

微生物の天然物生合成に見られる
機能の多様化
-構造生物学的な視点から-

2022年1月

末宗 周憲

目次

序章 序論	4
1. はじめに	4
2. タンパク質の進化	5
2-1. タンパク質の収束進化	7
3. 代謝経路の進化	8
3-1. 脂肪酸生合成経路の進化	9
4. 微生物の二次代謝	10
4-1. 芳香族基質プレニル基転移酵素	10
5. カルキノスタチン A の生合成経路	12
6. 複雑な骨格を有する天然物	15
7. アナモックス菌のラダラン脂質生合成経路	16
8. 本研究の目的	20
1章 芳香族プレニル基転移酵素 IptA の結晶構造解析	21
緒言	21
1-1. IptA について	21
結果・考察	25
1-2. 基質非結合型 IptA の結晶構造	25
1-3. リガンド結合型 IptA の結晶構造	26
実験手法	37
1-4. IptA の大量発現及び精製	37
1-5. 基質非結合型 dN19 IptA の結晶化及び X 線結晶構造解析	38
1-6. リガンド結合型 dN19 IptA の結晶化及び X 線結晶構造解析	38
1-7. ドッキングシミュレーションによるジペプチド結合様式の推定	39
2章 放線菌由来新規カルバゾールプレニル基転移酵素の結晶構造解析	41
緒言	41
2-1. スクアレン合成酵素に類似した新規カルバゾールプレニル基転移酵素	41
結果・考察	50
2-2. 基質結合型 LvqB4 の結晶構造	50
2-3. プレニルドナーの結合様式	53
2-4. プレニルアクセプターの結合様式	55

2-5.	反応機構の提案.....	58
2-6.	ドッキングシミュレーションによる CLPP 結合様式の推定.....	59
2-7.	CqsB4 の結晶化に向けたコンストラクト作成と熱安定化化合物のスクリーニング.....	60
2-8.	基質非結合型 CqsB4 の結晶構造.....	62
2-9.	CqsB4 の変異体解析.....	63
2-10.	PCQ 結合型 CqsB4 Δ loop の結晶構造解析.....	64
実験手法		67
2-11.	CqsB4, LvqB4 の発現および精製.....	67
2-12.	LvqB4/CqsB4 の熱安定化化合物スクリーニング.....	69
2-13.	基質非結合型・基質結合型 LvqB4 の結晶化.....	69
2-14.	基質結合型 LvqB4, Se-Met 置換体 LvqB4 の回折データの収集、構造決定.....	70
2-15.	CLPP とのドッキングシミュレーション.....	71
2-16.	LvqB4/CqsB4 の活性測定.....	71
2-17.	CqsB4 の結晶化.....	72
2-18.	回折データの収集.....	73
3章	ラダラン脂質生合成における鍵酵素と推定されるラジカル SAM 酵素の結晶化に向けた試料調製および結晶化スクリーニング.....	74
	緒言	74
3-1.	アナモックス菌のラダラン脂質生合成経路.....	74
3-2.	ラダラン脂質推定鍵酵素であるラジカル SAM 酵素.....	77
結果・考察		84
3-3.	ホロ型ラジカル SAM 酵素の発現系構築に向けた培養条件および精製条件の最適化....	84
3-4.	ホロ型ラジカル SAM 酵素の SAM 分解活性.....	87
3-5.	ホロ型ラジカル SAM 酵素の嫌気条件下での結晶化スクリーニング.....	89
実験手法		90
3-6.	ホロ型ラジカル SAM 酵素の発現.....	90
3-7.	嫌気条件下でのホロ型ラジカル SAM 酵素の精製と結晶化.....	91
4章	<i>Planctomyces limnophilus</i> を用いたアナモックス菌由来タンパク質の異種発現系構築	92
	緒言	92
4-1.	<i>P. limnophilus</i> を用いた異種タンパク質発現系.....	92
結果・考察		93
4-2.	MIC 測定とカナマイシン感受性株のスクリーニング.....	93

4-3. シャトルベクターを用いた形質転換.....	97
4-4. Tn5 transposome を用いた形質転換.....	99
4-5. テトラサイクリン耐性遺伝子を用いた <i>P. limnophilus</i> の形質転換.....	99
実験手法	101
4-6. 培養.....	101
4-7. 形質転換.....	101
参考文献	103
終章	117
謝辞	118

序章 序論

1. はじめに

酵素は主な生体触媒として知られており、鍵と鍵穴の関係と言われるように、基本的には高い基質特異性を有している。しかし、しばしば構造がよく似た物質に対しても触媒活性を示すことが報告されている。1970年代に Jensen によって提唱された酵素進化のリクルート仮説¹によると、始原細胞が持っていた遺伝子の数は現在よりはるかに少なく、生命活動に必要な最小限の酵素しか持っていなかったため、酵素の基質寛容性は非常に高いものであったと考えられている。実際に、共通の遺伝子を祖先に持つタンパク質はそのアミノ酸配列に相同性をもち、類似した機能や触媒様式持つことが知られている。また、これらはそれぞれをサブファミリーとする大きなスーパーファミリーを形成している。その後、進化の多様性の過程でこうした遺伝子が重複と変異を起こすことで、先代の酵素より厳密な基質特異性を獲得し、糖代謝経路や TCA 回路などが複雑化していったと考えられている²。原始地球の気は酸素がほとんどなく還元的環境であったと予測されている³。酸素呼吸を行う生物全般に見られる TCA 回路は代謝中間体を生産する役割と、NADH のような還元当量の形でエネルギーを生み出す二つの重要な役割がある。しかしながら、地球の早い段階で生まれた生物にはこの二つ目の機能が獲得されておらず、のちに発達したものだと考えられている⁴。実際、初期の TCA 回路は回路になっておらず、ピルビン酸からコハク酸へ逆方向に進むことで NAD⁺を生み出し、二酸化炭素を固定するのみであった。これは現在の TCA 回路のコハク酸からオキサロ酢酸への変換経路がもっとも高度に保存されていることから支持されている。また Huynen らは公開されているゲノム情報をもとに、大腸菌、枯草菌、結核菌、出芽酵母、発疹チフスリッチケアのみが完全な TCA 回路の遺伝子をコードしていることを報告した⁵。その他多くの生物のゲノムでは欠如などにより不完全なサイクルであることが明らかとなった。また、グルタミン酸を合成するための生合成前駆体である α -ケトグルタル酸が TCA 回路によって産生されていたことが示唆されている⁴。進化の過程において、既に存在しているピルビン酸脱水素酵素が複製、改良されて α -ケトグルタル酸脱水素酵素を作り、それがとてもよく似た化学反応を起こしたことで、 α -ケトグルタル酸からスクシニル CoA の生合成が可能となった。スクシニル CoA 自体がポルフィリンやヘム、クロロフィルの生合成前駆体である。 α -ケトグルタル酸からスクシニル CoA への変換反応により TCA 回路が完成しているが、このスクシニル CoA 合成酵素はアセチル CoA 合成酵素や他の多くのアシル CoA 合成酵素と近縁関係にあり、共通したフォールディング

を持つ。そのため、遺伝子重複や改良を経ることで新たな代謝経路を獲得したと考えられている⁶。

このように、生物は既存の酵素を利用することでタンパク質の機能を進化させ、代謝経路を進化させることで、より自然に淘汰されないように独自の生存戦略を立ててきた。序章では、タンパク質の進化や代謝経路の進化について取り上げ、スクアレン合成酵素に類似した新規カルバゾールプレニル基転移酵素および高歪み炭素骨格を有するアナモックス菌のラダラン脂質生合成経路についてそれぞれ概説する。

2. タンパク質の進化

タンパク質の分子進化の最も一般的な機構は遺伝子重複とそれに続く分化であると言われている。相同性のあるタンパク質において見られる数多くの変化はほとんどが分岐進化によるものであり、配列比較によって保存されている残基が同定でき、その保存された残基は機能や構造に重要であることが多い⁷。新しい酵素を作る際に、全く新しいものを作るよりもすでにあるものから作り開ける方が効率的である。そのため、タンパク質の構造は配列よりも高度に保存されている場合が多い。これは構造や機能に必要なアミノ酸残基は他の残基と比べてより遅く変化するためである⁸。高い保存性が確認できるアミノ酸配列は機能もしくは構造のどちらかに重要である傾向にあるので構造未知の酵素であっても活性部位残基は判別できる。例としてセリンプロテアーゼの Ser-Asp-His の触媒三残基が挙げられる。同様にタンパク質において機能のために必要な領域も判別できる。ヌクレオチドに結合する多くのタンパク質はロスマンフォールドと呼ばれるドメインを採用している⁹。この構造はヌクレオチドと結合する保存された配列モチーフを有している。配列相同性が低いタンパク質であっても構造が高度に保存されている場合がある¹⁰。それにもかかわらず構造がとても類似しているタンパク質も存在する（図 1）ため構造比較から新たなホモログが発見できる可能性がある。

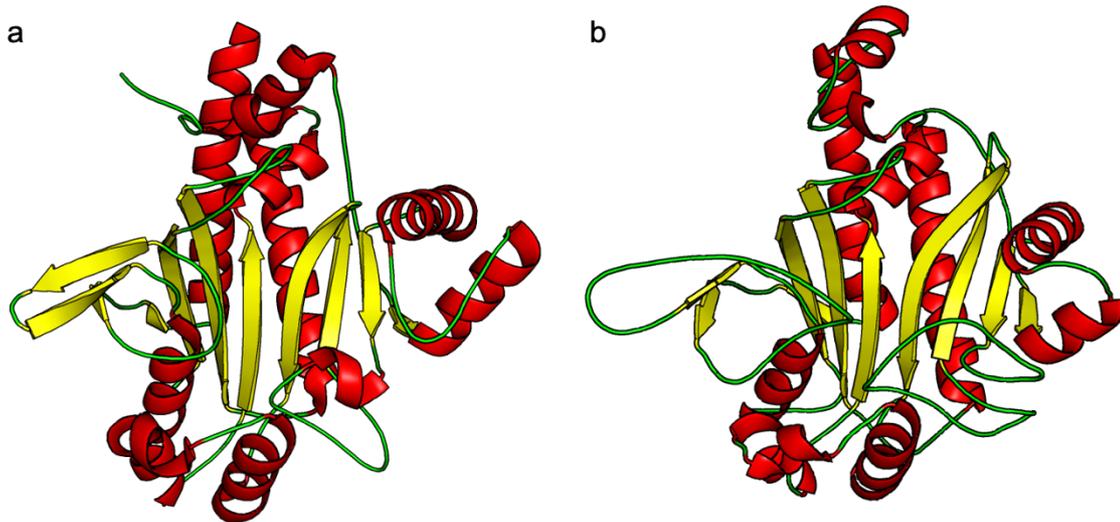


図 1 a. AspRS の触媒ドメインの構造 b. AnsA の構造

(a)酵母由来 asparatyl-tRNA synthase と(b)大腸菌由来 asparagine synthase の構造。それぞれのアミノ酸配列の相同性は低いのも関わらず全体構造は類似している。

進化の過程でランダムに生じるアミノ酸変異によって分子機能発現に必須の立体構造が変化する場合、その変異が生じた個体は淘汰される。したがって、分子機能発現に必要な立体構造が維持される個体だけが生き残るため、配列が変化しても立体構造が変わらないように見える。また、このように多様化したタンパク質の遺伝子が他の生物種へ水平伝播されるため、異なる生物種においても構造が高度に類似したタンパク質が多く確認されている。実際に大腸菌は自身のゲノムの 10-15%をこのように獲得したと考えられている。類似した機能を持つアナログと呼ばれる酵素は、このような進化的圧力を受けて広範囲に広まった現象であると考えられている⁶。

2-1. タンパク質の収束進化

また、新しい酵素を作る方法として、古いものを適応させる方法がある。酵素によって化学反応が促進されるためには、基質を活性部位に正しい配置で結合することと、化学的に反応を触媒することが重要である。そのため、基質に結合する酵素を用いて化学反応を変化させるか、正しい化学反応をする酵素を用いて結合を変化させる必要がある。実際、これらは二つとも自然界で起きている。しかしながら、化学反応を保存する方がより一般的である。これは触媒反応についての構造的な条件が結合に関する条件よりも厳しいからであると考えられている^{11,12}。

現存している酵素の多くは一つの反応を極めて特異的に触媒しその機能が効率化されている。古い酵素から新しい酵素を生み出すということは古い機能を失うことを意味している。これらは選択圧によって淘汰されるが、新しい機能の起源はどこにあるのかという問題がある¹²。これについては、初めから基質の寛容性や弱くとも異なる反応を触媒することがすでにできていたという仮説が有力である¹³。実際、キモトリプシンやアルカリフォスファターゼなどの加水分解酵素では活性化された水をトリガーとするような反応であるため、一つ以上に基質に対しての反応が起こりうる。これにより、重複された遺伝子産物が弱い二番目の活性を保持し、初期の活性と独立して発達する¹²。

二つかそれ以上の異なる機能を持つタンパク質をムーンライティングタンパク質と呼び、シトクロムcやホスホグルコースイソメラーゼなど数多く確認されている¹⁴。またこれらは多くが二つ目の機能が酵素活性ではなく、アポトーシスや転写抑制などの機能を持つ(表 1)。

表 1 ムーンライティングタンパク質の例

酵素	機能	2つ目の機能
シトクロムc	電子輸送	アポトーシス
PutA	プロリン脱水酵素	転写抑制因子
ホスホグルコースイソメラーゼ	糖分解酵素	サイトカイン
チミジンホスホリラーゼ	生合成酵素	内皮増殖因子
アコニターゼ	TCA回路酵素	鉄応答因子結合タンパク質
チミジル酸合成酵素	生合成酵素	翻訳阻害
FtsH	メタロプロテアーゼ	シャペロン
birA	ビオチン合成酵素	オペロン抑制因子
乳酸脱水酵素	糖分解酵素	クリスタリン

つまり、タンパク質だけでなく、その制御などについても分化が可能であることを示唆している。糖分解や TCA 回路の酵素など、未だに明らかにされていないものの、豊富にあるハウスキーピング酵素にもいくつかのムーンライティングタンパク質が存在している¹⁵。

このように始原的な酵素が幅広い基質特異性を持ち、進化の過程である特有の酵素活性を得てきたと考えられている。古代の生物ではゲノムサイズの小ささゆえにこの手法を採用しており、遺伝子重複を起こすことで分化してきた¹²。この進化の過程で複数の経路で機能する遺伝子の複製が起き、分化し、各代謝経路に特化した酵素をコードしていることが近年明らかになってきた。次節では代謝経路の進化について概説する。

3. 代謝経路の進化

生物の代謝経路は従属栄養生物の成長に使用される化合物の枯渇に応じて進化したと考えられている。始原生物は成長に必要な化合物を利用するために複数の代謝プロセスにおけるいくつかの同様な反応のために幅広い基質寛容性を持つ単一の酵素が用いられていたと考えられている¹⁶。進化の過程で複数の経路で機能する能力を持つ酵素遺伝子が複製され、分化して各代謝経路に特化した酵素へと進化した。現存する生物が有する、脂肪酸の生合成経路を例に概説する。

3-1. 脂肪酸合成経路の進化

脂肪酸、およびその代謝物はエネルギー源としての役割や膜の構成成分としての役割がある。この生合成はすべての生物種において保存された反応メカニズムを用いている。真核生物ではI型脂肪酸合成 (FAS I) と呼ばれるサイクルを経て触媒され、この酵素は非常に大きな酵素複合体を形成している。一方で細菌の脂肪酸合成はII型脂肪酸合成 (FAS II) と呼ばれる種々の酵素が解離し個別の酵素としてその反応を触媒する(図 2)。

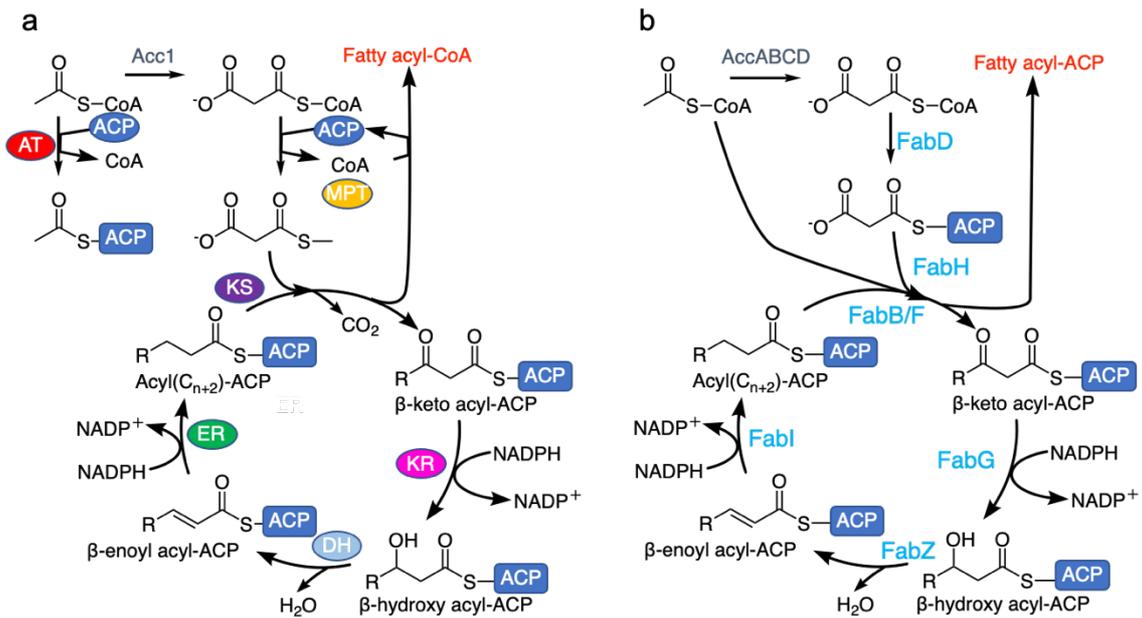


図 2 I 型 (a) 及び二型 (b) 脂肪酸合成経路

AT: ACP acyltransferase, MPT: malonyl/palmitoyl transferase, KS: keto synthase, KR: ketoacyl reductase, DH: dehydratase, ER: enoyl-reductase

FAS II ではすべて別々の遺伝子から個々のポリペプチドを発現している。このように多機能な FAS I が進化の過程で形成された最も有力な仮説として、FAS II の酵素をコードする遺伝子が融合して誕生したと考えられており、Schweizer らによる酵母を用いた遺伝学的実験によって強く支持されている^{17,18}。FAS システムの進化では単機能の祖先から多機能のタンパク質が誕生していることが示唆されている。また酵素複合体を形成することで、異なる構成要素の反応物の化学量論的な生産が保証される利点がある。しかし、同一のポリペプチド上に複合体があるということはタンパク質合成時のエラーが有害になりやすいという欠点が存在する。原核生物のリボソームは真核生物のリボソームよりもエラーを起こしやすいことがこれまでに報告されているため、これが原核生物において単機能の酵素を組み合

わけて FAS システムを構築している理由となると考えられている。最近では脂肪酸生合成酵素 FabI およびポリケチドエノイル還元酵素の結晶構造が明らかになったことにより、構造生物学的に多機能酵素複合体の進化的起源についての考察が行われている¹⁹。脂肪酸合成のメカニズムはすべての生物で基本的に同じであるが、脂肪酸合成酵素複合体は、生物によって驚くほど多様な構造形態で存在している。これは、進化の過程で、既存の小さなタンパク質をコードする遺伝子が融合して、新規のタンパク質が生まれることを示している²⁰。

また、放線菌 *Streptomyces albulus* は一次代謝のアミノ酸合成、リジンの生合成経路に新たに ϵ -ポリ-L-リジン生合成酵素 Pls を加えることで抗菌活性を有する ϵ -ポリ-L-リジンを合成する。このように既存の代謝経路に新規酵素を加えることで一次代謝から二次代謝へと多様性を獲得しているのだと考えられる。次節では有用天然物の生合成経路について、の二次代謝産物を例に概説する。

4. 微生物の二次代謝

人類が初めて手に入れた抗生物質ペニシリンや結核治療薬のストレプトマイシンなど微生物の二次代謝産物から、有用な生理活性を持つ創薬のリード化合物（新薬候補化合物）が多数発見されてきた。特に放線菌、*Streptomyces* 属は土壌放線菌の 90% を占めるため、これらが生産する二次代謝産物は新規生理活性物質の主な供給源となっている²¹。また、その生産物は構造的に特徴的なものが多く、化合物多様性がある。単純なアミノ酸誘導体から複雑な骨格を持つ化合物まで多様な構造を持つものが多く存在している。既知の二次代謝産物はペプチド由来の化合物や、ポリケチド、非リボソームペプチドがベースとなっている化合物や、 β -ラクタム構造を持つ化合物など、数多くの種類が知られている。ポリケチド合成酵素によるポリケチド生合成経路では脂肪酸生合成経路と類似した酵素反応が行われていることでも知られている²²。

4-1. 芳香族基質プレニル基転移酵素

二次代謝でよく見られる芳香族基質プレニル基転移酵素 (PTase) は構造的および生物学多様性を生み出す化合物を生産するため、過去 20 年ほど、生化学的、分子生物学的、構造生物学的研究が積極的に行われている²³。特に、ジメチルアリルトリプトファンシターゼ (DMATS) ファミリーに属する 40 種以上の酵素の機能が同定されるなど、活発に研究が進められている。DMATS はトリプトファン、トリプトファン含有ペプチド、およびその他インドール誘導体などの芳香族基質を位置立体選択的にプレニル化する²⁴。数多くの

PTase の結晶構造が解明されており、プレニル基転移反応メカニズムについての知見が深まっている。また PTase はリポキノン合成および植物、真菌、細菌など広範な生物種の多くの二次代謝に重要な酵素であることが明らかとなっている²³。リポキノン生合成に関する PTase は膜タンパク質であり、Mg²⁺イオンを介してプレニル基を転移するアスパラギン酸に富むモチーフを有している^{23,25}。これとは対照的に *Streptomyces roseochromogenes* 由来のクロロビオシン生合成に関する PTase である CloQ は可溶性酵素であり、アスパラギン酸モチーフを含まず、Mg²⁺およびその他二価カチオンの非存在下で活性を示す^{26,27}。*Streptomyces* sp. CL190 株由来のナフトテルピン生合成に関する NphB は PT バレルと呼ばれるこれまでに観察されていなかった特徴的なフォールドを持つことが明らかとなり(図 3)、この $\alpha\beta\alpha$ リピート構造はインドール PTase および DMATS ファミリーにおいて構造が保存されている²⁸。

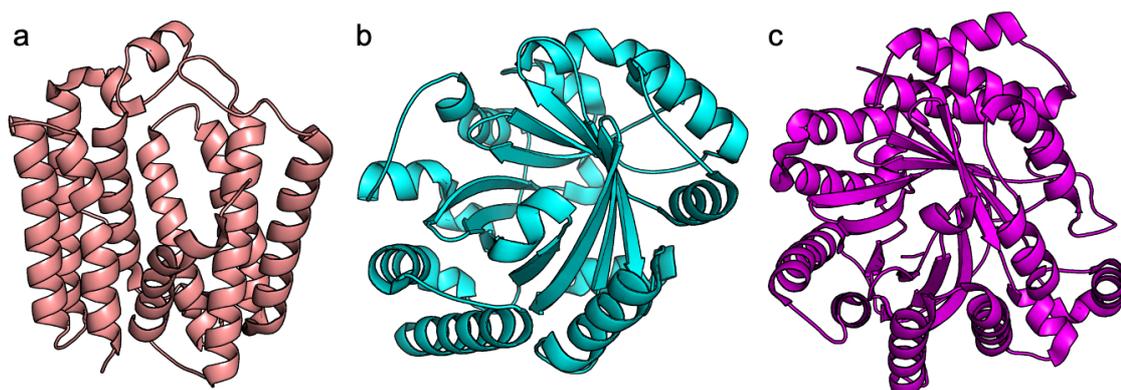


図 3 代表的な芳香族 PTase の結晶構造

(a). UbiA (PDB ID: 4OD5) ユビキノン合成に関する PTase (b). NphB (PDB ID: 1ZDW) ナフトテルピン生合成に関する PTase (c). FgaPT2 (PDB ID: 3I4X) DMATS ファミリーの PTase

またこれらの酵素が触媒する芳香族プレニル化はすべて二次代謝に関与すると考えられている。しかし、PSI-BLAST による配列比較では二つのファミリー間に相同性がなく、これらが独立して同じフォールドに収束した可能性が示唆されている。これら二つのファミリーは $\alpha\beta\alpha$ モジュールの増幅によって生じたと考えられている。さらに、HHsearch と呼ばれる配列比較法を用いることで、PT バレルフォールドを有する可溶性タンパク質はすべて共通の祖先をもつことを示唆している²⁹。対照的に、HHsearch の結果は膜結合型 PTase の UbiA とは関係を示さなかった。これは進化的にプレニルニリン酸から生成される不安定なアリルカチオン中間体の保護のために、芳香族 PTase ではバレル構造を、膜結合型 PTase

では膜貫通ヘリックスを採用したためであると考えられている。また、PT バレルフォールドを有する酵素はすべて二次代謝経路に属するのに対し、膜結合型 PTase は一次代謝に関与している。

