. J. *et al.* Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658-674, doi:10.1107/s0021889807021206 (2007).
- 172 Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* **66**, 486-501, doi:10.1107/s0907444910007493 (2010).
- 173 Murshudov, G. N. *et al.* REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. Sect. D-Struct. Biol.* **67**, 355-367, doi:10.1107/s0907444911001314 (2011).
- 174 Afonine, P. V. *et al.* Towards automated crystallographic structure refinement with

- phenix.refine. *Acta Crystallogr. Sect. D-Struct. Biol.* **68**, 352-367, doi:10.1107/s0907444912001308 (2012).
- 175 Moriarty, N. W., Grosse-Kunstleve, R. W. & Adams, P. D. electronic Ligand Builder and Optimization Workbench (eLBOW): a tool for ligand coordinate and restraint generation. *Acta Crystallogr. Sect. D-Struct. Biol.* **65**, 1074-1080, doi:10.1107/s0907444909029436 (2009).

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの指導や助言、及び様々な支援をして頂いた構造生物学研究室の永野真吾教授、日野智也准教授、佐藤祐介テニユアトラック講師、及び今までのメンバーに深く感謝致します。

福井県立大学 生物資源学部生物資源学科 濱野吉十教授、関西大学 化学生命工学部 生命・生物工学科 山中一也准教授には、実験に必要な*S. albulus* NBRC14147のゲノムDNA及びPIsを発現させた菌体の提供をしていただいたことにより、研究を円滑に進めることができました。心より感謝を申し上げます。

理化学研究所 放射光科学研究センター 重松秀樹研究員には、研究を進めるにあたってクライオ電子顕微鏡単粒子解析の協力、及び、短期の研修生として受け入れて頂きありがとうございました。心より感謝致します。

鳥取大学 化学・バイオ系学科の先生方には、分野外の私に対する専門的なアドバイスや、進路等に関する相談に乗って頂きありがとうございました。深く感謝致します。

博士論文の作成にあたり、審査員として勤めて頂いた大城隆教授、木瀬直樹教授、永野真吾教授に深く感謝致します。また、多くの指導や助言をして頂いた方々に感謝致します。

最後に、ここまで生活面、精神面において支援して頂いた両親と妻に心から感謝致します。