二次代謝に関与する芳香族プレニルトランスフェラーゼはアミノ酸、スチルベン、アルカロイド、ポリケチド、フラボノイドなどのフェニルプロパノイドなど、微生物および植物の多種多様な生理活性物質に見られ、プレニル基に付加によって生物活性が変化、または強化された天然物を生産する³⁰。プレニル化は多くの場合生体膜への親和性と細胞内標的の相互作用を高めることによりプレニル化される前の化合物と比較して高い生理活性を示す。CloQ, NovQ, NphB の発見とそれぞれの機能特性評価が行われたことにより放線菌で多くの関連遺伝子とコードされるタンパク質が同定され、中でもインドールプレニルトランスフェラーゼ IptA はそのホモログが放線菌の遺伝子クラスターに広く分布していることから注目されている³¹。これらの遺伝子クラスターはその構成遺伝子に基づいて二つのタイプに分類される。インドールプレニルトランスフェラーゼに加えてトリプトファンナーゼの遺伝子を含むクラスターと、フラビン依存性モノオキシゲナーゼ遺伝子を有するクラスターの二種類に分類される。2010年、高橋らは *Streptomyces* sp. SN-593 株から IptA の生化学的機能特性を報告した³²。IptA は 6-ジメチルアリルインドール-3-カルバルアルデヒドの生合成に関与し、トリプトファンの C-6 位置へのジメチルアリル基の転移を触媒し、6-ジメチルアリルトリプトファンを生成する。この IptA に対する BLAST 検索の結果、*Streptomyces* 属由来のホモログである *Streptomyces ambofaciens* ATCC2377 の SAML0654、*Streptomyces coelicolor* A3 の SCO7467 がそれぞれ 60 %, 58 % のアミノ酸配列の相同性を示すことが明らかとなり、これらの酵素とその他の細菌、真菌由来プレニルトランスフェラーゼの分子系統樹解析により、三つのグループに分類されることを示した。

さらに最近、葛山らはこれらに加えて新規の芳香族プレニルトランスフェラーゼを報告した。次節ではこれについて概説する。

5. カルキノスタチン A の生合成経路

葛山らは最近、強力な神経保護物質であるカルキノスタチン A 生合成を担う全遺伝子群を *Streptomyces exfoliatus* から同定した³³。カルキノスタチン A はピロール環の両側に二つの芳香環が融合した三環式化合物であるカルバゾールアルカロイドである(図 4)。

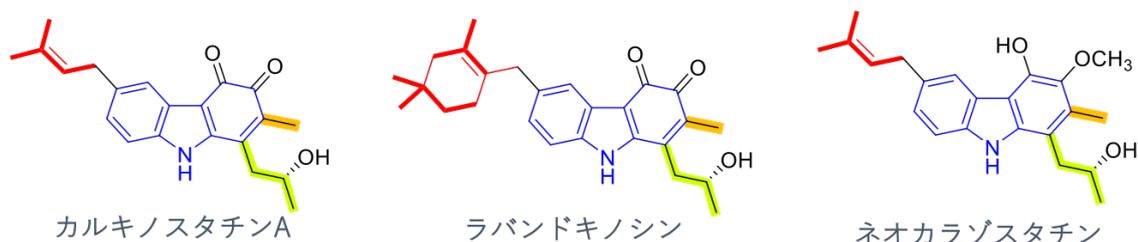


図 4 放線菌が生産するカルバゾールアルカロイド

1872年にコールタールからカルバゾールが最初に単離され、1965年にカレーの木からムラヤニンと呼ばれる化合物が抗生物質として同定された³⁴。それ以来、カルバゾールアルカロイドはその生物学的活性と構造の多様性から有望な医薬品リード化合物として重要な分子として注目されている。カルバゾール系の複素環分子はベンゼン環がインドール環の2,3-位置に融合したインドール様構造と芳香族求電子置換、酸化反応など、化学的に有用な反応を示すことのできる π 共役骨格を有している。これらの化合物は植物、真菌、一部の細菌など、様々な生物から単離されている。またカルバゾール環のA環の酸化状態によって、カルバゾール骨格のタイプはMono- or di-oxygenated-typeとHydroxylated- and aminated-typeに分類される。現在、細菌由来カルバゾールはフリーラジカルによって引き起こされる酸化損傷から神経細胞を保護する抗酸化剤としての有用性が見出されている³⁵。

カルバゾール化合物の生合成経路解明に向けた先行研究として、HuangらはネオカラゾスタチンAと呼ばれるカルキノスタチンAに非常に類似した化合物の生合成経路を2015年に報告している³⁶。この報告では遺伝子欠損実験によって、preneocarazostatinにNzsGと呼ばれる酵素がカルバゾール環へのプレニル基の転移を触媒することが明らかにされた。当時NzsGは*Streptomyces*由来のhypothetical proteinと高い相同性(60%-65%)を示すことが報告されており、さらにフィトエン合成酵素やスクアレン合成酵素スーパーファミリーと25-45%程度の配列相同性を示すことも明らかとなった。NzsGのアミノ酸配列には、スクアレン合成酵素スーパーファミリーに特徴的な金属イオンを介してプレニルニリン酸を結合するために必要な特徴的なアスパラギン酸リッチモチーフDDxxDが保存されていた。同様に、カルキノスタチンA生合成遺伝子クラスター中にもnzsGと相同性を示す遺伝子cqs**4**が見出された。これら二つの酵素は既知の芳香族PTaseとは相同性を示さない。

成遺伝子クラスターを持つ細菌がいくつか見つかり、それらの細菌はカルバゾール化合物を生産すると推定された(図 6)。

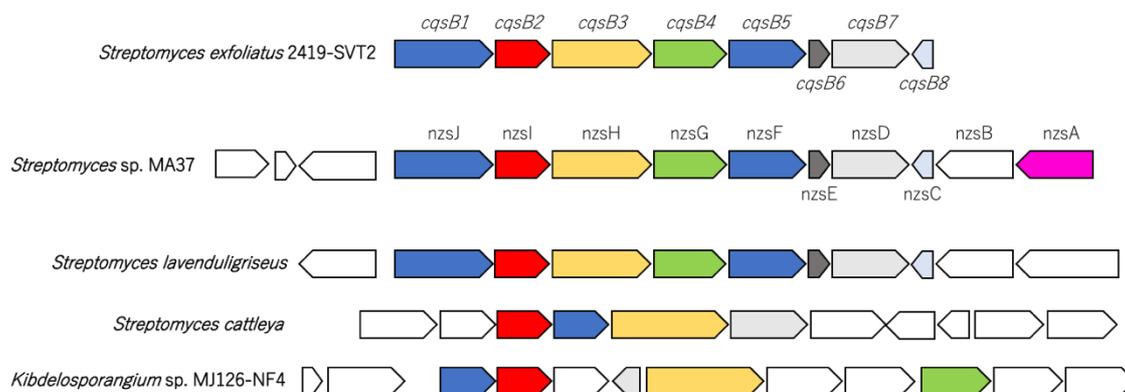


図 6 カルバゾール骨格生合成遺伝子を持つホモログのバクテリア間での分布

これらのゲノム解析により自然界における幅広いカルバゾール合成機構の分布が明らかになり、今後さらに新規カルバゾール含有二次代謝産物の発見が続くと期待されている。

6. 複雑な骨格を有する天然物

生合成経路の解明、およびその再構築は、微生物が生産する有用な天然生理活性物質の工業利用などにおいて非常に重要である。また、有用な生理活性物質は酵素による位置・立体特異的な化学修飾を受けていることが多いため、有機化学的なアプローチではその合成が非常に困難な複雑骨格を有する化合物も多くある。そこで、各難化学反応を触媒する酵素の応用が期待されている。生合成を利用した効率的な物質生産はカーボンニュートラルな持続性社会の実現に向けて必須である。天然物構造多様性の遺伝子・酵素・反応の視点からの精密解析に基づき、新たに生合成工学や合成生物学の世界最先端の技術基盤を確立することで、生合成システムの合理的再構築による複雑骨格機能分子の革新的創生科学を展開することが期待される。酵素のみならず代謝経路全体を再構築することで、ゲノムから代謝経路までを人為的に、合理的にデザインし、進化工学的に適切な選抜・淘汰過程を組み合わせることで、医薬品など広く有用物質の安定供給を可能にすることができると期待される。また、従来の有機合成プロセスよりもクリーンかつ経済的であるため、エネルギー、新規素材の生産技術の革新にも直結する。複雑な骨格を有する天然物は既存の代謝経路に新規の酵素を追加することで構築されている可能性があり、その生合成経路の解明が天然有用生理活性物質の利用につながる。そこで、我々は高いひずみエネルギーを持ち、ジェット燃料等への応用が期待される、アナモックス菌のラダラン脂質に注目した。

7. アナモックス菌のラダラン脂質生合成経路

全ての生物にとって必須の元素である窒素は、主に微生物が行う窒素循環によって様々な窒素化合物へと変換され地球環境中を循環している³⁷。分子状窒素は窒素固定菌によりアンモニウムイオンへ変換されたのち、硝化細菌によって好氣的に硝酸まで酸化され、脱窒菌によって嫌氣的に分子状窒素へと還元される³⁸。この従来の窒素循環に加え、同化的硝酸還元や、異化的硝酸還元と嫌氣的アンモニア酸化（Anaerobic ammonium oxidation, Anammox）なども新たな窒素循環の経路として認識されている³⁹⁻⁴²。このアナモックスと呼ばれる反応を行う反応を行う微生物は 1977 年に Broda らによって熱力学的な計算から

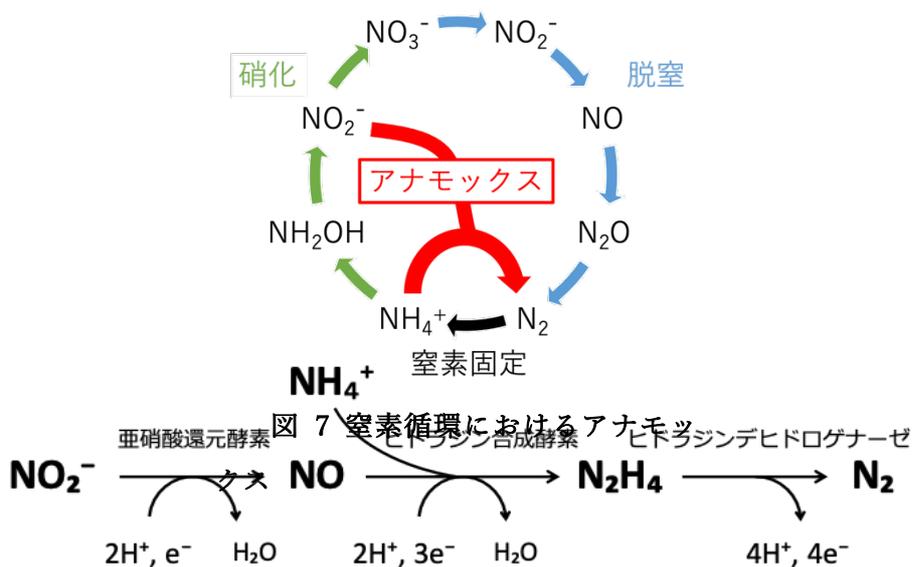


図 7 窒素循環におけるアナモックス

その存在が示唆され⁴³、1995 年に Mulder らによってオランダデルフト工科大学の脱窒処理リアクターから発見された⁴⁴。また、Strous らによって Percoll 密度勾配法による 99 % の純化が行われたがいまだに純粋培養には成功していない⁴⁵。その後 2006 年には *Kuenenia stuttgartiensis* 株の約 4.4 Mbp のほぼ全てのゲノムが解読された⁴⁶。これにより FISH 法を用いたアナモックス菌の検出が可能となり、地球上の様々な海洋環境におけるアナモックス菌の研究が行われた。その結果、地球上の様々な水域にアナモックス菌が存在することが明らかとなり、総窒素生産の約 50 % を担うことが推定されている。これにより近年、アナモックス菌は地球海洋環境における重要な窒素循環のプレーヤーとして注目されている(図 7)。

アナモックス菌はその倍加時間が約 10 日と非常に遅い。それに伴い、自身のエネルギー獲得反応であるアナモックスもゆっくり進行すると考えられている。アナモックスは三

段階の反応からなり、代謝中間体としてその還元力や反応性の高さから生体内では毒性を示すことが報告されている一酸化窒素やヒドラジンを生成する(図 8)⁴⁶。

そこでアナモックス菌はラダラン脂質(図 9)と呼ばれる他の天然物には例を見ない 4 員環が複数連なった歪みの大きな梯子状疎水基を有する脂質を稠密に集積させた細胞内区画で窒素代謝を行い、毒性代謝中間体の拡散を防いでいると考えられていた。

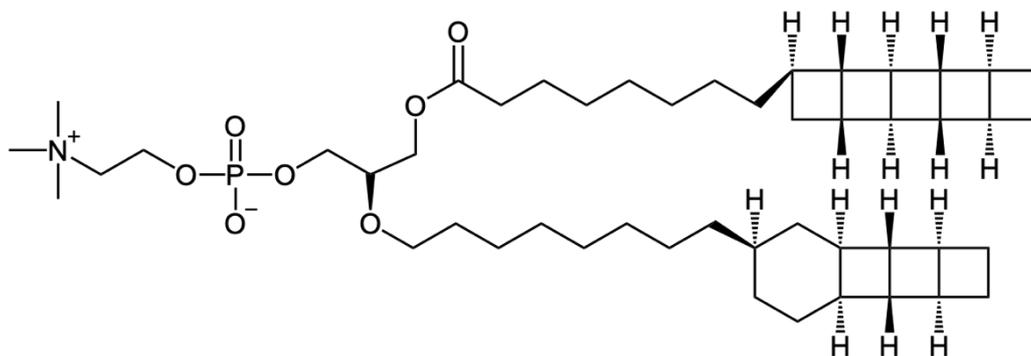


図 9 ラダラン脂質

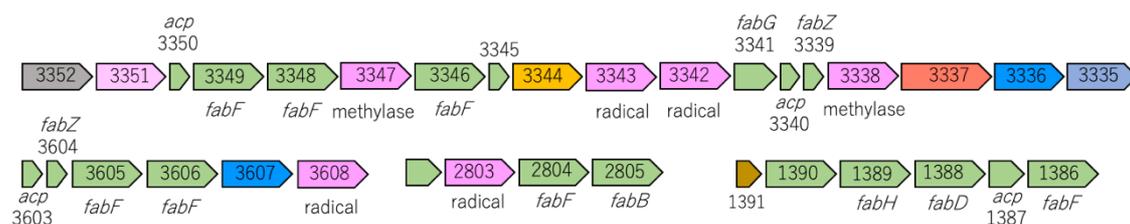
しかし、2018 年に Moss らがラダラン脂質の全合成およびラダラン脂質を用いたリポソームを用いて、ヒドラジンとプロトンの拡散速度を測定したところ、ラダラン脂質の本質的な役割はヒドラジンの拡散抑制ではなく、プロトンの受動拡散を防ぐことであると提案されている⁴⁷。アナモックス菌の倍加時間が極めて遅いため、アナモックスに共役して生じるプロトン濃度勾配を効率よく ATP 合成に用いる必要があり、このプロトンの受動拡散を防ぐためにラダラン脂質を生合成しているという仮説はより強く支持されるだろう。

また、ラダラン脂質はその梯子状疎水基の歪みエネルギーの大きさから、高い体積密度を持つエネルギー原料としても価値を見出されている(表 2)⁴⁸。

表 2 ラダラン脂質とジェット燃料の体積エネルギーの比較

ラダラン脂質とジェット燃料の体積エネルギー密度の比較	
ラダラン脂質とジェット燃料	体積エネルギー密度 (MJ/L)
シクロブタン, C ₄ H ₈	33.0
[2]-ラダラン, C ₆ H ₁₀	42.3
[3]-ラダラン, C ₈ H ₁₂	46.3
[4]-ラダラン, C ₁₀ H ₁₄	49.2
[5]-ラダラン, C ₁₂ H ₁₆	51.4
ジェット燃料 (ケロシン)	35.1
バイオ合成パラフィンケロシン	33.2

現在、有機合成によって 40 %程度の収率で全合成されているが、多段階の反応や化学的に困難な反応を必要とする^{47,49}。さらにラダラン脂質のその梯子状疎水基の構造は構造の新規性から未知のメカニズムを介して生合成されている可能性があるため、この脂質を大量に生産するアナモックス菌のラダラン脂質生合成メカニズムが注目されている。これまでに Rattray らは最初に全ゲノムが解読された *Kuenenia* 株のアナモックス菌を用いた脂肪酸生合成遺伝子クラスターの詳細な解析により、大腸菌などが有する一般的な脂肪酸生合成酵素に加え、通常は脂肪酸の生合成に関与しない遺伝子を多数持つことを報告した(図



10)⁵⁰。

図 10 *Kuenenia stuttgartiensis* の脂肪酸生合成遺伝子クラスター

これらにはラジカル SAM 酵素や SAM 依存性メチル基転移酵素、フィトエン不飽和化酵素などと高い相同性を示す酵素遺伝子が含まれていた。このゲノム解析から好冷性硫酸還元菌の一種である *Desulfotalea psychrophila* のゲノムと比較的高い相同性を示すことが明らかとなった。この菌は C_{31:8} などの稀有な多価不飽和脂肪酸を合成するが、ラダラン脂質は生産しない。またラダラン脂質を生産しない *D. psychrophila* のゲノムには存在しない遺伝子が二つ *K. stuttgartiensis* にあった。これら二つの遺伝子は Kuste2803, Kuste3347 であり、それぞれコバラミン依存性ラジカル SAM 酵素、SAM 依存性メチル基転移酵素をコードする。この二つの遺伝子は現在ゲノムが公開されている他のアナモックス菌種である *Jettenia caeni*, *Brocadia fulgida*, *Brocadia sinica*, *Scalindua rubra* に保存されているか確認したところ、Kuste3347 は *Scalindua rubra* に保存されていなかった。一方で、Kuste2803 は全てのアナモックス菌に保存されており、ラダラン脂質生合成鍵酵素となっているのではないかと支持されている。現在までに、一般的な脂肪酸生合成に関与する酵素が直鎖の飽和脂肪酸を合成したのち、フィトエン不飽和化酵素によるラダラン脂質前駆体の合成が行われ、これを基質としてコバラミン依存性ラジカル SAM 酵素が環化反応を担うことでラダラン脂質が生合成される経路が提案されている(図 11)。

しかし現在までにこの仮説を支持する実験的証拠は得られていない。そこで我々は各種族間で最も高い保存性を示し、既知の酵素反応にはない梯子状疎水基の構築を担うことでラダラン脂質合成における鍵段階反応を触媒すると考えられている Kuste2803, B₁₂ 依存性ラジカル SMA 酵素に注目した。

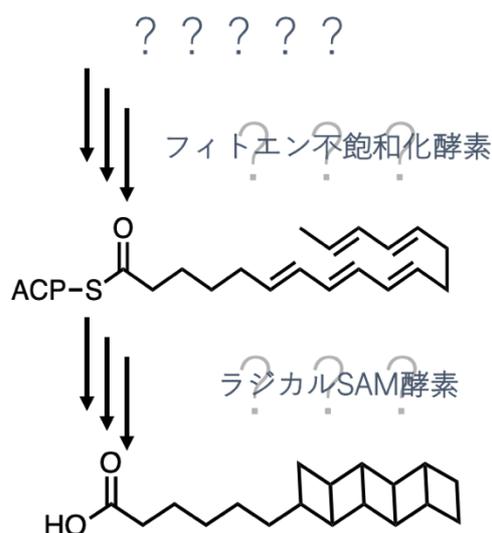


図 11 提案されているラダラン脂質合成経路

また、これまでにラダラン脂質推定合成遺伝子クラスター中の遺伝子のいくつかを組み合わせて大腸菌による異種発現系の構築が行われた⁴⁸。各組み合わせにおける脂肪酸分析などが行われたが、いずれにおいてもラダラン脂質や多価不飽和脂肪酸、または他の新規化合物の生産は確認できなかったことが報告されている。加えて、コードされた酵素の潜在的な脂肪酸修飾活性を調べるため、ラダラン脂質前駆体の生合成に関与するとされている推定不飽和化酵素の活性測定が行われた。*Mthyloglobulus morosus* KoM1 のリコピン形成不飽和化酵素 CrtI と kuste3336, kuste360 がそれぞれ 31 %, 33 %の相同性を示したため、これらの遺伝子産物が不飽和化酵素活性を示し、リコピン形成能を有しているか試験された。しかし、これらの遺伝子が導入された各菌株における *in vivo* の抽出物の分析結果からはリコピンが生成されていない結果のみが得られた。これらの結果から、大腸菌はアナモックス菌の遺伝子発現には適した宿主ではないと言及されていた。そこで、我々はアナモックス菌と同属に類する *Planctomyces limnophilus* に注目した。この菌は全ゲノムが解読されており、GFP などのモデルタンパク質の発現系がすでに構築されている⁵¹⁻⁵⁴。大腸菌などと同じ原核生物でありながら高度に分画された細胞内環境を持つ *P. limnophilus* であればアナモックス菌由来タンパク質の異種発現が可能になりかもしれない。これらの報告に

基づき我々は *P. limnophilus* を用いたアナモックス菌由来タンパク質の異種発現系の構築も試みた。

8. 本研究の目的

本研究では微生物が作り出す多様な有用化合物の生合成経路における、化合物の骨格構築に参与する鍵酵素や最終反応を担う鍵酵素について、X線結晶構造解析を主な手法としてタンパク質の構造と機能の関わりを明らかにすることを目的としている。構造機能相関の解明によってタンパク質が働く仕組みを明らかにし、創薬や新たな生理活性を持つ化合物の創生に知見を提供する。また、構造から進化の履歴をたどる試みにも挑戦する。構造の保存性からある種の反応にどのような部位が重要なのか、どの部分が変化することで機能分化が起きたのかについて明らかにしたい。

第1章では芳香族基質 PTase IptA の結晶構造解析およびその構造から明らかになってきた基質寛容性についてまとめた。第二章では新しいサブクラスを形成する新規カルバゾールプレニル基転移酵素、CqsB4, LvqB4 について、酵素-基質複合体の結晶構造を解明し、新たな芳香族プレニル基転移反応のメカニズムを提案した。第3章、第4章ではアナモックス菌のラダラン脂質生合成経路の全容解明を目的として、生合成推定鍵酵素であるラジカル SAM 酵素の結晶構造解明に向けたこれまでの取り組み、大腸菌での発現が困難なタンパク質の異種発現系構築に向けた *P. limnophilus* を用いた遺伝学的ツール開発の実験基盤構築についてまとめた。

1章 芳香族プレニル基転移酵素 IptA の結晶構造解析

緒言

1-1. IptA について

細菌や真菌由来の ABBA 型およびジメチルアリルトリプトファンシンターゼ (DMATS) 型酵素を含む芳香族基質 PTase は天然物の多様性と生理活性の向上などに寄与していることからその生物学的特徴づけなどの研究が盛んに行われている^{100,101}。

プレニル化インドールアルカロイドは、幅広い構造多様性、および生理活性を有している。DMATS 型芳香族基質 PTase は近年発見されたスーパーファミリーを持つ酵素群で、その大部分が進化的に関連していて共通したタンパク質フォールドを持つ。中でも人類の歴史の中で最も重要な天然の医薬品および毒素の一つである麦角アルカロイドの生合成は L-トリプトファンの 4 位のプレニル化を初発反応とする(図 12)。

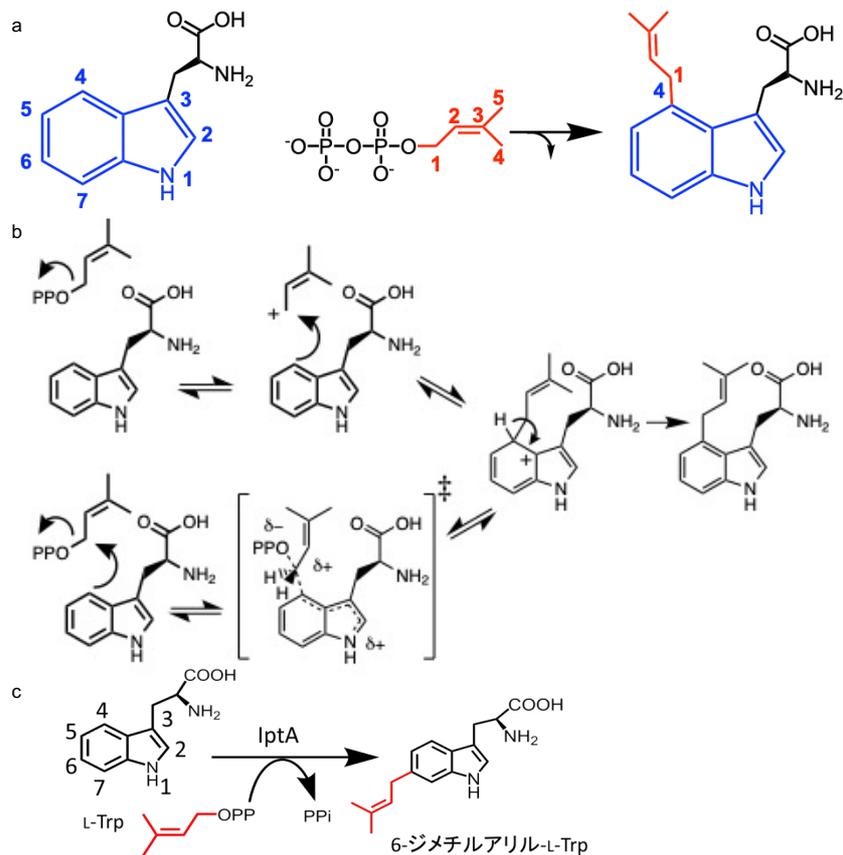


図 12 L-Trp 4 位のプレニル化反応および提案されている

プレニル化メカニズムと IptA のプレニル化反応

(a). 4-DMATS のプレニル化反応 (b). 現在提案されている 2 つの反応メカニズム。カルボカチオンの形成と求電子的なプレニル基の転移が段階的である可能性と、協奏的である可能性の 2 通りの反応機構が提唱されている。(c). IptA の C-6 プレニル化反応

構造的に複雑なアルカロイドはインドール環のプレニル化が初期に起こることが多いことが報告されている³⁰。これまでに同定されたインドール PTase では環の全ての位置をそれぞれプレニル化する酵素が報告されている^{31,32,102-111}。これらの酵素のほとんどはジメチルアリルニリン酸 (DMAPP) を基質として利用し、他の PTase とは異なり、金属に非依存的な反応メカニズムを有している。また、基質寛容性があることも特徴的である。これらの酵素に一般的な反応メカニズムはフリーデルクラフツアルキル化反応である。はじめに DMAPP のイオン化によるジメチルアリルカチオン/ピロリン酸イオンペアの形成である。次にインドール環上のプレニル化を受ける位置が求核攻撃により転移反応が起きる¹¹²。有機合成におけるフリーデルクラフツアルキル化反応はハロゲン化アルキルを用いて AlCl_3 のような触媒を用いることでカルボカチオン形成のエネルギー障壁を下げている。DMATS 型酵素ではこれらが基質と近接するアミノ酸残基によって行われている。ニリン酸基の負電荷は正電荷を持つアミノ酸残基によってニュートラルになり、トリプトファンと反対に位置するチロシン残基の側鎖が寄与する芳香族環とのカチオン- π 相互作用によって強力に安定化される¹¹³。また、インドール環の安定化にはヘテロ原子と相互作用して水素結合を作る保存されたグルタミン酸残基のカルボキシ基が求電子置換に対する反応性に寄与している。この水素結合は反応中の σ -錯体の正電荷の中立に寄与すると考えられている¹¹³。しかし、このカルボカチオンの形成と求電子的なプレニル基の転移反応が段階的である可能性と協奏的である可能性が 2 通り提唱されており、これが実験的に証明された報告はいまだにない。反応メカニズムの決定については確証がないものの、数多くのインドール PTase の X 線結晶構造解析が行われている。それらの多くがプレニル基を受容するインドール化合物やプレニル基供与体およびそのアナログなどが結合した結晶構造も報告されている。これらの結晶構造に基づくと、インドール PTase と基質分子との間には空間的な余裕が小さく、基質分子の結合様式が厳密に制御されることで、厳密な位置、立体選択的なプレニル化が達成されると考えられる。これらの可溶性インドール PTase には、ABBA フォールドと呼ばれる 3 次構造が高度に保存されている¹⁰¹。これは、 $\alpha\beta\beta\alpha$ の順序で α -ヘリックスと β -ストランドが連なっており、分子内部は 10 本の β -ストランドから構成される逆平行 β シートでバレル構造が形成され、その周囲は α ヘリックスで囲まれており、バレル内部に活性部位が存在する。代表的な α/β 型構造のひとつに 8 本ずつの β -ストランドと α -ヘリックスからなる TIM バレル構造がよく知られており、この構造は ABBA PTase フォールドと同様に分子の内部に β -バレル構造を持っている。しかし、TIM バレル構造では β -ストランドと α ヘリックスの連なりが 8 回繰り返され、分子内部は 8 本の β -ストランドから構

成される平行 β -シートでバレル構造が作られ、活性部位はバレル内部ではなく、 α -ヘリックスのアミノ末端と β -ストランドのカルボキシル末端をつなぐ8本のループによってできるくぼみの底に存在する場合が多い(図 13)¹¹⁴。

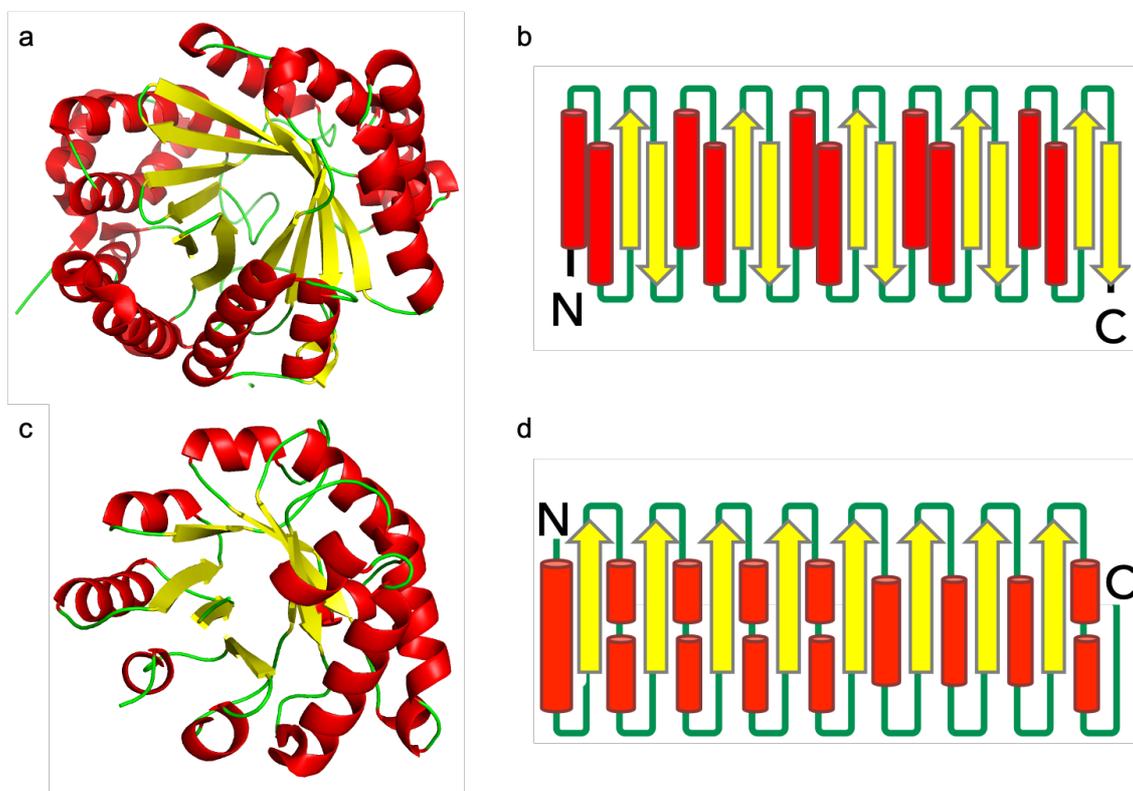


図 13 ABBA フォールドと TIM バレルフォールド

(a). 4-DMATS の FgaPT2 の全体構造。 α -ヘリックスを赤で β -ストランドを黄色で、二次

構造を持たないループ部分を緑色で示している。(b). ABBA フォールドの立体構造を平面で表した図 (c). トリオースリン酸イソメラーゼの全体構造。(d). TIM バレルフォールドの立体構造を平面で表した図

これらのインドール PTase の中でも序論で述べた *Streptomyces* sp. SN-593 株由来の IptA と呼ばれる本研究対象のタンパク質はこれまでに研究されていた酵素と相同性を示さず、系統発生分析からも細菌の芳香族基質 PTase と真菌のインドール PTase の中間の新たな分岐に位置することから新規インドール PTase としてその生化学的特徴づけなどが行われた。その酵素活性の特徴づけの結果、L-Trp の C-6 位に DMAPP のプレニル基を位置特異的に転移する反応を触媒する(図 12)。さらにプレニルドナーに対する寛容性は厳密であり、DMAPP 以外のプレニル基、炭素数 10 の GPP や 15 の FPP などは転移反応を触媒し

ないことが明らかとなっている³²。しかし驚くべきことにプレニルアクセプターへの寛容性は幅広いことも明らかとなった。また同様に L-トリプトファンの C6 位にプレニル基を転移する酵素として PriB なども報告されている。どちらの酵素も基質寛容性があり、C6 位にメチル基が付加された 6-methyl-L-Trp をプレニルアクセプターとした場合、C7 位を位置選択的にプレニル化することができる。さらに PriB は多くのプレニルアクセプターの寛容性を有しており、プレニルドナーも GPP や FPP を用いることができることが報告されている¹¹⁴。また PriB はその結晶構造がすでに報告されており、プレニルドナーアナログ/プレニルアクセプター/PriB の三者複合体構造が決定されている。この構造情報から C6 位のプレニル化メカニズムが明らかにされたが、位置選択的なプレニル化機構や、構造に基づく変異体の設計および機能改変などに関する報告はなかった。また、IptA は PriB よりも基質寛容性は低いものの、4-methyl-DL-Trp や 5-hydroxy-L-Trp, 5-methoxy-L-Trp の C6 位に位置選択的にプレニル基を転移できる。主鎖に置換基が修飾された *N*-methyl-L-Trp (L-Abrine) や α -methyl-DL-Trp などの基質も認識する。しかし *N*-Acetyl-L-Trp は認識できない。IptA の構造に基づく変異導入によりこれを認識できるような変異体を設計することができれば機能改変や新規化合物創生に新たな知見を提供できると期待されている。さらに PriB でも報告のない L-Trp の N 末端に Ala や Gly が結合したジペプチドなどにプレニル基を付加できる実験室レベルでの定方向進化を促した新規芳香族基質 PTase の作製が可能かもしれない。そこで本研究では IptA による新規化合物や新規生理活性物質やその前駆体の創生、およびそれらを合成するインドール PTase の作製を目指し、プレニル基受容体 (Trp やその誘導体) およびプレニル基供与体 DMAPP のアナログ (Dimethylallyl *S*-Thiolodiphosphate (DMSPP)) 結合型 IptA の結晶構造の決定や、これに基づいた L-Trp やその類縁体のプレニル化機構、およびプレニル化位置の選択メカニズムの解明を行った。また、決定した結晶構造を基にプレニル基供与体の選択性の拡張やペプチドのプレニル化活性の評価を行った。

結果・考察

1-2. 基質非結合型 IptA の結晶構造

基質非結合型 dN19 IptA は 10 本の逆平行 β -ストランドで構成される構造の外部を 10 本の α -ヘリックスが囲む一般的な ABBA 型の構造をとっており、バレルの中心がトンネルのようになっていた(図 14)。

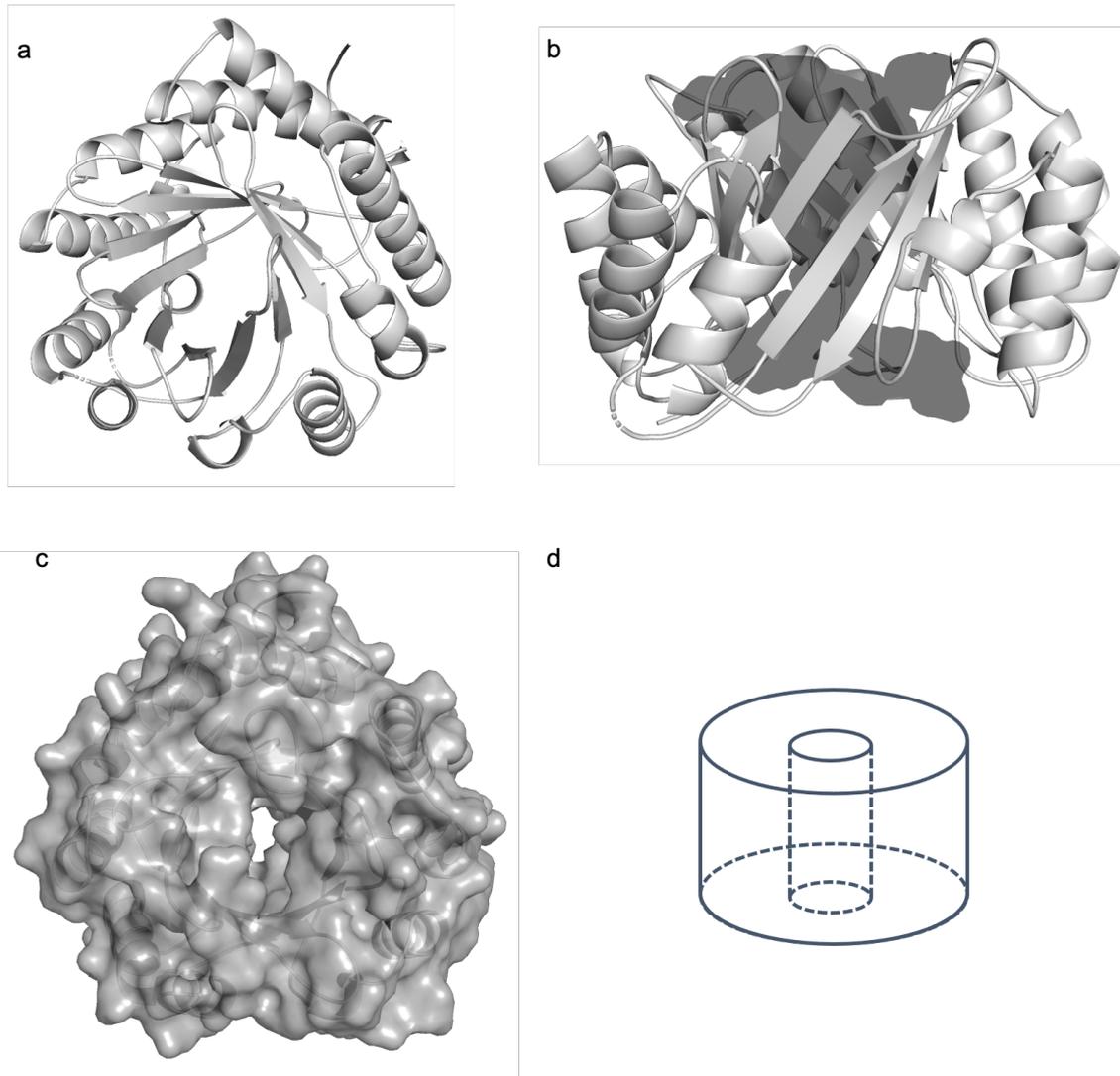


図 14 dN19 IptA の全体構造

(a). 基質非結合型 dN19 IptA の全体構造 (b). 90° 回転させて活性部位を surface 表示したもの。バレルの中心部がポケットになっている様子が観察された。(c). 全体を surface 表示して上から見た図 ポケットが貫通している様子が確認できた。(d). dN19 IptA のデフォルメ図

1-3. リガンド結合型 IptA の結晶構造

IptA がプレニル化活性を有するプレニルアクセプターおよびその類縁体化合物について、ソーキング法または共結晶化法を用いて酵素-基質三者複合体構造を解明した。用いたリガンドは L-Trp, 5-methyl-L-Trp, 6-methyl-L-Trp, L-Abrine である(図 15)。

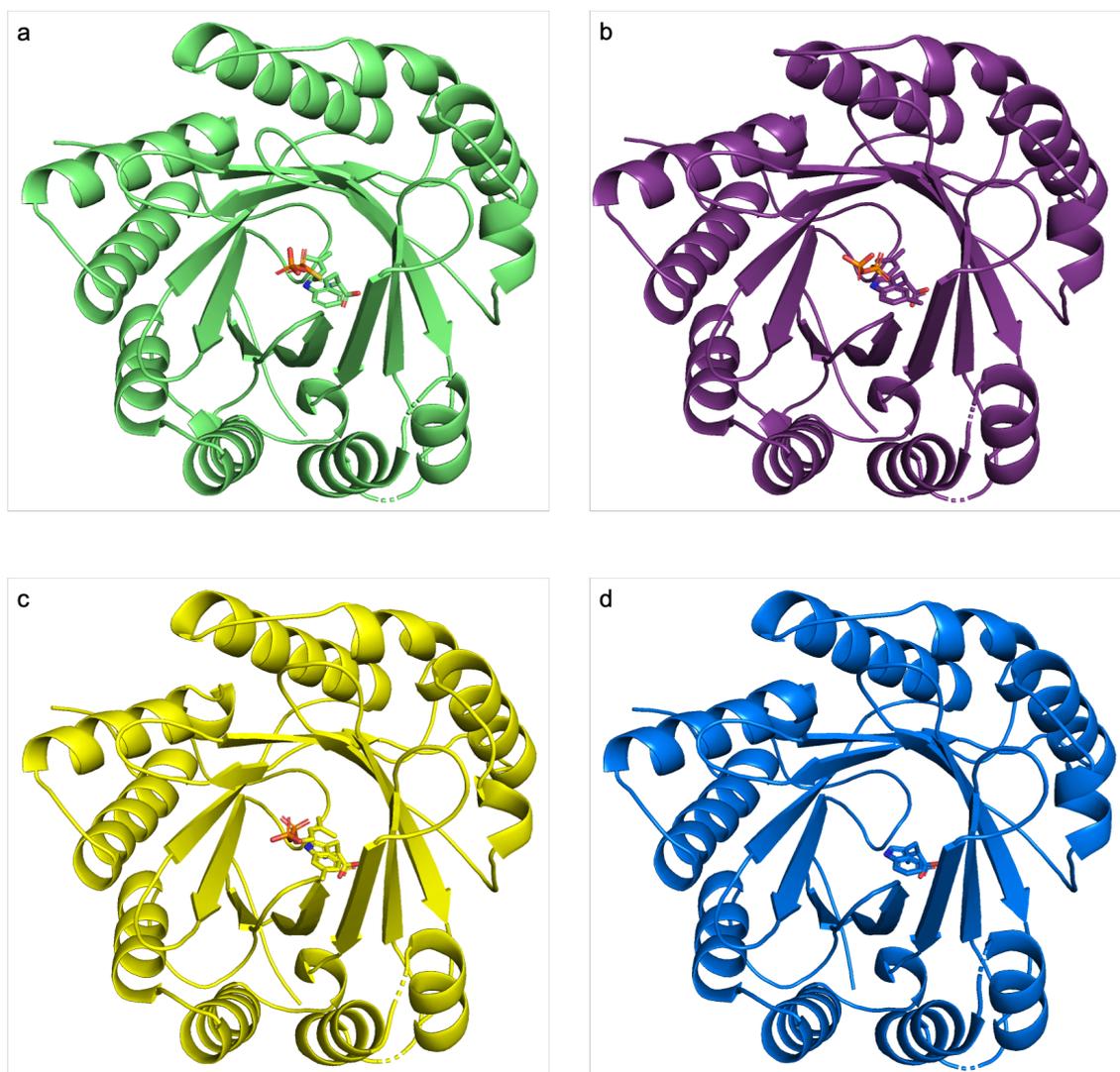


図 15 リガンド結合型 dN19 IptA の結晶構造

(a). L-Trp, DMSPP 結合型 dN19 IptA の結晶構造 (グリーン) (b). 5-methyl-L-Trp, DMSPP 結合型 dN19 IptA の結晶構造 (パープル) (c). 6-methyl-L-Trp, DMSPP 結合型 dN19 IptA の結晶構造 (イエロー) (d). L-Abrine, DMSPP 結合型 dN19 IptA の結晶構造 (ブルー)

L-Trp, DMSPP 結合型 IptA の全体構造は基質非結合型 IptA と一致し、基質の結合による誘導適合が確認できなかった。また基質は一般的なインドール PTase と同様にバレル内

部に内包され、プレニルアクセプター/プレニルドナーの位置関係はプレニルアクセプターの芳香環の直上にプレニルドナーが配置される既知の芳香族 PTase の基質結合様式と同様

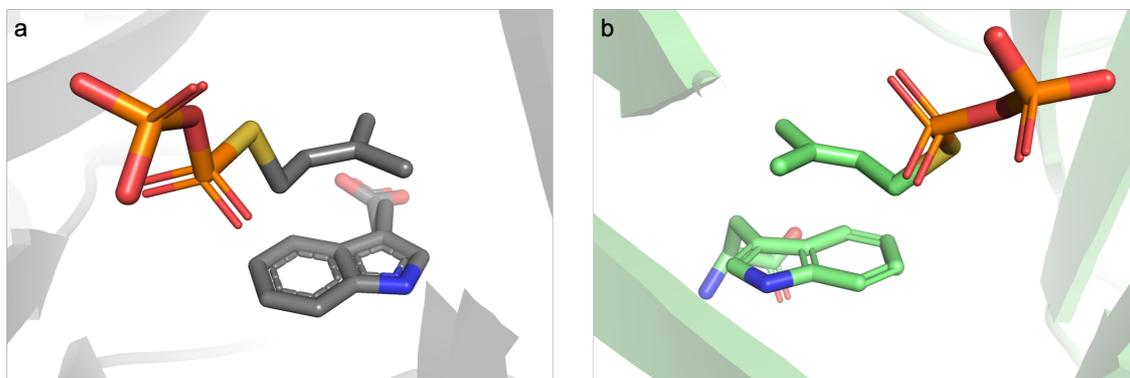


図 16 FgaPT2 および IptA の基質結合様式

(a). FgaPT2 の L-Trp, DMSPP 結合様式。芳香環の直上にプレニルドナーが位置している。(b). IptA の L-Trp, DMSPP 結合様式。FgaPT2 と同様な結合様式が確認できる。なものであった(図 16)。

L-Trp, DMSPP は基質結合ポケットに対して空隙なく結合しており、ポケットを構成する多くのアミノ酸残基と相互作用している様子が確認できた(図 17)。

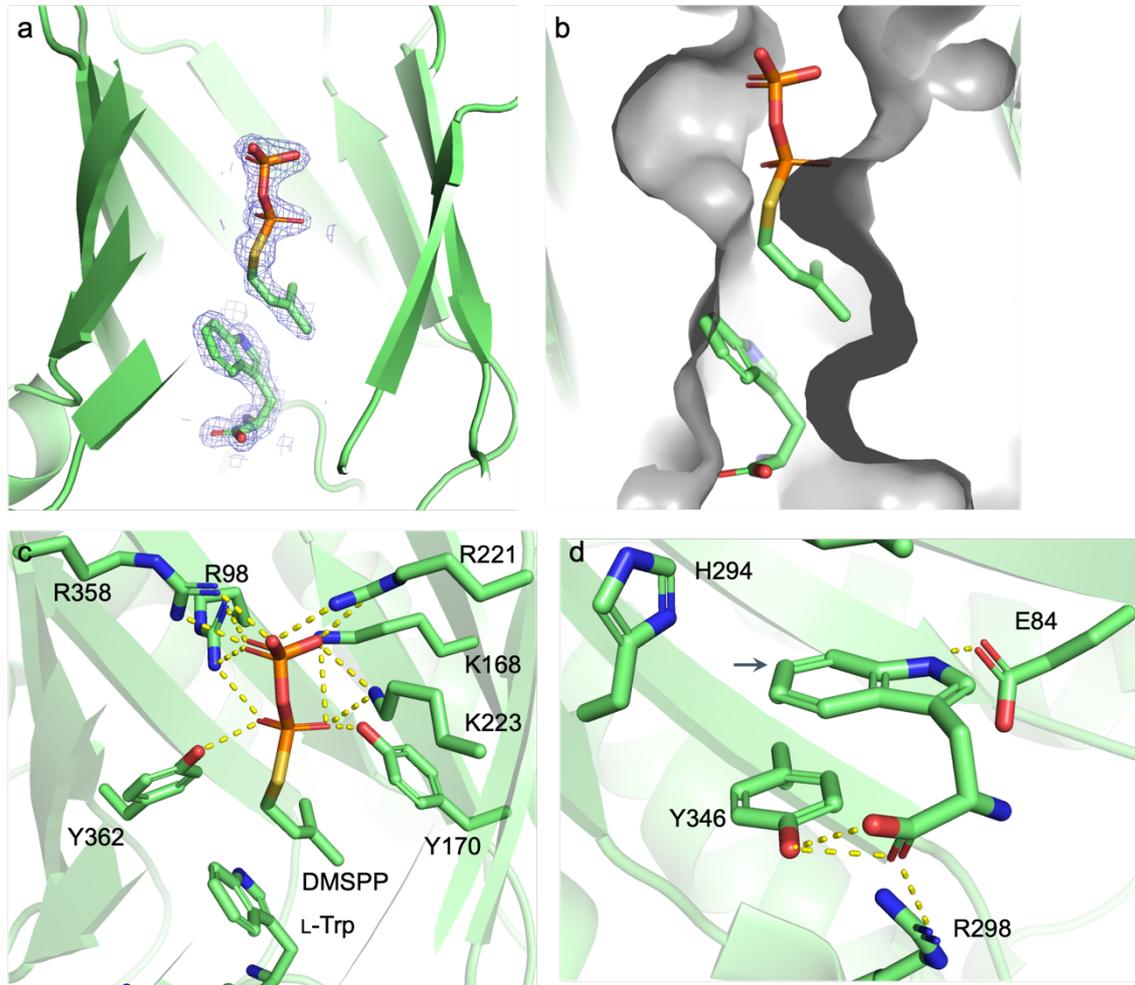


図 17 dN19 IptA の L-Trp, DMSPP の相互作用

(a). dN19IptA に結合した L-Trp, DMSPP の Simulated Annealing Omit Map (3.0σ)
 (b). 活性部位をグレーで示した。基質が結合している周辺は空隙がなく密に結合している様子が観察できる。(c). DMSPP のリン酸基と周辺のアミノ酸の相互作用。主に塩基性の側鎖によって安定化されている様子が確認できる。(d). L-Trp と周辺のアミノ酸側鎖との相互作用。Y346 は L-Trp のカルボキシ基とも相互作用している。

DMAPP のリン酸基は周辺の極性残基である R98, K168, Y170, R221, K223, R358, Y362 などと相互作用しており、イソプレン側鎖は L-Trp と Y170 の芳香環に挟まれていた。これらの極性残基の相互作用はプニルドナーの酵素への親和性の向上に寄与していると考えられている。Y170 の側鎖と平行になるように DMSPP が結合していることから、これらの間

には π - π スタッキング相互作用が形成されることが示唆され、アリルカルボカチオンの安定化にも寄与していることが提案されている。L-Trp は周辺の E84, R298, Y346 と相互作用を形成していた。Y346 はインドール環の直下に存在することから π - π スタッキング相互作用が形成していると考えられる。またインドール環のプレニル化を受ける C6 位近傍には H294 が存在しており、C-C 結合が形成されたのちに脱プロトン化を担う塩基触媒としての役割が提案されている。E84 は L-Trp のヘテロ原子と静電的な相互作用が見られるため、既知の芳香族 PTase でも報告があるように水素結合の形成によるプレニル化 σ -中間体の正電荷を減らし安定化する役割を担っていると考えられる。

IptA の C6 位への位置選択的プレニル化機構解明のために同様の基質を用いつつ C4 位をプレニル化する FgaPT2 と構造を比較した。全体構造は RMSD 2.19 Å で非常に類似していた。どちらのインドール PTase でもプレニルドナーがプレニルアクセプターのインドール環に平行して位置する結合様式は変わらないが、FgaPT2 ではどちらの基質も 90° 傾いた状態で結合していた。リン酸基周辺の極性残基もほとんどよく重なる位置に同様なアミノ酸が存在しており、Y413 によるジメチルアリル基の π - π スタッキング相互作用も確認できる。L-Trp への相互作用に少し違いが存在する。Y191 と R244 の側鎖および I80 と L81 の主鎖への水素結合を介して L-Trp が配置されることが考えられている。またジメチルアリルカチオンが生成される DMAPP の C1 位炭素からプレニル化を受ける L-Trp の C4 位炭素への距離が 3.8 Å であり、位置選択的な反応を引き起こすのに十分近い距離である。また、IptA においては H294 がその役割を担うことが空いてされている脱プロトン化を行う塩基触媒は FgaPT2 では K174 であった。C4 炭素原子と K174 の距離は 3.2 Å で、隣の C5 炭素は 3.5 Å の距離にある。このため、C4 が選択的にプレニル化を受けるのだと考えられる。プレニル化- σ 中間体の安定化に寄与すると考えられる Glu 残基は IptA と同様な位置に存在している。そのため IptA はこれまでに報告のある PTase と類似の反応様式でプレニル基の転移を触媒するが、その位置選択性は脱プロトン化に寄与する塩基性残基が異なり、これがそれぞれのプレニル基が転移される炭素原子の周辺に存在することが重要であると考えられる。さらに FgaPT2 の変異体解析では K174Q で約 60 %の活性の減少が確認されている。これはグルタミン側鎖が水素結合は形成できるものの、生理的条件下ではイオン化できないため基質からプロトンを引き抜くことができなくなったためだと考えられている。リジンと比較して側鎖が短いため、このできた空隙に水分子が入り込み、基質のカ

ルボキシ基による分極を受けて σ 中間体からプロトンを享受できるようになっていることが活性に残っている理由だと推定されている(図 18)。

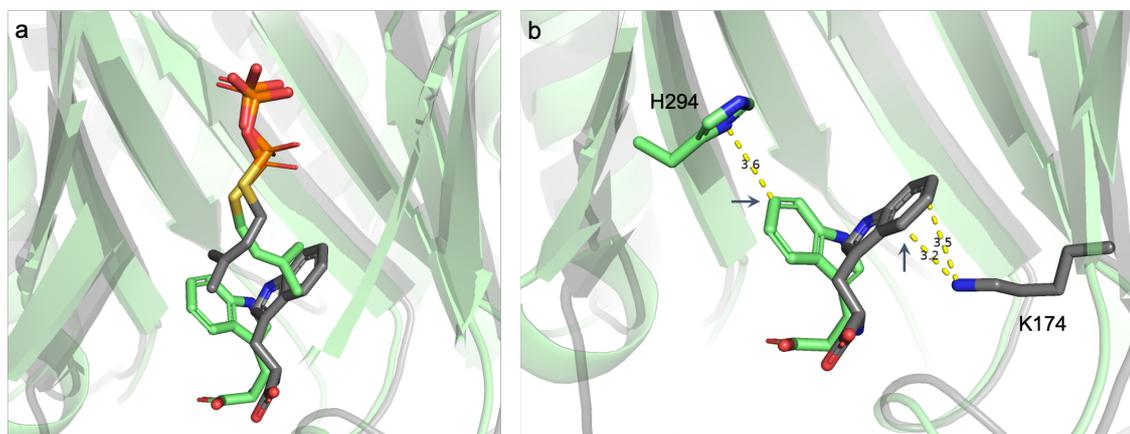


図 18 IptA と FgaPT2 の基質結合様式の比較

(a). IptA (グリーン), FgaPT2 (グレー) リン酸基はよく重なる位置に存在しているが Trp に合わせてイソプレン側鎖の向きが変わっている。(b). 脱プロトン化に寄与するアミノ酸残基の比較 矢印はプレニル化を受ける位置を示す。

また、Sheirf らは 2017 年に同じ C6 位をプレニル化する PriB の L-Trp, DMSPP 結合型構造を報告している(図 19)。

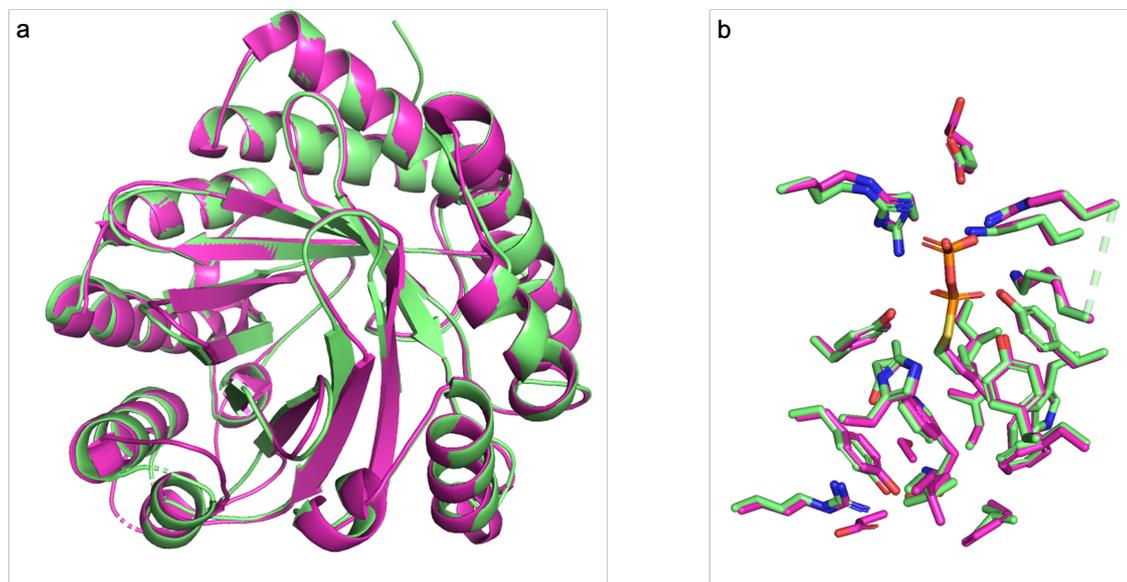


図 19 dN19 IptA と PriB の構造アライメント

(a.) dN19 IptA (グリーン) と PriB (マゼンタ) の全体構造のアライメント。RMSD 0.63 Å でほとんど一致する。(b). 基質およびその周辺のアミノ酸残基。向きも位置もほぼ一致していることが観察できる。

IptA との一次構造の相同性は 67 % であり、全体構造の RMSD は 0.630 Å でほとんど一致している。このことから、PriB がプレニルドナーとして GPP を用いることが可能な理由を結晶構造のみから説明するのは困難なことが明らかとなった。

5-methyl-L-Trp, DMSPP 結合型 IptA の構造は、全体構造、基質結合部位共に基質非結合型 IptA とおおよそ一致した(図 20)。

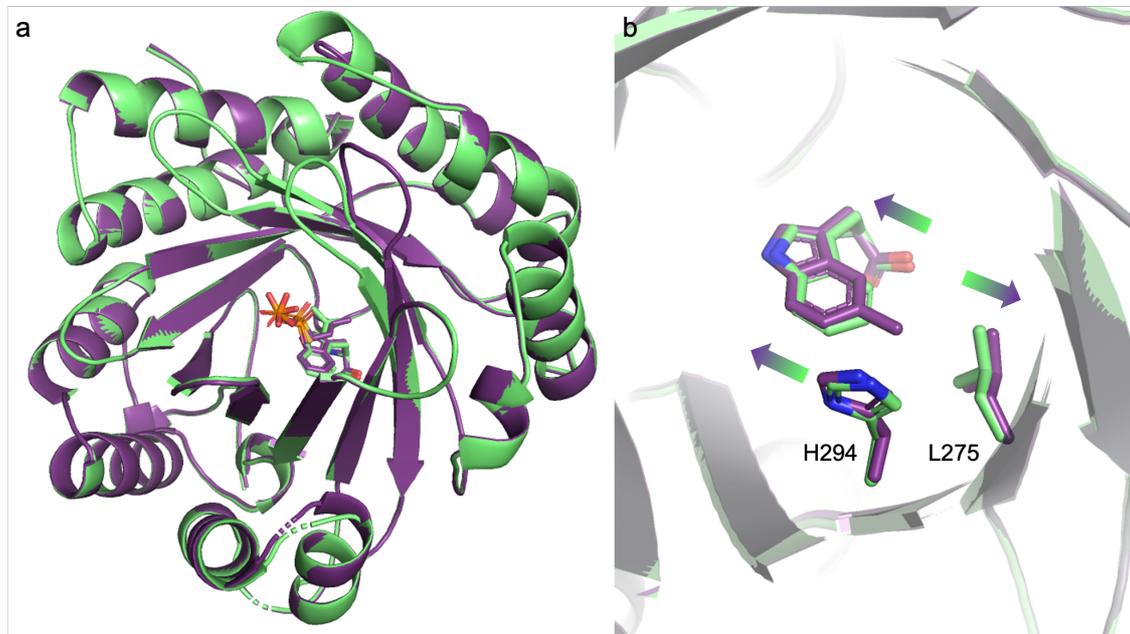


図 20 L-Trp, DMSPP 結合型 dN19 IptA の結晶構造 5-methyl-L-Trp, DMSPP 結合型 dN19 IptA の結晶構造の構造アライメントおよび基質結合様式の比較

(a).L-Trp, DMSPP 結合型 dN19 IptA の結晶構造 (グリーン), 5-methyl-L-Trp, DMSPP 結合型 dN19 IptA の結晶構造 (パープル) で表している。(b).5 位にメチル基が付加されていることでプレニルアクセプター、L275, H294 が少しずつ動いている様子が確認できる。

基質のインドール環 C5 位に付加されているメチル基は L275 の側鎖を向いており、これによって L275 の側鎖が外側に押されるように 0.5 Å ほどシフトした。これは主鎖および側鎖の結合角や結合長の観点から見ても無理のない範囲のシフトであるため、大きく歪んだ構造ではない。またメチル基が存在することによって若干基質ポケットが広げられたことによる側鎖の動きは H294 にも見られた。これも 0.4 Å ほどの動きであったのでひずみの大きい構造ではないと考えられる。一方で、プレニルドナーのアリルカチオンを生成する C1 位とプレニル化を受ける C4 位の距離が 3.7 Å から 3.4 Å に近づいていた。IptA の 5-

methyl-L-Trp に対するプレニル化の比活性は 186 %であり、結晶構造からリーズナブルに解釈できる(図 21)。

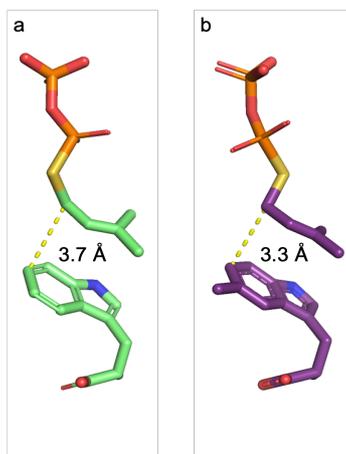


図 21 L-Trp, DMSPP の距離と 5-methyl-L-Trp, DMSPP の距離

(a). L-Trp, DMSPP との距離 (グリーン) (b). 5-methyl-L-Trp, DMSPP の距離 (パープル)

6-methyl-L-Trp, DMSPP 結合型 IptA の構造もこれまでと同様に全体構造および基質結合部位周辺もよく重なる構造をとっていた。基質のメチル基が H294 を向いており、これにより H294 が押し広げられ、側鎖がフリップして配置されていた。またプレニルドナーの C1 位はプレニル化される C7 位から 4.3 Åとこれまでと比較して少し遠くなる。また、H294 は C-C 結合形成後の脱プロトン化を担うと推定されているアミノ酸残基なので、これが押されるようにメチル基が存在して C7 位から遠くなるように配置されていることで非活性が極めて低くなっているのだと考えられる(図 22)。

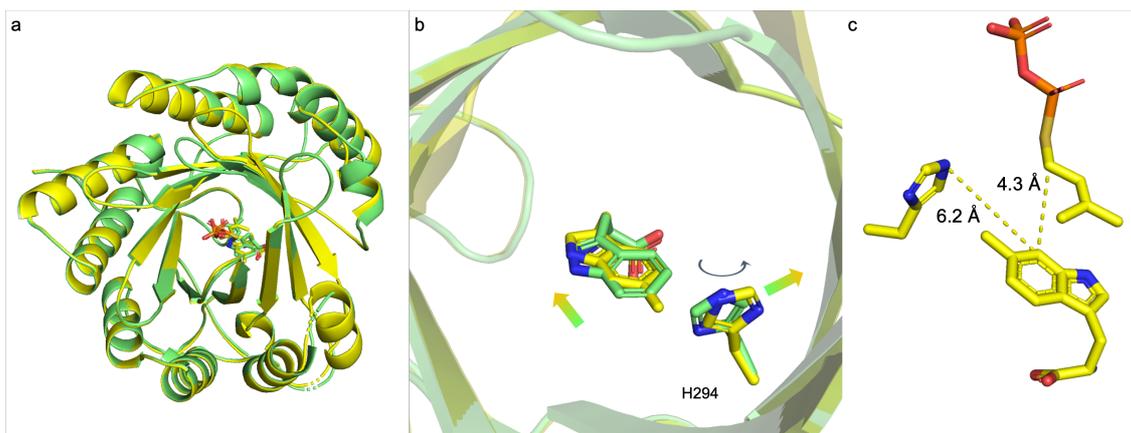


図 22 L-Trp, DMSPP 結合型 dN19 IptA の結晶構造 6-methyl-L-Trp, DMSPP 結合型 dN19 IptA の結晶構造の構造アライメントおよび基質結合様式の比較

(a). L-Trp, DMSPP 結合型 dN19 IptA の結晶構造 (グリーン) 6-methyl-L-Trp, DMSPP 結合型 dN19 IptA の結晶構造 (イエロー) の構造アライメント (b). L-Trp 結合様式の比較。配置が少し変化し H294 がフリップしている様子が確認できた。(c). プレニル化反応を起こす炭素の位置がこれまでより少し遠くなる様子が確認できた。また脱プロトン化に寄与する H294 も遠い。

L-Abrine, DMSPP 結合型 IptA について、構造解析はできているものの、DMSPP の占有率が良くなかったためか、電子密度に対してプレニルドナーをフィットさせることができなかった。プレニル側鎖らしき電子密度が観察できるものの、リン酸基部分を割り当てることが困難であった。L-Abrine 自体は L-Trp と非常によく重なる位置に存在していることが構造アライメントから明らかとなったので、ドッキングシミュレーションによってそのプレニルドナー結合様式を予測した。その結果、これまでの L-Trp 誘導体+DMSPP 結合型 IptA の構造におけるプレニルドナーと結合様式とほとんど一致するポーズが得られた(図 23)。

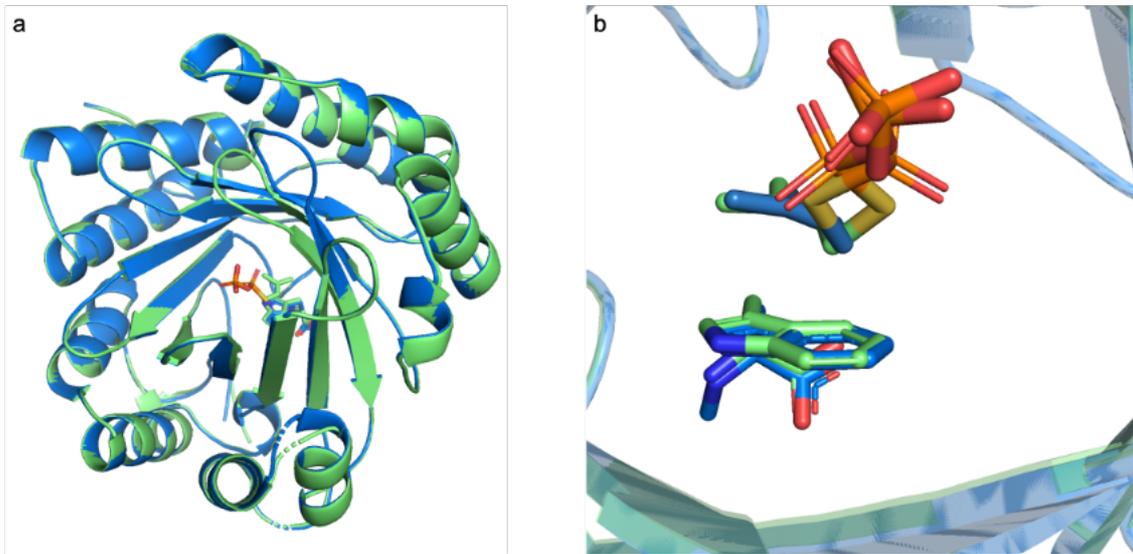


図 23 L-Trp, DMSPP 結合型 dN19 IptA の結晶構造 L-Abrine 結合型 dN19 IptA の結晶構造の構造アライメントおよび DMSPP のドッキングポーズ

(a). L-Trp, DMSPP 結合型 dN19 IptA の結晶構造 (グリーン), L-Abrine 結合型 dN19 IptA の結晶構造 (ブルー) の構造アライメント (b). ドッキングシミュレーションによって提案された DMSPP の結合様式. L-Trp, DMSPP 結合型とよく似た配向で結合するポーズがられている。

しかしこのポーズからのみでは L-Trp と比べてプレニル化活性が低い理由が説明できない。おそらく α アミノ基にメチル基が付加されていることによって非常にタイトな基質ポケットへのアクセスが悪くなっていることが原因だと考えられる。また、L-Abrine 結合型構造の解明によって L-Trp の C_{α} 炭素側は溶媒表面に露出していることと少しの空隙があることがわかったので、L-Trp 含有ペプチドなどのプレニル化活性を変異導入によって付加できるのではないかと提案された。そこで実際に WG, WA, WGG, WGGG などについてプレニル化活性の評価を行ったところ、L-Trp 含有ペプチドについても IptA はプレニル化を行うことが示された(図 43)。

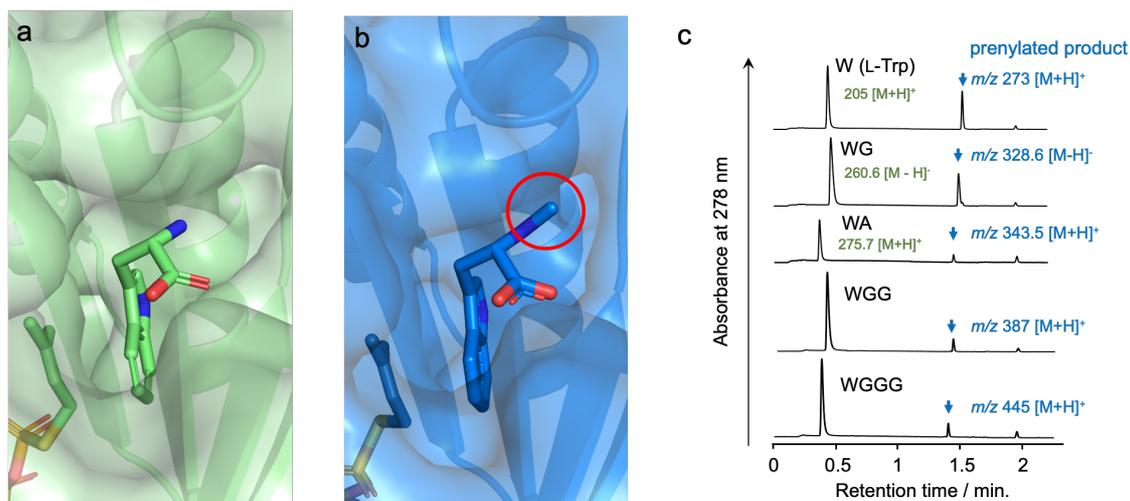


図 43 L-Trp, L-Abrine 周辺の基質ポケットとジペプチドの活性測定結果

(a-b). L-Trp, L-Abrine どちらも C α 側に空隙がある様子が確認できる。(c). 各ジペプチドを用いた活性測定の結果。N 末端に Trp があるペプチドであればプレニル化活性を持つことが示された。

さらにこれらの構造から基質結合部位への導入によるプレニルドナーの寛容性を広げることができるのではないかと考えた。IptA の非常にタイトな基質結合ポケットのプレニルドナーのイソペン側鎖末端は比較的疎水性の嵩高いアミノ酸に囲まれている。中でも W154 は基質ポケットの底のような役割を果たしているため W154A 変異体などでは GPP を受容できるようになるのではないかと考えた。実際、活性は野生型と比較して低いものの、GPP や FPP などのプレニル化活性を確認することができた(図 44)。

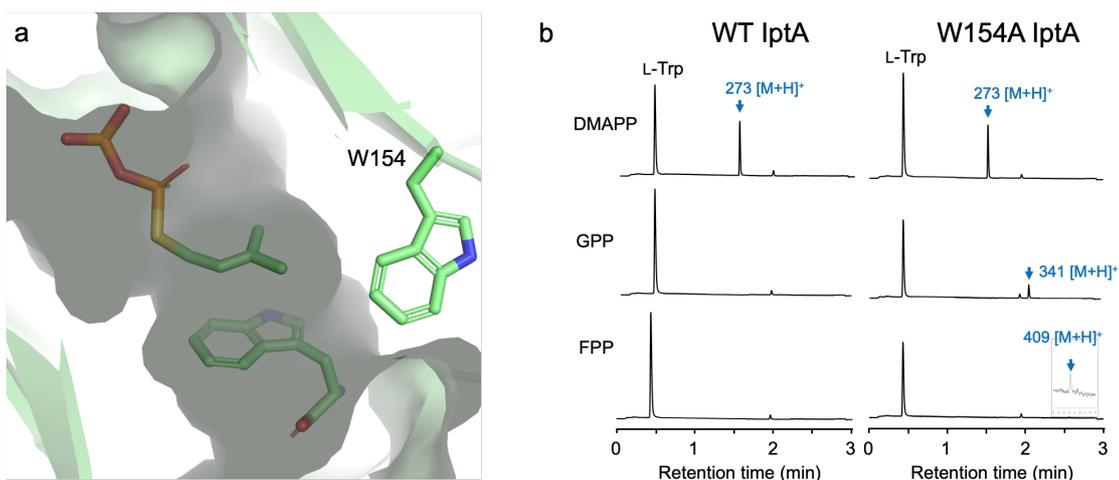


図 44 W154A 変異体による活性部位拡大の提案と変異体の活性測定結果

(a). プレニル側鎖の末端に存在する W154 を嵩の低いアミノ酸に置換すると活性部位が拡大する可能性がある。(b). W154A ではわずかながら GPP, FPP も基質として反応する。

リガンド結合型 IptA の結晶構造解析によって IptA の基質認識メカニズムなどを詳細に明らかにすることができた。驚くべきことに L-Trp 誘導体へのプレニル化位置が変化するものの、その基質結合様式はほとんど変わらないことが明らかとなった。プレニルドナーはリン酸基周辺の極性アミノ酸残基によって厳密に配置され、プレニルドナーはインドール環に対する Y346 の π - π スタッキング相互作用およびカルボキシ基と R298 の塩橋によって配置されるのだと考えられる。IptA の結晶構造に基づく変異導入などによって新しいプレニル化ペプチドやインドールアルカロイドを生産への知見が提供できた。

実験手法

1-4. IptA の大量発現及び精製

IptA の N 末端から 19 残基を欠損した遺伝子を pET-28b(+) (Merck, Kenilworth, NJ, USA) に組み込んだ発現ベクター pET28b(+) -dN19IptA を作製した。これを BL21 Star(DE3) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に導入し、25 μ g/mL カナマイシン (Kana) を含む 37°C の Lysogeny Broth (LB) で一晩前培養した。これを 25 μ g/mL Kana を含む 100 mL の Terrific Broth (TB) に植菌し、28°C で培養、OD600 が 0.5 となった時点で 0.5 mM IPTG を添加することで発現を誘導、16 時間培養することで dN19 IptA を大量発現した大腸菌を得た。これを 5,000 rpm, 15 分, 4°C で遠心分離し、沈殿画分をペレットとして回収した。得られた菌体を溶菌バッファー (50 mM Tris-HCl pH7.5, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazole, 20% (v/v) Glycerol, 0.5 mg/mL Lysozyme, 0.1 mg/mL DNase) で懸濁し、これを超音波処理することで無細胞抽出物を調製した。

続いてこれを 18,000 rpm, 40 分, 4°C で遠心分離することで、その上清画分を可溶性画分として回収し、カラムに充填した Ni-NTA Agarose (Qiagen, Valencia, CA, USA) にアプライした。Ni-NTA Agarose に、0.2% (v/v) Tween 20 を含む buffer A (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 5 mM イミダゾール, 20% (v/v) グリセロール) をアプライすることで、非特異的に吸着した夾雑蛋白質を洗浄したのち、40 mM イミダゾールを含む buffer A を用いて dN19IptA を溶出した。これにより得られた溶液中の dN19IptA 1 mg に対して 0.5 Unit の割合で Thrombin を添加し、一晩静置することで dN19 IptA の N 末端に付加した His-tag を切除した。透析により 50 mM Tris-HCl pH7.5, 20% (v/v) Glycerol へと置換し、再び Ni-NTA agarose にアプライして得られた素通り画分を回収した。続いてこれを Benzamidine Sepharose 4 Fast Flow (high sub) (GE Healthcare) を用いてスロンピンを除去し、30 kDa cut-off Amicon Ultra-15 を用いて 1.2 mL まで濃縮した。最後にこれを HiLoad

16/600 Superdex 75 を用いてゲルろ過精製することで高純度かつ単分散な dN19 IptA を調製した。溶出した dN19 IptA を再度 30 kDa cut-off Amicon Ultra-15 で濃縮し、使用するまで -80 °C で保存した。

1-5. 基質非結合型 dN19 IptA の結晶化及び X 線結晶構造解析

dN19 IptA の結晶化は酵素溶液とリザーバー溶液を 1 μ L : 1 μ L で混合し、sitting drop 蒸気拡散法を用いて 4 °C で行なった。buffer A (50 mM Tris-HCl pH7.5, 20 % (v/v) Glycerol, 300 mM L-Asp, 2 mM DTT) で置換した IptA を 12 mg/mL に調製したものを結晶化試料として用いた。酵素溶液とリザーバー A (0.1 M HEPES pH7.0, 2.35 M 硫酸アンモニウム, 5 mM DTT) を混合することで dN19 IptA が結晶化した。

クライオプロテクタントバッファーへの置換は、4 段階のステップソーキング法を用いた。得られた結晶をまず、2.40 M 硫酸アンモニウム, 13% (v/v) Glycerol を含むクライオプロテクタントバッファー (100 mM HEPES pH 7.0, 5 mM DTT, 300 mM L-Asp) に瞬間的に浸漬した。続いて 2.45 M 硫酸アンモニウム, 15% (v/v) Glycerol を含むクライオプロテクタントバッファーに瞬間的に浸漬し、2.50 M 硫酸アンモニウム, 15% (v/v) Glycerol を含むバッファーに、2.55 M 硫酸アンモニウム, 20% (v/v) を含むクライオプロテクタントへと連続して瞬間的に浸漬し、これを -180 °C に冷却したクライオストリームで瞬間的に凍結した。これを用いて SPring-8 の BL32XU で X 線回折実験を行い、1.0000 Å の波長の X 線を 0.1 度の振動角に対して 0.10 秒ずつ照射して回折データを収集した。検出器は EIGER X 9M を用いた。回収したデータは XDS を用いて指数付けと積分を処理し、分子置換法により位相を決定することで結晶構造を決定した。分子置換法では Phaser MR を使い、PriB (PDB ID: 5INJ) の結晶構造をモデル分子とした。モデル構築と精密化には Phenix Refine と coot を使用した。

1-6. リガンド結合型 dN19 IptA の結晶化及び X 線結晶構造解析

L-Trp, DMSPP 結合型 dN19 IptA の結晶はソーキング法により作製した。基質非結合型 dN19 IptA の結晶が析出した結晶化ドロップに 3 μ L のソーキング溶液 (55 mM HEPES pH 7.5, 2.0 M 硫酸アンモニウム, 5% (v/v) Glycerol, 5 mM DTT, 2 mM L-Trp, 60 mM DMSPP) を添加し 6 時間静置することで、L-Trp, DMSPP 結合型 dN19 IptA の結晶を得た。クライオプロテクタントバッファーへの置換は基質非結合型 dN19 IptA の凍結と同様に、4 段階のステップソーキング法を用いた。

5-methyl-L-Trp, DMSPP 結合型 dN19 IptA の結晶は共結晶化法により得た。5-methyl-L-Trp を 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、結晶化試料 (12 mg/mL dN19IptA, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 20% (v/v) glycerol, 300 mM L-Asp, 2 mM DTT, 4.0 mM DMSPP) とリザーバー溶液 (100 mM HEPES pH 7.0, 2.35 M 硫酸アンモニウム, 5 mM DTT, 7.5 mM 5-methyl-L-Trp) を 1 μ L ずつ混合し結晶化ドロップを調製した。これにより析出した結晶は、クライオプロテクトントバッファーに浸漬した。5-methyl-L-Trp を含むクライオプロテクトントバッファーを用い、L-Trp, DMSPP 結合型 dN19IptA と同様の手法でクライオプロテクトントバッファーに浸漬した。

6-methyl-L-Trp, DMSPP 結合型 dN19 IptA、L-Abrine, DMSPP 結合型 dN19IptA の結晶は共結晶化法により得た。5-methyl-L-Trp, DMSPP 結合型 dN19 IptA の結晶作成と同様な手法でリガンドを 6-methyl-L-Trp に置換して結晶化した。凍結も同様である。

またそれぞれのリガンド結合型 dNIptA の解析は得られたデータを XDS を用いて指数付と積分処理を行い、基質非結合型 dN19IptA の結晶構造をモデル分子とした分子置換法により位相を決定することで結晶構造を決定した。モデル構築と精密化には Phenix Refine と coot を使用した。

回折実験についてはそれぞれ 5-methyl-L-Trp, DMSPP 結合型 dN19 IptA が SPring-8 の BL26B1 で X 線回折実験を行い、回折斑点は mx225HE を用いて検出した。1.00000 Å の波長の X 線を 1 度の振動角に対して 3 秒ずつ照射して回折データを収集した。6-methyl-L-Trp, DMSPP 結合型 dN19 IptA は SPring-8 の BL32XU で X 線回折実験を行い、回折斑点は EIGER9M を用いて検出した。1.00000Å の波長の X 線を 0.1 度の振動角に対して 0.05 秒ずつ照射して回折データを収集した。L-Abrine, DMSPP 結合型 dN19IptA は SPring-8 の BL26B1 で X 線回折実験を行い、回折斑点は mx225HE を用いて検出した。1.00000Å の波長の X 線を 1.0 度の振動角に対して 2.0 秒ずつ照射して回折データを収集した。

1-7. ドッキングシミュレーションによるジペプチド結合様式の推定

ドッキングシミュレーションに用いるための pdbqt ファイルは、決定した L-Trp, DMSPP 結合型 dN19IptA の結晶構造を基に作成した。決定した結晶構造中の水分子および L-Trp, DMSPP を削除してから AutoDock Tools を用いて全ての原子に Gasteiger 電荷をアサインした.pdbqt 形式のファイルを作成し、これを受容体分子に設定した。リガンドファイルは Chem3D Pro と AutoDock Tools を用いて作成した。L-Trp-Gly および Gly-L-Trp の立体構造を Chem3D Pro を用いて作成し、MM2 エネルギー最小化を行った後に pdb 形式

で出力したものを基に、AutoDock Tools を用いて pdbqt 形式のファイルを作成し、これをリガンドファイルに設定した。基質結合部位を中心とした一辺 30 Å に設定したグリッドボックスの中での結合様式を AutoDock vina により推定し、1 回のシミュレーションの試行につき 20 の結合コンフォメーションを予測した。

2章 放線菌由来新規カルバゾールプレニル基転移酵素の結晶構造解析

緒言

2-1. スクアレン合成酵素に類似した新規カルバゾールプレニル基転移酵素

カルバゾールはピロール環の両端にベンゼン環が付加された三環系核で構成される化合物である。既知の天然に存在するカルバゾールアルカロイドのほとんどは大きな π 共役系を有していることから芳香族求電子置換や酸化反応など、様々な化学的特徴を与えることができる。また、これらは多くが抗がん、抗菌、抗ウイルスなどの幅広い生理活性を示す高等植物や真菌から単離されている。高等植物や真菌からのカルバゾールアルカロイドとは対照的に、細菌のカルバゾールアルカロイドはあまり一般的ではない。細菌性カルバゾールの代表的なものは主に三つの種類に分類される。一つ目はスタウロスポリンやレベッカマイシンなどのインドロピロロカルバゾールである^{55,56}。また二つ目はインドロセスキテルペン系で、オリダマイシン、キシアマイシンなどが存在する(図 24)^{57,58}。

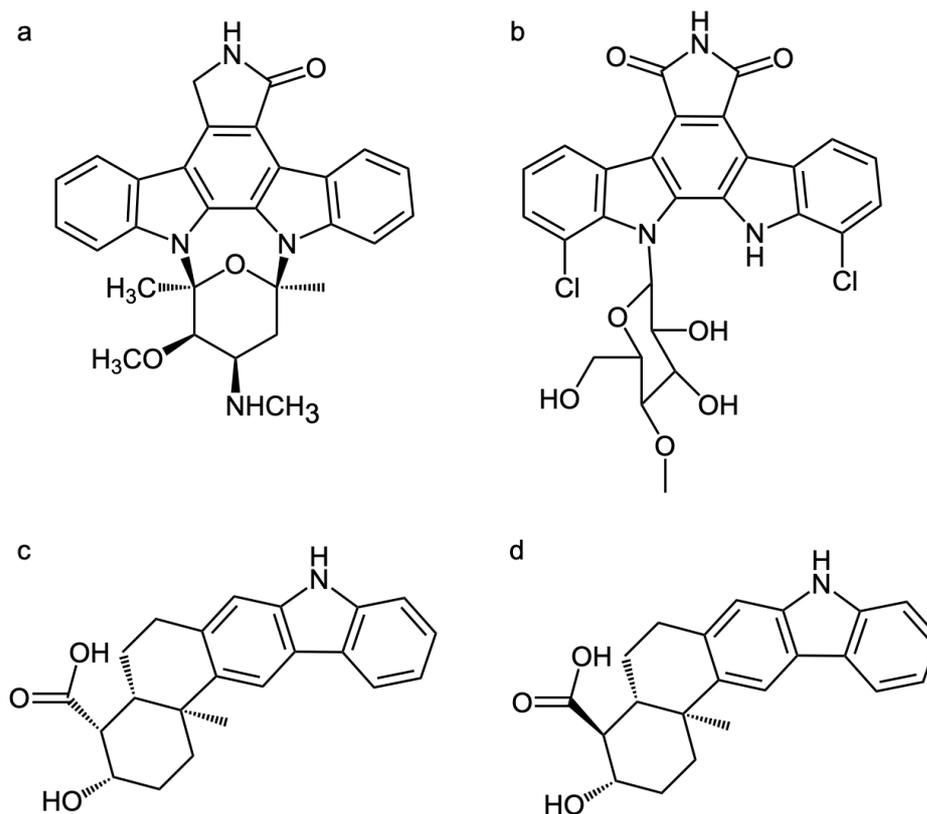


図 24 細菌性カルバゾール化合物

(a). スタウロスポリン (b). レベッカマイシン (c). オリダマイシン (d). キシアマイシン

これらのグループに属するカルバゾールアルカロイドの研究は全合成系などにおいてこれまでに盛んになされてきた⁵⁹⁻⁶³。近年、三つ目のクラスに属するカルキノスタチンやカラゾスタチン、ネオカラゾスタチンやラヴァンドキノシンなど、脂肪族側鎖を持つグループが潜在的な薬物リード化合物として注目されている⁶⁴⁻⁷¹。これらの細菌性カルバゾールはフリーラジカルスカベンジャーとして作用し、強力な神経保護作用を示す³⁴。フリーラジカルは脳および心筋の虚血、動脈硬化、炎症、リウマチ、ガンなどの様々な疾病の発症の引き金になる。フリーラジカルスカベンジャーとして作用する抗酸化剤はフリーラジカルによって引き起こされるこれらの損傷から保護する働きを持つことが報告されている⁷²。この点において、フリーラジカルスカベンジャーは潜在的な医薬品リード化合物として広く研究されている³⁴。そのため、脂肪酸側鎖を有するカルバゾールアルカロイドの生合成経路が注目されており、ネオカラゾスタチン、カルキノスタチン A の生合成経路がこれまでに解明された^{33,36}。ネオカラゾスタチン、カルキノスタチン A はインドール環の C6 位にプレニル基を有していることからこれらを生産する放線菌のゲノム内でのインドール PTase のホモログ検索がなされた。序論で述べたようにインドール PTase である IptA ホモログは放線菌に広く分布しているため、ネオカラゾスタチン、カルキノスタチン A 生合成においてもこれに相当する遺伝子が存在するかに思われていた。しかし、BLAST 検索などを行っても IptA と明らかな相同配列を有するホモログはアノテーションされなかった。また Huang らはネオカラゾスタチン生合成遺伝子クラスターを決定し、遺伝子破壊実験などによって生合成関連遺伝子のいくつかについては機能を決定することに成功した。その結果、*nzsG* がコードする酵素がカルバゾール環へのプレニル基の転移を触媒することを見出した。この酵素は放線菌由来の推定フィトエン合成酵素と 25~40% 程度の相同性を持つことが報告されている³⁶。また、そのアミノ酸配列には金属イオンを介してプレニル二リン酸を結合するために必要不可欠なモチーフである DDxxD モチーフが存在していた。これらの先行研究の結果により、2019 年、葛山らはカルキノスタチン A の生合成経路の全容解明に成功している。

カルバゾール骨格の合成に必要な環化反応を触媒する酵素はインドロカルバゾールの生合成に関与する StaP やキシアマイシンの生合成に関与する XiaI など、自然界ではごく少数しか報告されていない^{60,61}。細菌性カルバゾールアルカロイドはいくつかのトレーサー実験によって、トリプトファン、ピルビン酸、および二分子の酢酸からその骨格が構築されることが報告されている^{69,73,74}。ネオカラゾスタチン生合成における遺伝子クラスターがコードする酵素群の機能解析では環化反応によるカルバゾールコア生成機構は不明であったが、カルキノスタチン A 生合成系経路の解明における研究ではそれぞれの酵素の異種発現系構築および *in vitro* の機能解析により完全にその機構を明らかにした³³。この生合成経路においても NzsG と高い相同性を示す酵素 CqsB4 がカルバゾール環へのプレニル基の転移を触媒することが報告されている(図 25)。

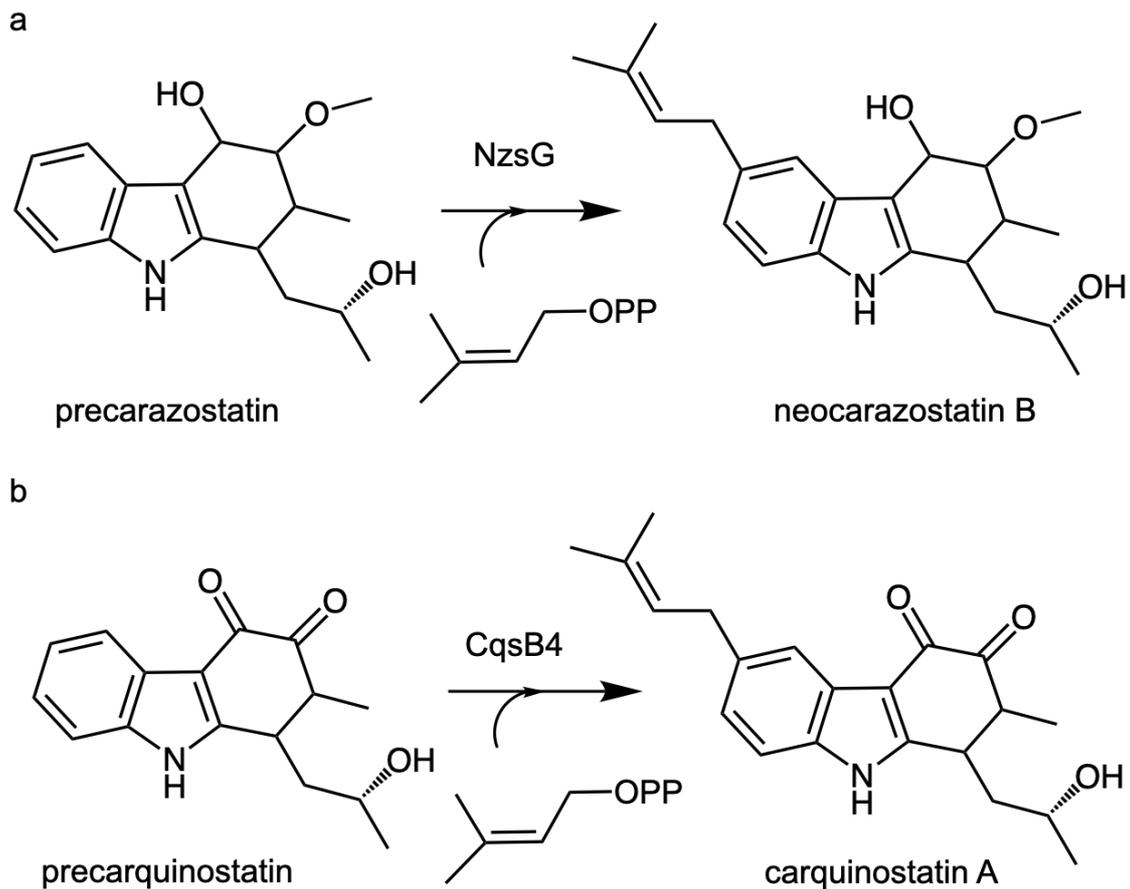


図 25 (a) NzsG および (b) CqsB4 の反応経路

この酵素も同様にフィトエン合成酵素、スクアレン合成酵素などと相同性を示し、そのアミノ酸配列にはプレニル基の結合に重要な二つのアスパラギン酸リッチモチーフが高度に保存されていた。

哺乳類のスクアレン合成酵素 (SQS) は 47 kDa の膜結合酵素であり、ステロールの生合成に特異的に関与するイソプレノイド代謝経路の分岐の最初の反応を触媒する。C₁₅ アリル化合物であるファルネシル二リン酸 (FPP) から二段階の反応でスクアレンを合成し、安定したシクロプロピルカルビニル二リン酸中間体を形成し、FPP を直鎖状に結合する。反応は異なる二つのステップで進行し、どちらもカルボカチオン中間体の生成を伴う^{75,76}。前半反応では FPP 二分子が縮合し、プレスクアレン二リン酸 (PSPP) を生成し、プロトンと無機二リン酸の放出が起きる。後半反応は PSPP がヘテロリシス、異性化、および NADPH による還元を受けてスクアレンを形成すると考えられている^{77,78}。スクアレン合成機構はふたつの異なる FPP 結合部位で進行すると仮定されている^{79,80}。これらの前半・後半反応の二段階の反応は酵素から基質がリリースされることなく連続的に起こることが実験的に明らかにされている(図 26)^{81,82}。

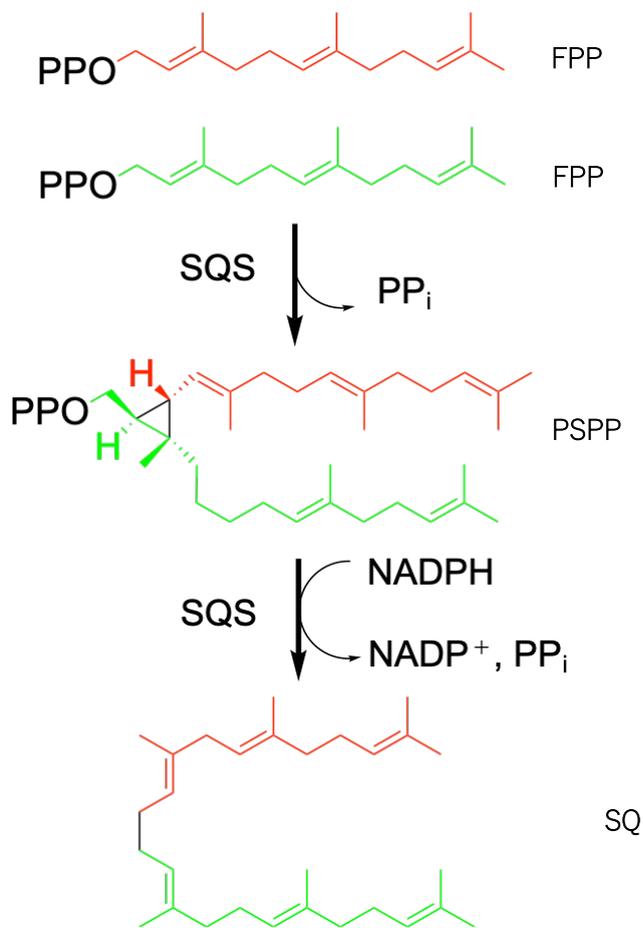


図 26 スクアレン合成経路

また 2000 年にヒト由来スクアレン合成酵素の結晶構造が解明されたことにより、その触媒機構の大きな知見を与えた⁸³。その後、2014 年には基質アナログおよび PSPP 結合型スクアレン合成酵素の結晶構造が解明された⁸⁴。スクアレン合成酵素の構造は α -ヘリックスで構成されており、三つの層に分けられる。最初の層は A, B, K ヘリックスによって形成され、二番目の層は E, C, J, および L が含まれている。三番目の層には D, F, G, H, I および M で形成されている。また配列相同性がないにも関わらず、活性部位を形成するコア構造はクラス I イソプレノイド合成酵素の構造と非常に類似していた。これらに見られる構造相同性は分岐を通じて同様の構造で進化した可能性があることを示唆している^{85,86}。スクアレン合成酵素の結晶構造は Mg^{2+} 結合型および非結合型、PSPP+ Mg^{2+} 、PSPP+ Mn^{2+} の状態で解明されている。保存されたアスパラギン酸リッチモチーフはヘリックス C の

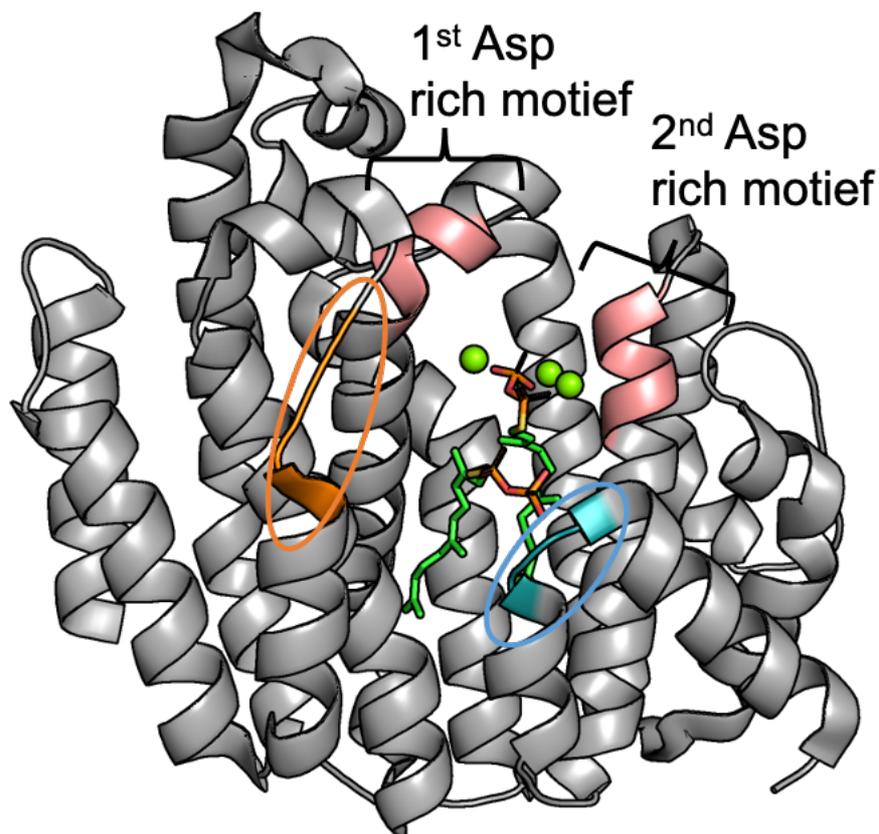


図 27 ヒトスクアレン合成酵素の FsPP 結合型構造

ピンクで示している部分がスクアレン合成酵素において高度に保存されているアスパラギン酸リッチモチーフ。オレンジ、シアンで示している部分が JK ループおよび AB フラップ。

⁸⁰DxxED⁸⁴, ヘリックス H の ²¹⁹DxxED²²³ に存在しており、活性部位内部に面していた(図 27)。

これらのモチーフは触媒となる Mg²⁺に配位しておりこの領域に変異を導入すると様々なスクアレン合成酵素や相同性のある SaCrtM で酵素活性が消失することが報告されている⁸⁷⁻⁸⁹。活性部位には AB フラップ (⁵¹SRSF⁵⁴) と呼ばれる領域が存在し、これは基質の結合に関与している。また JK ループ (³¹⁴VKIRK³¹⁸) と呼ばれるヘリックス K に存在するループ領域は後半反応に関与する NADPH の結合部位であると推測されている。これは結晶構造において、非対称単位中の分子、A, D, E, F においてこの領域の電子密度が非常に弱いため、非常に柔軟性の高い領域であり、活性部位への NADPH の導入が可能な位置に存在していることから提案されている⁸⁴。また、金属イオン非存在下、基質結合型スクアレン合成酵素の結晶構造ではいくつかの非対称単位中の分子に完全に二分子の基質アナログが結合している訳ではなかったため、基質結合の順序についても推測されている。まず初めに AB フラップ上の Ser51, Ser53 にリン酸基を介してプレニルアクセプターが結合し、1st アスパラギン酸モチーフにプレニルドナーが結合するメカニズムが提案されている。これは金属イオン存在下基質結合型構造からも、支持される。Mg²⁺の結合によってリン酸基の配位する位置が少し動くが、全体的に大きく動く様子は確認できなかった。その代わりにポリプレニル基の柔軟性を利用して折れ曲がった形でファルネシルチオロニリン酸 (FsPP) が収納されていた。これは PSPP を生成する縮合反応の際に、二つの分子が近接する必要があるためだと考えられている。活性部位内部でピロリン酸基を放出してアリルカチオンを生成するためにニリン酸基を固定して活性化するために Mg²⁺が重要な役割を果たすことがシス・トランスプレニルニリン酸合成酵素やテルペン環化酵素においてこれまで報告されている⁹⁰。さらにアスパラギン酸リッチモチーフは Mg²⁺の移動およびアルキルドナーのイオン化の補助として機能があると推測されている。ポリプレニル側鎖は非常に柔軟性が高く、二つの分子の近接を容易にしていると考えられる。また、スクアレン合成酵素は Mg²⁺, Mn²⁺を用いることで活性を促進するが、二価カチオンが含まれない緩衝液下では活性は見られない。5 mM Mg²⁺, 0.5 mM Mn²⁺で最適な活性を示すが、2 mM 以上の Mn²⁺が存在すると活性が阻害されることも報告されている。金属イオン存在下基質結合型構造では二つのアスパラギン酸リッチモチーフに結合した三つの Mg²⁺がプレニルドナーの FsPP に結合し、イオン化を促している。このような二つのアスパラギン酸リッチモチーフを介した head-to-tail にアルキル化反応を活性化するような同様の三核金属クラスターは他の多くのトラン

ス PTase でも確認されている。トランス PTase ではファルネシル二リン酸合成酵素、ゲラニルゲラニル二リン酸合成酵素、リモネン合成酵素など、三つの Mg^{2+} をトリガーとした逐次のイオン化、脱離、縮合のメカニズムが採用されている⁹¹⁻⁹³。また、周辺の極性残基も活性に影響することが変異体解析の結果から明らかにされている。スクアレン合成酵素やデヒドロスクアレン合成酵素において高度に保存されている Gln212 は役割が明らかにはなっていない。しかし、 Mg^{2+} が結合した二リン酸基との静電的相互作用や、カルボカチオン中間体の安定化に寄与している可能性は示唆されている。Q212E 変異体ではスクアレンの合成に影響がなかったのに対して、Q212L 変異体では完全にスクアレン合成活性が消失していた。Q212N では意外にも前半反応の活性が 50 %程度維持される結果が得られていた。またアスパラギン酸リッチモチーフ近辺に存在する Arg77, Arg228 については、R77A 変異体において活性の大幅な低下が確認されていた。後半反応は PSPP のシクロプロパンの開裂およびピロリン酸基の離脱により開始される。R77A で大幅な活性の低下が確認されたのは Arg77 と PSPP のリン酸基の酸素原子が塩橋を形成していたため、C-O の切断に静電的な補助をしている可能性がある。PSPP からピロリン酸が脱離すると、シクロプロピルカルビニルカチオンが形成される。これが NADPH による還元を受け、スクアレンとなる。しかし、スクアレン合成酵素の NADPH によるスクアレンの転位、位置・立体特異的な還元機構についてはこれまで多くの議論がなされてきたが未解明のままである^{76,94}。様々な条件で結晶化を行うことで NADPH 結合型構造の獲得を試みたが活性部位腕の FPP や PSPP と NADPH の立体障害のためか、触媒作用中に NADPH が素早く解離するために、目的の構造が得られなかったようである。また NADPH を反応に必要としないデヒドロスクアレン合成酵素 SaCrtM では酵母からヒトスクアレン合成酵素まで広く保存されている 4 つの領域のうちの 4 番目の領域の相同性がなく、これが後半反応の転位・還元が起きない理由だと考えられている⁹⁵。この領域近辺がヒトスクアレン合成酵素では NADPH 結合部位であると予測されており、Arg52, Arg77, Arg218, Lys315, Lys318 など多くの正電荷を帯

びた残基で囲まれた領域が構成され、NADPH の負電荷部分と直接相互作用しないまでも引き寄せなどに関与している可能性が高いと考えられている(図 28)。

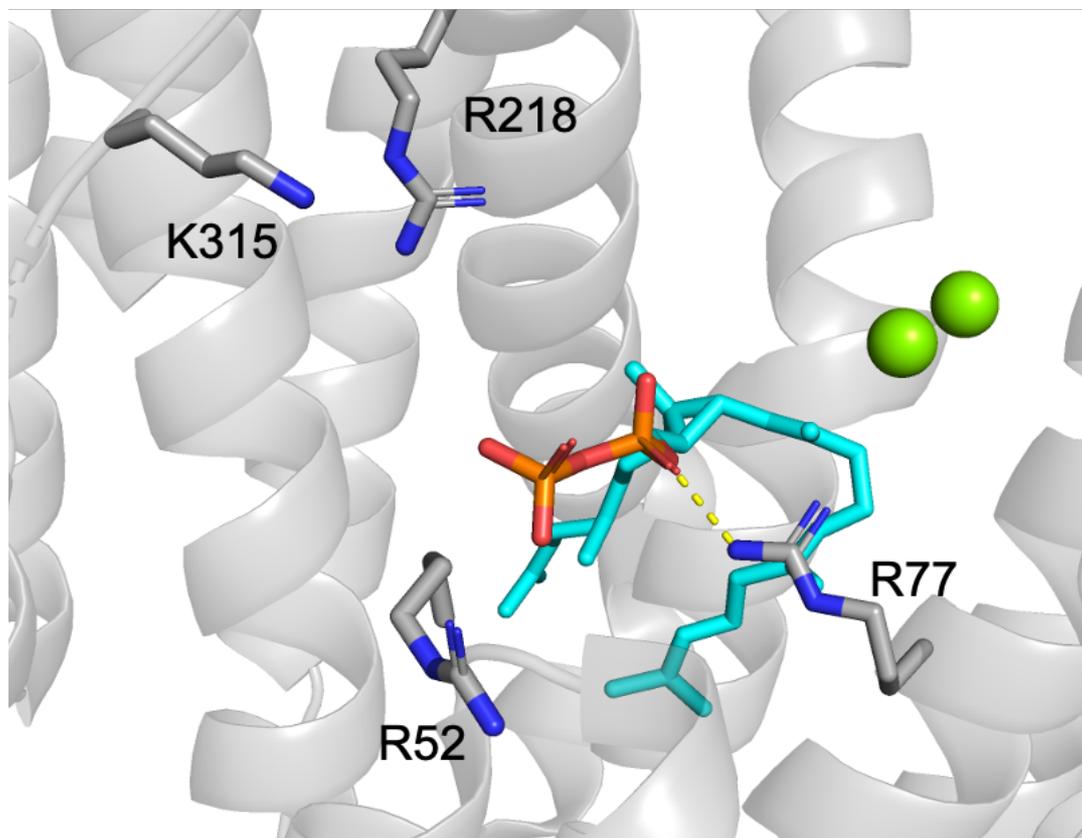


図 28 PSPP と塩橋を形成する残基と NADPH の結合に関与するとされる残基

この変異体解析の結果、R218A では高濃度 (5 mM 以上) の NADPH が存在しないと還元が起きないことが明らかにされている。また他の変異体解析、K315E/R317E, K315E/R318E ではスクアレン合成活性が減少した。これらが存在する JK ループが NADPH 認識に関与していることを示している。補因子を必要としない植物および細菌のフィトエン合成酵素ではこの JK ループの配列が保存されていないことから支持される。また非常

に柔軟性の高い領域であり、NADPH の結合によって安定化されるのであろう。NADPH を消費しないデヒドロスクアレン合成酵素においても、阻害剤結合型や基質アナログ結合型など様々な状態の結晶構造が解明されている⁸⁸。デヒドロスクアレン合成酵素においてもプレニル基の結合に必須な二つのアスパラギン酸リッチモチーフが保存されている。また、ヒトスクアレン合成酵素とのアライメントでは C 末端の構造が少し異なる。ヒトスクアレ

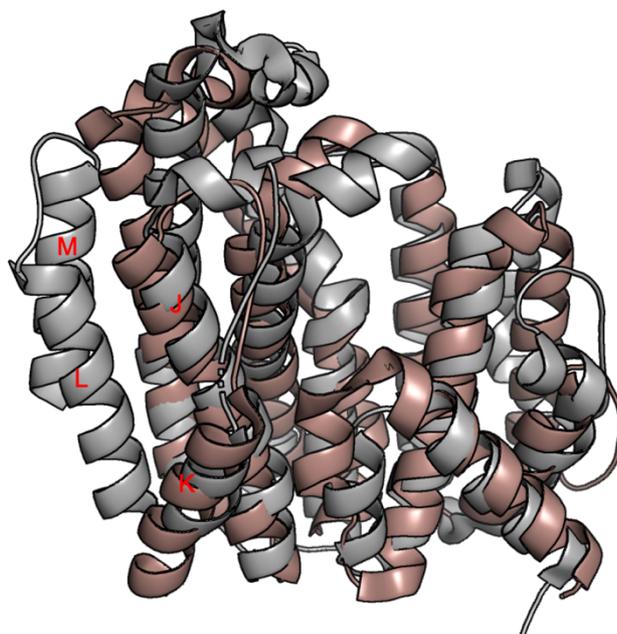


図 29 ヒトスクアレン合成酵素（グレー）と黄色ブドウ球菌由来デヒドロスクアレン合成酵素のアライメント

スクアレン合成酵素では C 末端に追加の L, M ヘリックスが存在する。ン合成酵素においては追加のヘリックスが二本存在する(図 29)。

また、哺乳類のスクアレン合成酵素に保存されている Y171 に相当する Y129 の Ala 置換体ではデヒドロスクアレン合成酵素においても活性の消失が起きる⁸⁷。さらに活性部位底部の Phe26 がポケットの底を形成しているため、F26A 変異体では本来の基質である FPP (C₁₅ アリル化合物) から GGPP (C₂₀ アリル化合物) を受容できるようになり、フィトエンを合成できるようになることが報告されている⁹⁶。反応メカニズムはスクアレン合成酵素と実質的には同様であり、フォールドも類似していることから共通の祖先を共有していることは明らかである。加えてデヒドロスクアレン合成酵素の点変異導入で基質寛容性が代わり新規の長鎖カロテノイドが合成できるようになったことで、実験的に定方向進化を促す試みがなされている。カロテノイド骨格の構築が起きると、天然もしくは人工的な下流の経路の酵素が新しい基質として受容し、新規カロテノイドの創生につながる。不飽和化酵素

や環化酵素、脱水素酵素や切断酵素など、カロテノイド修飾に関与する酵素が新規骨格に作用することでカロテノイドの化合物ライブラリー多様性はおよそ 3 倍程度増加すると予測されている⁹⁶。

二次代謝経路は遺伝子重複と生合成酵素の突然変異等を介して化学的多様性を獲得し、進化してきた⁹⁷。実際にこれまでも新規化学構造の効率的な触媒作用を示すように機能を進化させてきたと予測されている⁹⁸。新規代謝物は既存の経路に最小限の変異が起きた時に生成される。そのため、経路上流の酵素の基質特異性は不要な副産物の生成を抑制している。カロテノイドの場合、極めて特異的な生合成反応が生成物の多様性を制御する重要な点であると考えられている。他のイソプレノイド経路では最初の経路特異的な酵素がそれらの基質選択において非常に特異的であり、最終的に経路全体を特定の化合物に導くことができている⁹⁹。代謝経路の鍵酵素を操作することは生合成経路全体を拡張して新規化合物を創生するための最適な方法であると考えられている。

本研究対象の酵素であるカルバズール PTase も二次代謝に関与する酵素であり、進化的な観点から非常に興味深い研究対象である。前述した通り本研究対象のカルバズール PTase はこれまでに同定されたいずれの芳香族基質 PTase と相同性を示さない。カルバズール PTase によって触媒されるプレニル化のメカニズムはアスパラギン酸リッチモチーフを持たない ABBA フォールドの PTase とは異なることが予測される。分子進化系統樹解析解析からも、NzsG, CqsB4 は全ての方向族基質 PTase とは異なり、スクアレン合成酵素と同じ分岐を形成することが明らかとなっている³⁵。このことから新規カルバズールプレニル基転移酵素はスクアレン合成酵素から進化の過程で分岐したことが示唆されており、その履歴をたどる上で重要な研究対象である。本研究では CqsB4 およびそのホモログである LvqB4 の X 線結晶構造解析から新規カルバズール PTase の反応メカニズムの解明を目的とした。

結果・考察

2-2. 基質結合型 LvqB4 の結晶構造

当初、CqsB4 の結晶が得られなかったためホモログである LvqB4 (配列相同性 73.3%) の結晶化を試みた。その結果、LvqB4, プレカルキノスタチン (PCQ, プレニルアクセプター), (*S*)-シトロネリニン酸 (CPP, プレニルドナーアナログ) の酵素-基質三者複合体結晶構造を分解能 1.71 Å で決定した(図 30)。

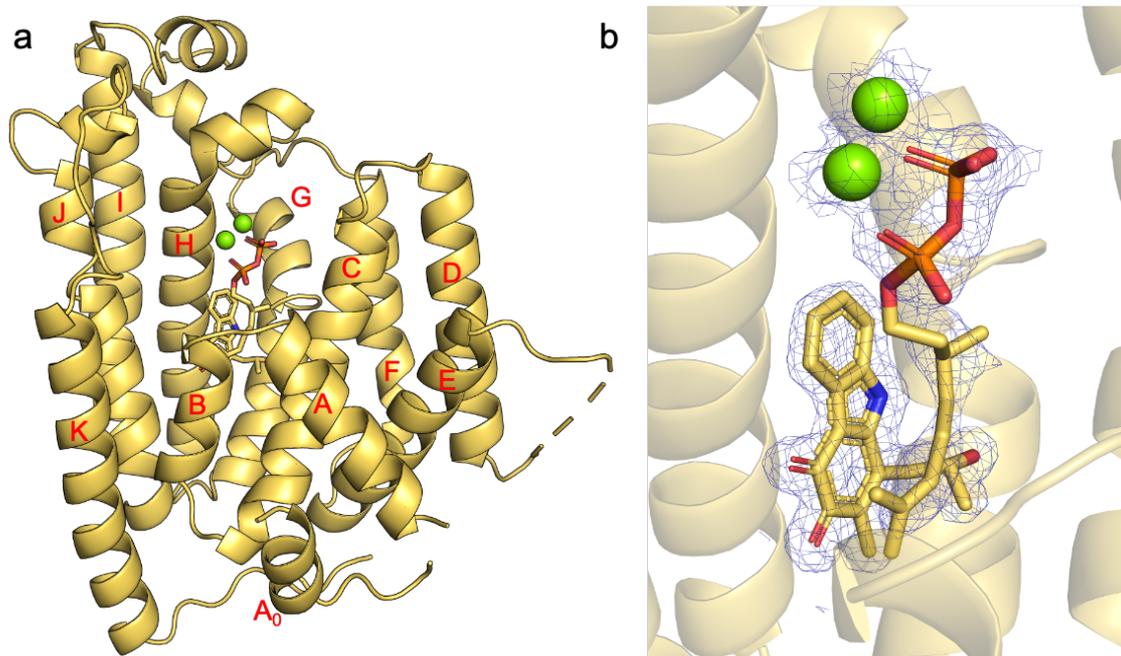


図 30 LvqB4 の酵素-基質三者複合体の結晶構造

(a). LvqB4 の全体構造 (b). プレニルドナー/アクセプターおよび Mg^{2+} イオンの Simulated Annealing Omit map : (3.0 σ)

LvqB4 は非対称単位中に二分子存在していたが、ゲルろ過クロマトグラフィーによる分析から溶液中では単量体で存在していることが示唆されている。LvqB4 の全体構造は 12 本の α -ヘリックス (A₀, A-K) で構成されており、B, C, G, H, J のヘリックスに囲まれた大きな活性部位がある。活性部位上部にはスクアレン合成酵素やデヒドロスクアレン合成酵素によく保存されている 2 つのアスパラギン酸リッチモチーフがある。1 つ目のアスパラギン酸リッチモチーフ (⁶¹DxxxD⁶⁵) はヘリックス C に、2 つ目のアスパラギン酸リッチモチーフ (¹⁹⁵DxxxD¹⁹⁹) はヘリックス H に存在する。LvqB4 の構造では溶媒表面に露出していた D92-R98, K294-M304 の電子密度が非常に弱く、非常に柔軟な領域であることが示唆される。また、ヒト由来スクアレン合成酵素 (hSQS) および *Staphylococcus aureus* 由来のデヒドロスクアレン合成酵素 (SaCrtM) の構造と非常によく似ていた。LvqB4 の A-K ヘリックスの構造は hSQS, SaCrtM で非常によく重なるが、A₀ ヘリックスはどちらにも存在しない。これは hSQS においては膜アンカー領域として可溶性発現のために欠損させられていることと、SaCrtM においては N 末端領域が LvqB4, hSQS よりも短い事によるものだと考えられる。これら 3 つの構造の最も大きな違いは C 末端領域に存在する。hSQS は追加のヘリックスとして L, M ヘリックス有しており、SaCrtM には存在しない。一方で、LvqB4

の C 末端はヘリックス構造の下部を通るループ領域として存在している。これらの C 末端領域はいずれも活性部位からは離れているため、その役割は不明である(図 31)。

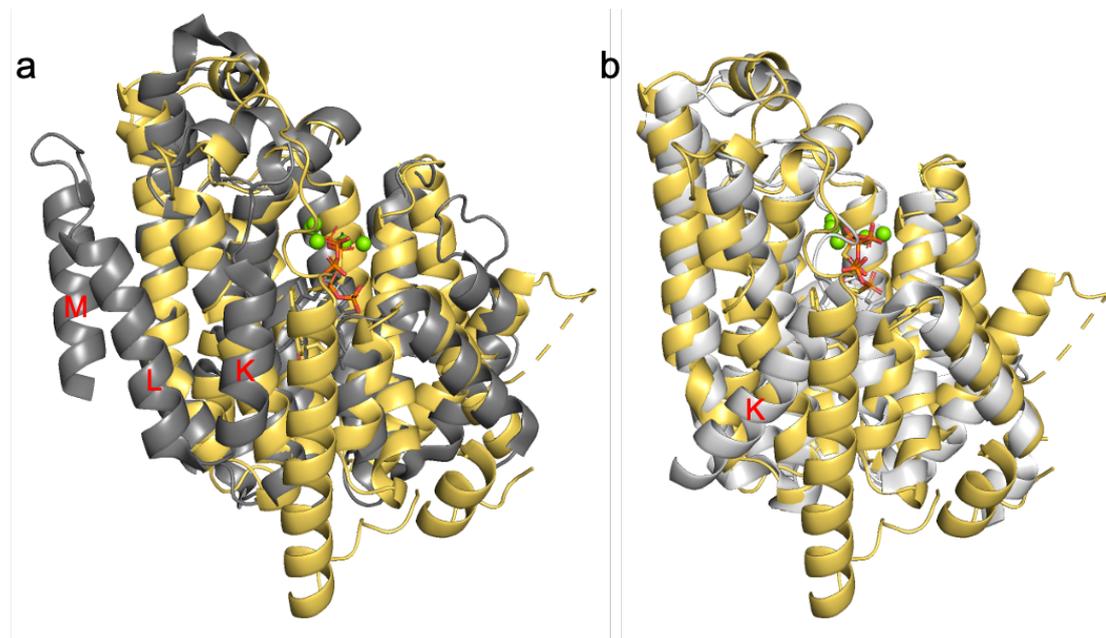


図 31 LvqB4 と hSQS および SaCrtM の構造比較

(a). LvqB4 (イエロー) と hSQS (グレー) の構造比較。SQS は K ヘリックスの位置が異なり、L, M の二本の追加のヘリックスが存在する。(b). LvqB4 (イエロー) と SaCrtM (ホワイト) の構造比較。SaCrtM では K ヘリックスの位置が異なる。

LvqB4 の活性部位には PCQ, CPP, 2つの Mg^{2+} イオンが存在していた。hSQS, SaCrtM の活性部位は 2つの基質結合部位に分かれており、S1 部位と S2 部位と呼ばれている。これらはそれぞれプレニルドナー/アクセプター-FPP の結合に関与している。構造の重ね合わせより、Lvq4 ではプレニルドナーである CPP は S1 サイトに配置されている。しかし、hSQS, SaCrtM のドナー-FPP 分子と比較して 3-4 Å 離れている。その結果、CPP は PCQ の直上に位置することになる。この結合様式はプレニルドナーがプレニルアクセプターの芳香環上に重なるというこれまでに多く報告のある芳香族 PTase の結合様式と非常に類似している。PCQ は S2 部位に配置されており、アクセプター-FPP 分子のファルネシル部位とよく重なる。このように LvqB4 は非芳香族化合物を基質とする hSQS や SaCrtM の活性部位に既知の芳香族 PTase のようにプレニルドナー/アクセプターを配置している(図 32)。

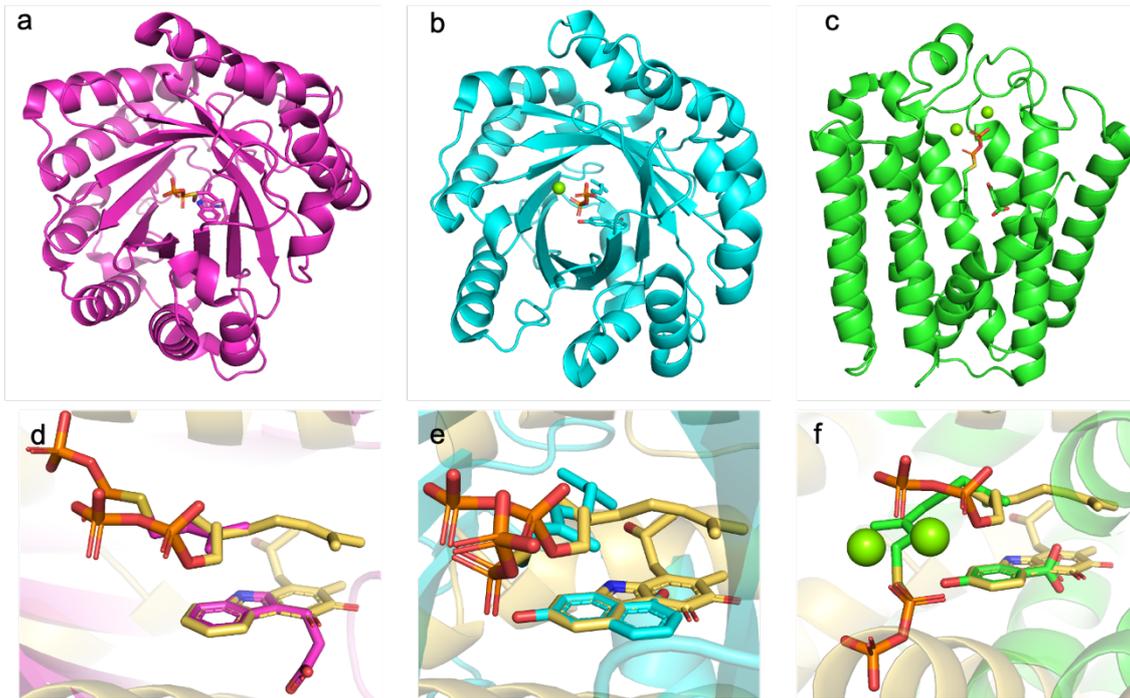


図 32 既知の芳香族 PTase と基質結合様式の比較

(a-c). *Streptomyces coelicolor* 由来 5-DMATS (PDB ID 6ZRZ), *Streptomyces* sp. CL190 由来 NphB (PDB ID 1ZB6), *Aeropyrum penix* 由来 UbiA の全体構造 (d-f). 既知の PTase の基質と LvqB4 の基質のアライメント

2-3. プレニルドナーの結合様式

S1 サイトでは CPP および 2 つの Mg^{2+} イオン (MG1, MG2) が確認できた。MG1 は D191, D195 のカルボキシ基、CPP の α -、 β -リン酸基と周辺の水分子によって 8 面体で配位されている。MG2 は D191, D19 と CPP の β -リン酸基と 3 つの水分子によって 8 面体に配位されている。MG2 に配位している水分子のうち 2 つは D199 のカルボキシ基にも水素結合を形成している。D195, D199 は 2nd アスパラギン酸リッチモチーフを形成する残基である。これら 3 つの D191, D195, D199 を Ala 置換すると、プレニル化活性が消失する。これは CqsB4 においても同様にプレニル化活性の消失が確認できた。これらの結果から 2nd アスパラギン酸リッチモチーフを含む 3 つの Asp 残基がマグネシウムの結合に必要であることが明らかとなった。hSQS, SaCrtM と大腸菌の FPP 合成酵素や *Fusarium sporotrichioides* のセスキテルペン環化酵素 trichodiene 合成酵素など、クラス I テルペノイド合成酵素の結晶構造では 3 核の Mg^{2+} クラスターが観察されているが、本結晶構造では 2 つの Mg^{2+} イオンしか見られなかった。hSQS や FPP 合成酵素では 3 つの Mg^{2+} イオンのう

ち2つは 1st アスパラギン酸リッチモチーフで認識され、残りの1つは 2nd アスパラギン酸リッチモチーフに認識される。SaCrtM では2つのアスパラギン酸リッチモチーフそれぞれが3つの Mg²⁺イオンのそれぞれが3つの Mg²⁺イオンのうちの1つと結合し、残りの1つはプレニルドナーおよびアクセプター-FPP 分子のピロリン酸の間に配置されている。これらと LvqB4 の違いは CPP がドナー-FPP 分子と比較して移動していることに起因すると考えられる(図 33)。

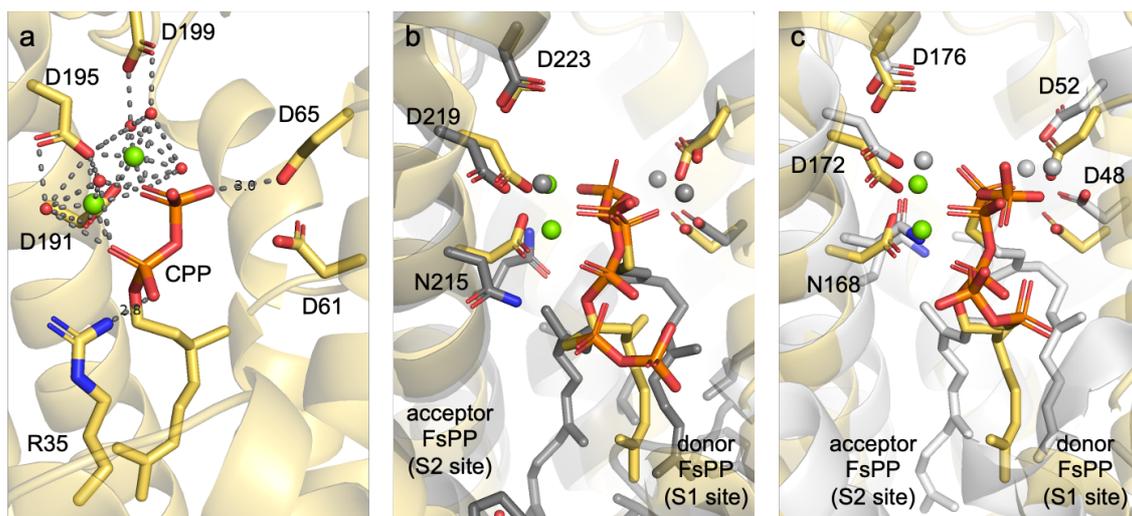


図 33 LvqB4 のプレニルドナー結合様式と hSQS, SaCrtM との比較

(a). LvqB4 のプレニルドナーの結合様式。赤い玉は水分子を表す。緑で示しているのが Mg²⁺イオン。Mg²⁺イオンに対して 8 面体に配位している様子が確認できた。(b, c). hSQS, SaCrtM と LvqB4 のプレニルドナー結合様式の比較。それぞれドナー-FPP 分子のリン酸基はよく重なる位置に存在している。

D61, D65 の 1st アスパラギン酸リッチモチーフには Mg²⁺イオンが確認できなかったが、これら2つのアミノ酸残基は CPP プレニル部位、β-リン酸基からそれぞれ 3 Å しか離れていないため、プレニルドナーの結合およびピロリン酸基の脱離に重要な役割を果たしていると考えられる。これらの変異体、D61A, D65A では LvqB4, CqsB4 どちらにおいてもプレニル化活性が消失した。この結果から 1st アスパラギン酸リッチモチーフも活性に必須であることが明らかとなった。アスパラギン酸リッチモチーフに加えて、ヘリックス B の R35 は CPP の α-リン酸基と相互作用している。R35A 変異体では LvqB4 のプレニル化活性の減少が確認され、反応に重要であることがわかった。しかし、CqsB4 の対応する残基の変異体では活性に影響を与えることはなかった。これは柔軟性の高い hSQS の AB フラップ上に存在する残基であるためにコンフォメーションが異なるためだと考えられる。hSQS に

においてこの領域は2つの Ser 残基によってアクセプター-FPP のピロリン酸と相互作用し、内向きのコンフォメーションに変化させる。同様の相互作用は FsPP 結合型 SaCrtM においても確認されている。LvqB4, CqsB4 ではこの Ser 残基が Gly 残基になっており、hSQS や SaCrtM において高度に保存されているため、本研究対象の酵素に特徴的な相互作用の違いであると言える。

2-4. プレニルアクセプターの結合様式

S2 サイトでは PCQ は主に疎水性のアミノ酸残基に囲まれているが、PCQ の近くには Q188, D271, H275 の3つの親水性残基が存在する。特に D271 のカルボキシ基は PCQ のオルトキノン部位と相互作用している(図 34)。

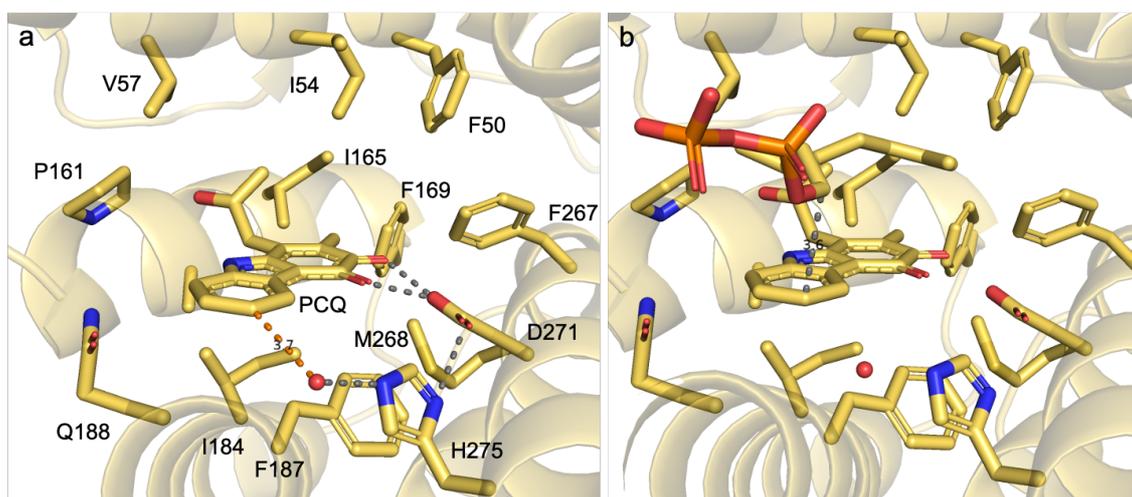


図 34 LvqB4 のプレニルドナー結合様式

(a). PCQ の結合様式。主に嵩高い疎水性のアミノ酸側鎖に囲まれた環境に配置されている。D271 とオルトキノン部位での水素結合が確認できた。(b). プレニルドナー/プレニルアクセプターの距離は 3.6 Å でこれまでに報告のある芳香族 PTase がプレニル化反応を触媒するが可能な距離にあることが観察できる。

PCQ は CqsB2 から生成される際に、還元型として存在しているため LvqB4 の真の基質は還元型 PCQ であり、オルトハイドロキノンを経由して D271 と水素結合を形成していると考えられる。この検証のため、還元型および酸化型 PCQ の活性測定を行なった。還元型 PCQ はトリス-2-カルボキシエチルホスフィン (TCEP) を用いて調製した。TCEP の存在下では還元剤非存在下での活性が検出できないほど酵素濃度が低くても LvqB4, CqsB4 の非常に高い活性が確認できた。これはフロンティア軌道論によって説明できる。この理論

では最高被占分子軌道 (HOMO) と求核剤の最低被占分子軌道 (LUMO) が反応に関与すると考えられている。プレニル化反応ではプレニルアクセプターが求核剤として反応するため、PCQ の HOMO 密度を Firefly プログラムで計算した。その結果、オルトキノン型の PCQ は LvqB4 および CqsB4 のプレニル化反応位置である C6 位の炭素原子において強い HOMO 密度を示すことがわかった。一方、オルトキノン型の PCQ では C6 炭素原子の HOMO 密度が弱い。PCQ の強い HOMO 密度は TCEP の存在下で LvqB4 と CqsB4 が強い活性を示した理由の 1 つである。DMATS 型 PTase でも同様な報告が存在する。今回の *in vitro* および *in silico* 解析により LvqB4 および CqsB4 の真のプレニルアクセ

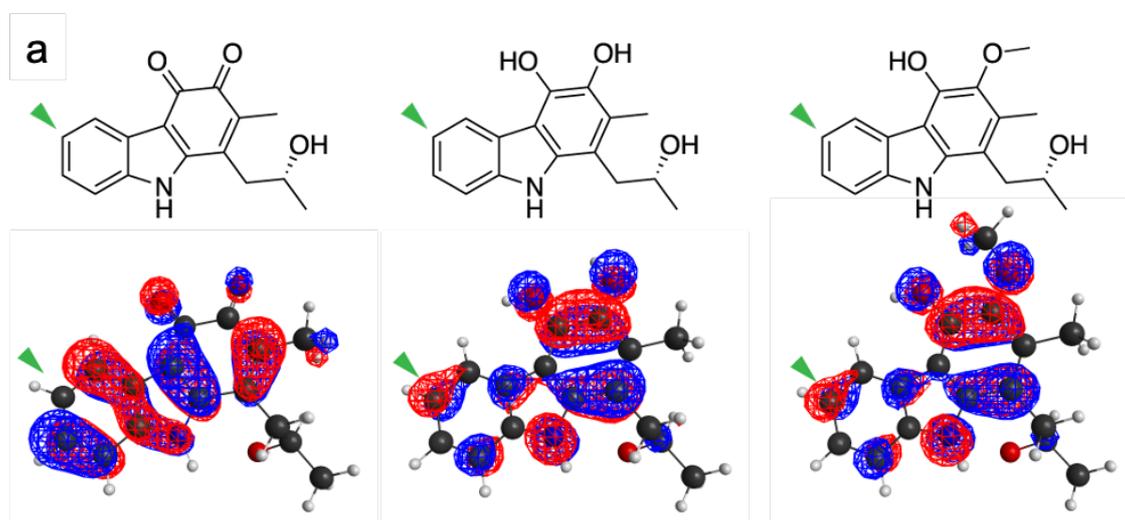


図 35 プレニルアクセプターの電子マップ

(a). Firefly で計算されたプレニルアクセプターの HOMO/LUMO マップ。左から PCQ, PCQ-reduced, preneocarazostatin (NzsG のプレニルアクセプター) でそれぞれプレニル化を受ける位置を緑矢印で示している。

プターは還元型 PCQ であると結論づけられた(図 35)。

また、PCQ の結合に関与するアミノ酸残基を調べるために周辺の残基を Ala 置換して活性測定を行った。P161 は主鎖の構造に影響を与える可能性があり、A162 は置換しても影響がないため除外した。そのほかのアミノ酸残基の Ala 置換変異体のプレニル化活性を LC/MS により分析した。その結果下記変異体の解析結果 (図 36) に示す通り、I184, Q188, F267, D271, H275 の Ala 置換体では活性の急激な低下、もしくは消失が確認された。CqsB4 においても、同様のアミノ酸残基 I183, F186, F266, D270, H274 の Ala 置換体でプレニル化活性の低下が確認できた。LvqB4 の I184, F267, D271, H275 はプレニル化反応に共通し

て重要な残基であることが明らかとなった。I184 は側鎖と PCQ のカルバゾール環で CH- π 相互作用を形成していると思われる。F267 は活性部位の底部を決める重要な役割をしていると推定される。D271, H275 は PCQ の近傍に存在する水分子と水素結合ネットワークを形成することで触媒三残基のような役割を果たしていると考えられる。セリンプロテアーゼのように、D271 が H275 のイミダゾール環に生じる正電荷を安定化し、塩基触媒残基として H275 が機能し、隣接する水分子からプロトンを引き抜くことで、求核性を高める。そのため水分子が求核剤として働き、近接している precarquinostatin の C6 位の炭素からのプロトンの引き抜きがおこると推定している。D271-H275 がプロトンリレー系として機能し、D271-H275-水分子による触媒三残基的役割が反応に重要であると提案する。

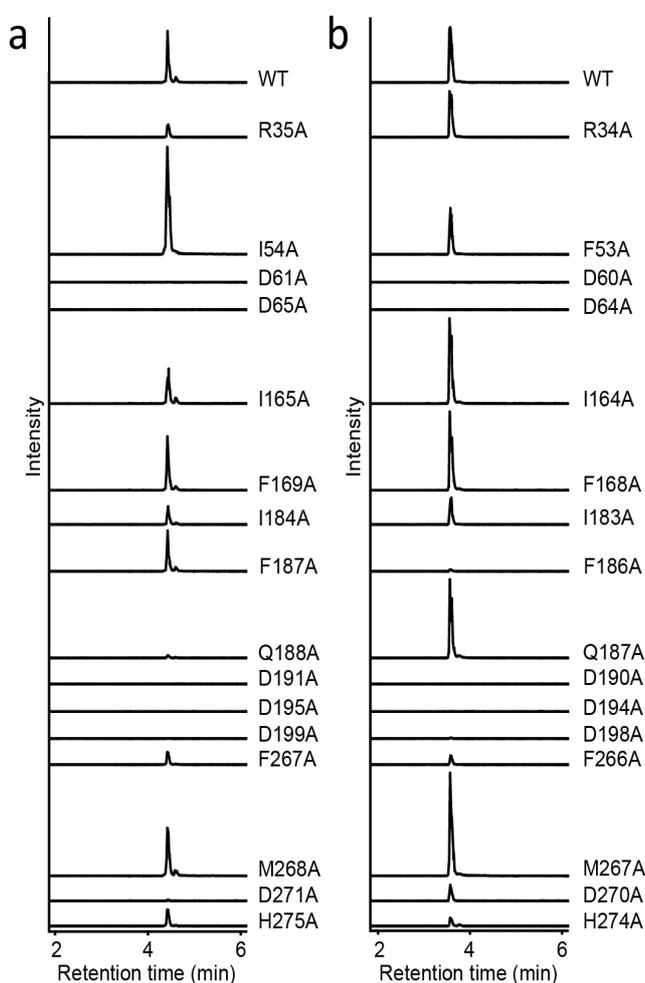


図 36 LvqB4 および CqsB4 の Ala 置換変異体の活性測定の結果

(a). LvqB4 における基質結合部位周辺のアミノ酸の Ala 置換変異体の活性測定結果

(b). CqsB4 における基質結合部位周辺のアミノ酸の Ala 置換変異体の活性測定結果

2-5. 反応機構の提案

プレニル化反応ではプレニル化された原子の脱プロトン化に続いてカルボカチオン中間体に対するプレニルアクセプターの求核攻撃が必要である。脱プロトン化のための触媒残基は既知の芳香族 PTase で提案されている。CloQ では基質のヒドロキシ基と水素結合を形成する E281 がプロトンを引き抜く。これによりプレニル化- σ 複合体を中和すると考えられている。また FgaPT2 では K174 がプロトン引き抜きに関与していると推定されている。膜結合型芳香族 PTase の UbiA では脱離したピロリン酸が脱プロトン化に関与することも提案されている。LvqB4 の構造では PCQ のプレニル化を受ける C6 炭素原子から 5.1 Å 離れた位置に Q188 が存在しており、上記のような既知の芳香族 PTase に見られる触媒残基は存在しなかった。一方で、C6 炭素原子から 3.8 Å 離れた位置に水分子が存在しており、これが D271-H275 と水素結合ネットワークを形成している。D271A, H275A 変異体のプレニル化活性が激減することから、これらが触媒三残基としての役割を果たしていると考えられる。この水分子は別の水分子と D191 との相互作用によって分極されることでプロトンを受容できるようになるのではないかと考えられる。FgaPT2 においても同様な提案がなされている。これらの結晶構造解析による構造学的な洞察から、LvqB4 の反応メカニズムを提案する(図 37)。

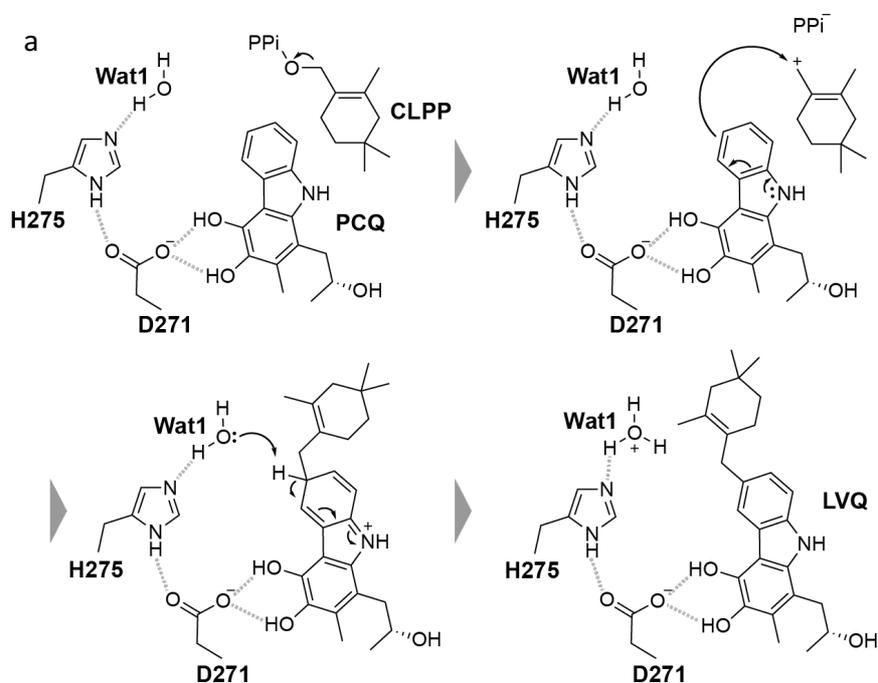


図 37 LvqB4 の推定プレニル化メカニズム

還元型 PCQ および CLPP が Mg^{2+} と酵素に結合し、CLPP からピロリン酸が脱離することでカルボカチオン中間体が生成される。PCQ の C6 炭素原子の HOMO がカルボカチオンへ求核攻撃することで C-C 結合が形成される。C6 のプロトンが D271-H275 で分極された水分子によって引き抜きが起こることで生成物である LVQ が生成される。D271, H275 の残基は放線菌由来のカルバゾール PTase である LvqB4, CqsB4, NzsG において高い保存性があるため、このメカニズムは共通して使用される可能性がある。

2-6. ドッキングシミュレーションによる CLPP 結合様式の推定

今回得られた基質結合型 LvqB4 に結合している CPP は本来の基質ではないため、ドッキングシミュレーションによって CLPP の結合ポーズを予測した。CLPP は通常のイソプレノイド鎖が head-to-tail で伸長される直鎖の化合物ではなく、head-to-middle の形で伸長された炭素数 10 の環状イソプレノイドである。この化合物とアクセプター結合型 LvqB4 の結晶構造に対して Auto Dock Vina を用いたドッキングシミュレーションを行った。その結果、ニリン酸基が Mg^{2+} に配位し、プレニル化を受ける precarquinostatin の C6 位の炭素直上 3.6 Å の距離にアリルカチオンが生成される C1 炭素が位置される、結晶構造と同様な配置のポーズが得られた(図 38)。

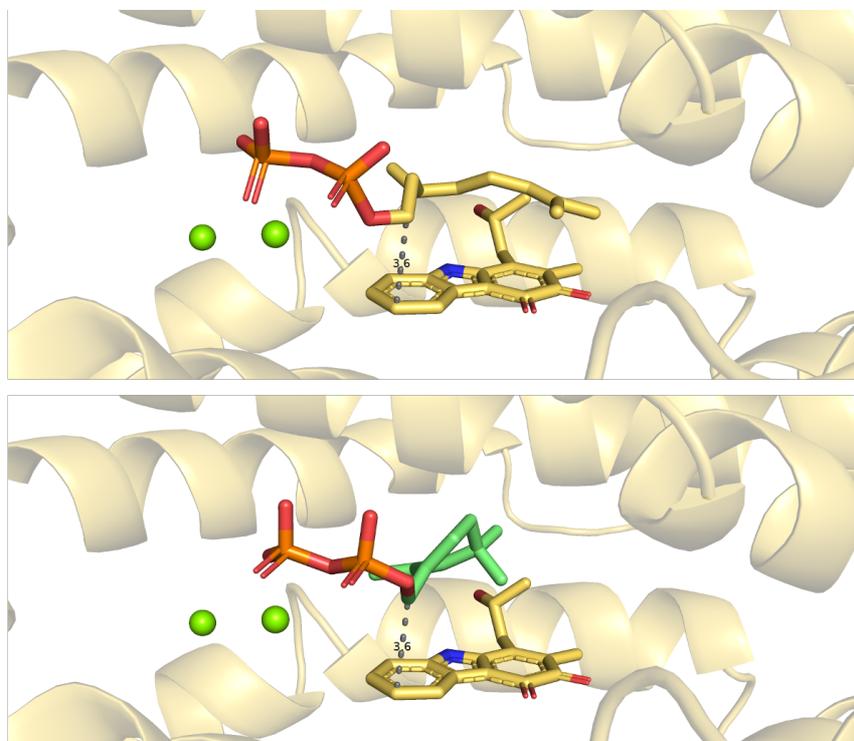


図 38 ドッキングシミュレーションによる CLPP の推定結合様式

今回 LvqB4 のプレニル化活性測定には GPP を用いており、ピークがスプリットした分析結果が得られている。これはわずかではあるが本来プレニル化を受ける C6 位ではなく C5 位などにゲラニル基が付加された化合物が生成されているのだと考えられる。また、このポーズからは CLPP と precarquinostatin の π - π 相互作用も寄与していると考えられる。そのため CLPP を用いた場合の生成物では C5 位にプレニル基が付加されるような副生成物が生産されないのだと予測される。

2-7. CqsB4 の結晶化に向けたコンストラクト作成と熱安定化化合物のスクリーニング

CqsB4 は結晶化に適した試料調製が困難であったが、精製手法の最適化の結果、高純度かつ単分散な試料を得ることができた。そこで結晶化に用いる際のタンパク質濃度や含まれる緩衝液組成の詳細な検討などを含めて 50,000 条件程度結晶化を行なったが、CqsB4 の結晶と思われるものは得られなかった。そこで、LvqB4 と高い 73.3% の相同性を示すことからおそらくほとんど類似した構造をしていると予測したので、LvqB4 の結晶構造において柔軟性が高く電子密度が確認できなかった disorder 領域を欠損させた変異体を作製した。また、hSQS や SaCrtM において存在しない A₀ ヘリックスの欠損変異体も設計した。LvqB4 の結晶構造では D92-R98、K294-M304 の領域が disorder していたため、構造を損なわない程度に柔軟性を低下させられるように L92-S94, R292-G294 を欠損させた変異体 CqsB4 Δ loop を作製した(図 39)。

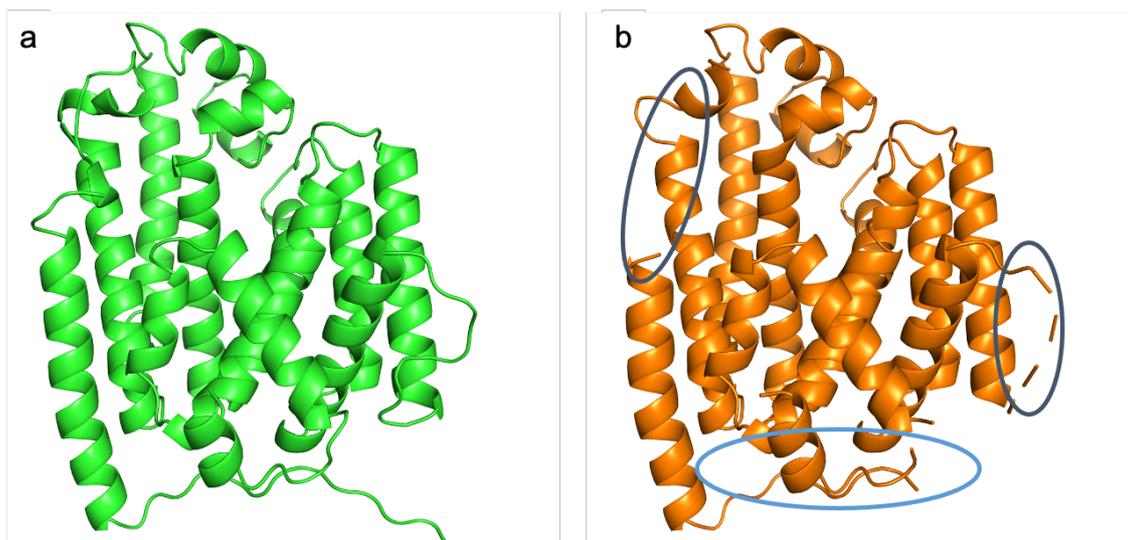


図 39 LvqB4 の結晶構造と CqsB4 の予測構造からみる disorder 領域予測

(a). CqsB4 の予測構造。LvqB4 と同様な位置が特定の構造を持たないループで柔軟性の高い領域だと考えられる。(b). LvqB4 における disorder 領域。円形で囲っている領域が柔軟性の高さから電子密度が確認できなかった部分。

A₀ ヘリックスの欠損変異体については大量発現するものの、可溶性酵素として全く得られなくなった。LvqB4 においては hSQS や SaCrtM と比較して追加されているこのヘリックスの領域は可溶性酵素として発現するために必要なものなのかもしれない。CqsB4 Δloop については問題なく結晶化に適した試料調製ができた。

さらに結晶化の確率を高めるため CqsB4 Δloop の熱安定性を向上させる化合物のスクリーニングを行なった。一般にタンパク質の結晶化において、その熱安定性が向上することで結晶化の成功や、結晶性の向上が期待できるという報告がある。そこで我々は Solubility and stability screening kit を用いて 96 条件、化合物のスクリーニングを行なった。その結果、還元型グルタチオン (GSH) および酸化型グルタチオン (GSSG) の添加、もしくはエチレンジアミン二塩酸塩の添加で CqsB4 Δloop の熱安定性が 5-10 °C 向上することを見出した。エチレンジアミン二塩酸塩はキレート能があり、CqsB4 が金属依存性タンパク質のため、GSH+GSSG を用いることにした。詳細に濃度検討を行い、5 mM GSH+GSSG を添加することで 10°C 熱安定性を向上させることができた(図 40)。

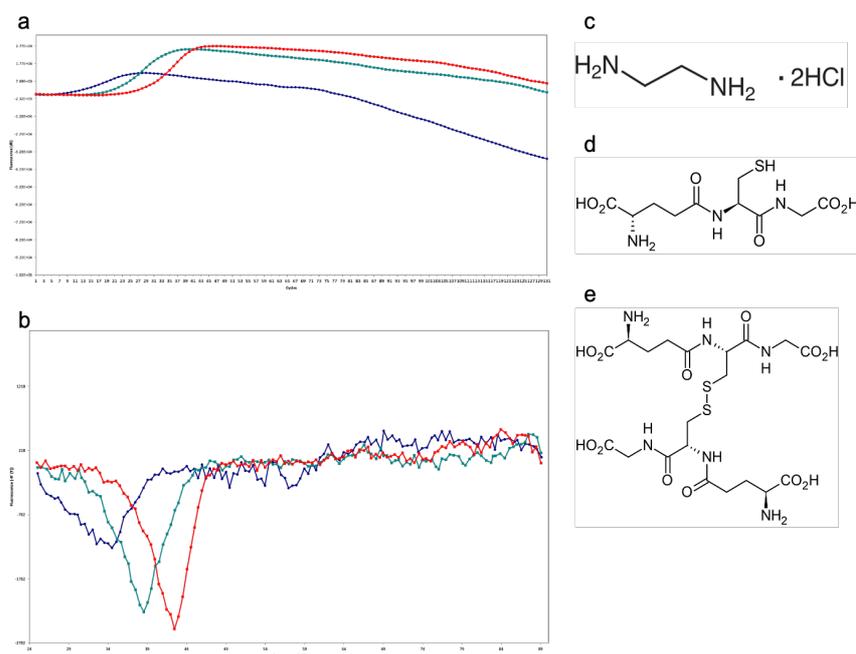


図 40 CqsB4 Δloop に対する Thermal Sift Assay の結果と熱安定化効果を示した化合物

(a). Thermal Sift Assay における Amplification Plots. 青はコントロールとして水、緑はエチレンジアミン二塩酸塩 (EDA) 赤は還元型グルタチオン+酸化型グルタチオン (GSH+GSSG) を添加したもの。(b). Dissociation Curve (c-e). EDA, GSH, GSSG の構造

2-8. 基質非結合型 CqsB4 の結晶構造

結晶化の確率を向上させる欠損変異を導入した CqsB4 Δ loop に熱安定化効果を示す化合物 GSH+GSSG を添加した状態で 500 条件程度結晶化スクリーニングを行った。その結果硫酸アンモニウムとグリセロールを含む条件でタンパク質の結晶と思われるものが得られた。この再現性を確認するため 24 well プレートを用いて結晶化条件の最適化を行なったが、結晶は得られなかった。スクリーニングで得られた結晶は結晶化を行い 1 ヶ月ほど経過した段階で得られたことから、タンパク質溶液に含まれる GSH+GSSG の状態が酸化型によることで結晶が析出したのだと考えられた。

スクリーニングで得られた微結晶を用いて SPring-8 にて X 線回折実験を行なったこと、分解能 2.0 Å で基質非結合型の CqsB4 Δ loop の構造を決定できた(図 41)。

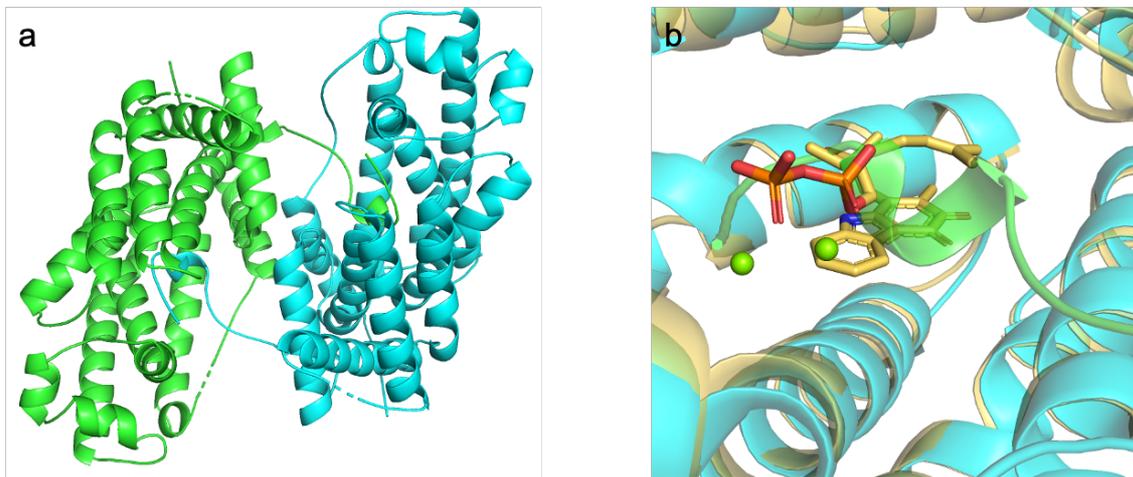


図 41 基質非結合型 CqsB4 Δ loop の結晶構造

(a). 非対称単位中に二分子存在する CqsB4 お互いの活性部位にプロテアーゼ認識部位を収めた構造をしている。(b). LvqB4 とのアライメント。プレニルドナーが配置される部位にヘリックスを形成したプロテアーゼ認識領域が存在している。

本結晶構造は非対称単位中に二分子存在し、His-tag 切除のために付加していた HRV3C 認識領域と Thrombin 認識領域がお互いの活性部位に挿入された状態であった。また、基質非結合型 LvqB4 の構造アライメントから、CqsB4 Δ loop の構造は活性部位を構成する A, B, C ヘリックスに大きな動きが見られた。活性部位にプロテアーゼ認識領域が挿入されていることによるアーティファクトである可能性もある。しかし 2nd アスパラギン酸リッチモチーフを含む F-K ヘリックスはほぼ重なる位置に存在していた。これがアーティフ

アクトである可能性などを考慮するには His-tag を切除した基質結合型 CqsB4 の結晶構造が必要になるだろう。

また、近年その予測構造の精度がめざましい Alpha Fold2 (AF2) による CqsB4 の予測構造ともアライメントを行なった。与えられたモデルは基質非結合型 LvqB4 のモデルにとってもよく一致していた。これらからも今回得られている基質非結合型 CqsB4 Δ loop のモデルは CqsB4 独自のものなのかもしれない(図 42)。

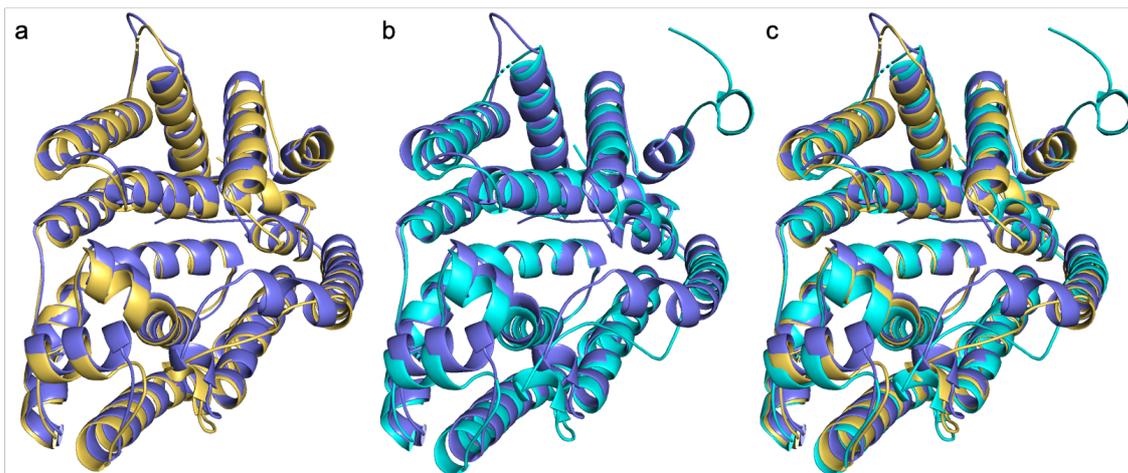


図 42 AF2_CqsB4 と LvqB4 および基質非結合型 CqsB4 の構造アライメント

(a). AF2_CqsB4 (ブルー) と LvqB4 (イエロー) の構造アライメント A-E ヘリックスに動きが見られる。(b). AF2_CqsB4 (ブルー) と基質非結合型 CqsB4 (シアン) の構造アライメント AB-フラップおよび B ヘリックスが非常に動いていた。(c). 3つの構造アライメント 柔軟性の高い AB-フラップ、JK-ループの構造が異なるがほとんどよく重なる位置に存在している。

2-9. CqsB4 の変異体解析

今回得られたモデルの妥当性の検証のため、CqsB4 の変異体解析による詳細な考察を行なった。LvqB4 の活性測定と同様に基質周辺の相互作用をしていると予測される残基について Ala 置換体を作製し、LC/MS による分析を行なった。その結果、アスパラギン酸リッチモチーフへの変異については活性が消失した。しかし、AB フラップに存在する R34 および hSQS, SaCrtM, LvqB4 においてその機能が未知な Q187 については Ala 変異を導入しても活性の減少が確認できなかった。R34 については結晶構造から AB フラップを構成するヘリックス全体が大きく動いているためリン酸基との相互作用ができなくなったためだと考えられる。活性測定に用いている CqsB4 は野生型であるため、今回得られた結晶構造と矛盾しない結果が得られている。Q187 については CqsB4 の活性部位を構成する 1st A

スパラギン酸リッチモチーフを含むヘリックス C の動きによってその空洞が少し広がったことによるものである可能性がある。

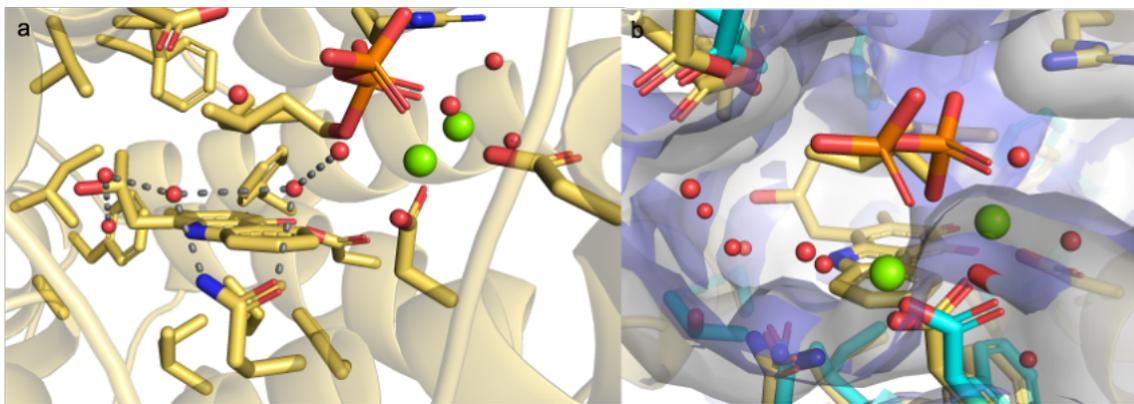


図 43 LvqB4 における水分子クラスターの形成と CqsB4 との比較

(a). LvqB4 (イエロー) における Q188 が水分子クラスターの支柱のように機能し水分子で壁を作ることで PCQ の配置を制御している様子が確認できる。(b). LvqB4 (イエロー) の活性部位内部の surface モデル。CqsB4(ブルー)においても水分子クラスターが存在する位置は空洞になっている。

LvqB4 において Q188 が周辺の水分子と水素結合ネットワークを形成し、水分子クラスターを構築することで壁のような役割を担っていることが観察できた(図 43)。Q188A ではこの相互作用がなくなってしまう、PCQ の配置を厳密に設定することができなくなってしまうため活性が消失したのだと考えられる。CqsB4 においても水分子がクラスターを作る領域は空洞になっているが、Q187A の活性は減少しない。hSQS や SaCrtM においても詳細にこの位置にグルタミン残基の役割が明らかにされていないので、酵素それぞれが独自の性質によってこの残基を使い分けている可能性がある。

2-10. PCQ 結合型 CqsB4 Δ loop の結晶構造解析

CqsB4 Δ loop の基質非結合型結晶構造において、プロテアーゼ認識領域が活性部位に挿入されていたことから、His-tag を HRV3C 処理することで切除した CqsB4 Δ loop を用いて結晶化スクリーニングを行なった。また、precarquinostatin, DMSPP をタンパク質に対して 5 当量加えた共結晶化を試みた。500 条件程度スクリーニングした結果、沈殿剤としてポリエチレングリコール (PEG) を含むいくつかの条件で CqsB4 と思われる結晶が得

られた。これについて、X線回折実験を行なった。その結果、PCQのみが結合したCqsB4 Δ loopの構造を1.7 Åで決定できた(図44)。

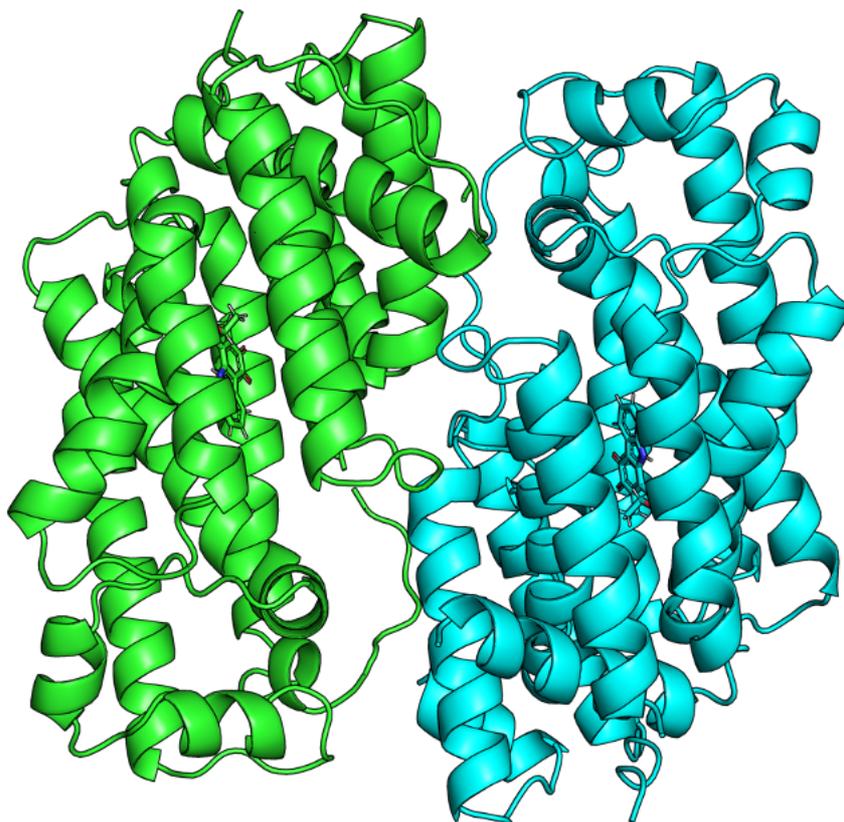


図 44 PCQ 結合型 CqsB4 Δ loop の結晶構造

非対象単位中に二分子存在しており、Chain A を緑で、Chain B を青で示している

活性部位をお互いの分子が塞ぎ合うように分子が存在しており、これにより DMSPP が結合できなかったのではないかと考えられる。また、LvqB4 との構造を比較した結果、基質非結合型 CqsB4 Δ loop と同様に活性部位の残基はほとんど一致していた。

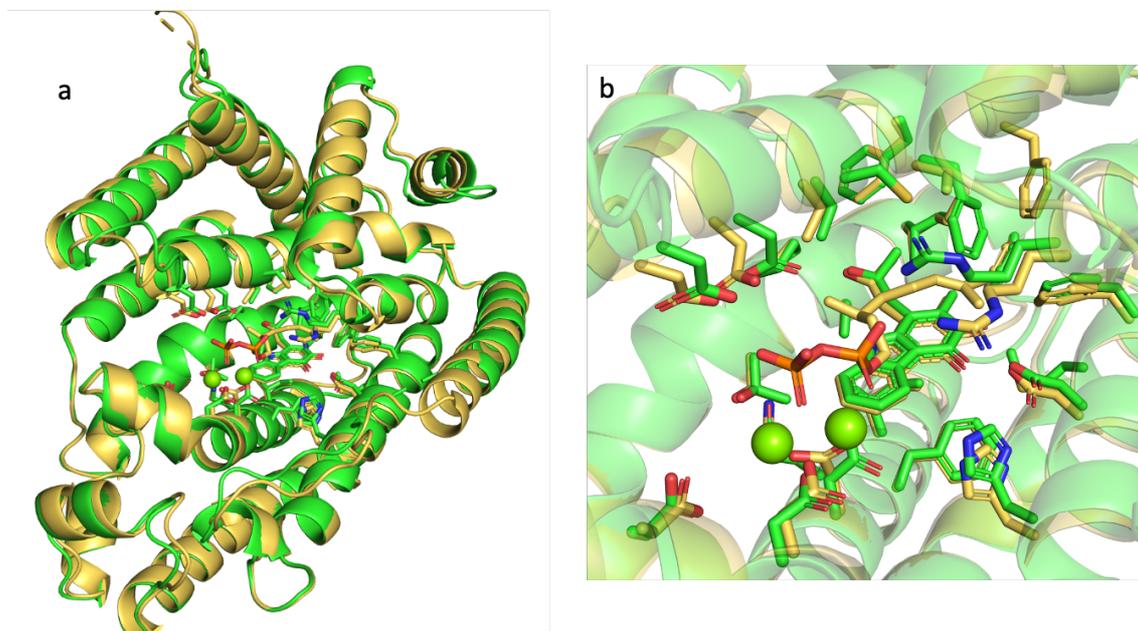


図 45 (a). LvqB4 (黄色) と CqsB4 Δ loop (緑) の重ね合わせの構造 (b). 基質結合部位周辺の拡大図

今回の PCQ 結合型 CqsB4 Δ loop の構造と基質非結合型 CqsB4 Δ loop の構造のみでは (図 36) に示すような LvqB4 と CqsB4 のそれぞれの変異体における活性の違いを生み出すメカニズムについては明らかにできない。しかし、プレニルドナーの特異性を生み出すメカニズムについては推定することができた。図 45 の構造アライメントより、LvqB4 における、I54, A58 に相当するアミノ酸残基は CqsB4 では F53, C57 になっていた。LvqB4 の I54, A58 は、プレニルドナーの底部に位置しており、疎水的な相互作用によりその配置を決定している要因であると考えられる。これが F53, C57 になることで、アミノ酸側鎖の嵩高さがますことで、CqsB4 においては、DMAPP をプレニルドナーとして認識し、LvqB4 では CLPP や GPP を認識しているのだと考えられる。

また、今回 his-tag を切除することで CqsB4 Δ loop の PCQ 結合型構造が解明できた。この結果から、野生型でも CqsB4 Δ loop の結晶化の際に用いた結晶化バッファーを用いれば結晶化に成功するのではないかと考えた。そこで、生成した野生型 CqsB4 を HRV3C で His-tag を切除したのち、ゲルろかクロマトグラフィーで単分散な状態であることを確認し、CqsB4 Δ loop の結晶化バッファー [50 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl, 10 % (v/v) glycerol, 5 mM GSH+GSSG, 5 mM DTT, 50 mM MgSO₄] へ置換し、タンパク質濃度 10

mg/mL で、PCQ および DMSPP を 5 当量添加し、500 条件程度結晶化スクリーニングを行なった。その結果、いくつかの条件で結晶が得られたが、構造解析に適した十分な大きさの結晶に成長する最適な結晶化条件を見出すことができなかった。今後添加剤の検討や、結晶化条件の最適化を行うことで、野生型 CqsB4 の酵素-基質三者複合体結晶構造が明らかになるだろう。

実験手法

2-11. CqsB4, LvqB4 の発現および精製

組換え CqsB4 および LvqB4 を発現させるプラスミドはそれぞれ *S. exfoliatus* 2419-SVT2 株および *Streptomyces* sp. FGK858 株のゲノムから PCR によって増幅した遺伝子から構築された。目的領域を増幅させて得られた PCR 産物を pT7Blue T-vector (Novagen) にライゲーションし、その配列を確認した。これらの遺伝子を pHis8 ベクターの Bam HI および Hind III 部位に挿入し、得られたプラスミドを pHis8-cqsB4, pHis8-lvqB4 と命名した。構築された発現ベクターは東京大学農学部の葛山智久教授から提供してもらった。

CqsB4 および LvqB4 の大量発現手法はどちらも同じで、大腸菌 BL21(DE3) 株を発現プラスミドで形質転換した。形質転換体は 50 µg/mL の kanamycin (Kana) を含む LB 寒天培地に塗布し 37 °C で一晩静置培養した。翌日に得られたコロニーを 1 つ、50 µg/mL Kana を含む LB 液体培地 10 mL で 37 °C で一晩振盪培養した。菌体の増殖が確認できたら 50 µg/mL Kana を含む TB 液体培地 100 mL / 500 mL フラスコに 1 mL 加え、37 °C で細胞密度が 0.4 (600 nm での光学濃度) になるまで振盪培養した。0.1 mM isopropyl-β-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加することで遺伝子の発現を誘導し、18 °C で 16 時間振盪培養した。その後培養液を 4 °C で 7,790 g、15 分間遠心して細胞を回収した。

Se-Met 置換体 LvqB4 の発現にはメチオニン要求株を用いない手法を採用した。前培養までは通常発現手法と同様に行なった。前培養菌体を 7,790g、5 分間遠心して細胞を回収し、150 mM NaCl に懸濁した。懸濁した菌体を 100 倍希釈となるように 50 µg/mL Kana を含む最少栄養培地 [(10 × 最少培地: Na₂HPO₄ 70 g, KH₂PO₄ 30 g, NaCl 5 g/1 L), (最少栄養溶液組成: Thiamine 40 mg, Biotin 40 mg, Adenosine 40 mg, Guanosine 40 mg, Cytidine 40 mg, Thymidine 40 mg, 10 mM FeCl₃ 0.66 mL, 1 M MgSO₄ 2 mL, 50 mM MnCl₂ 2 mL/1.76 L), (最少栄養培地組成: 最少栄養溶液 1.76 L, 10 × 最少培地 200 mL, 20 % (w/v) Glucose 40 mL, 20 % NH₄Cl, 1 M CaCl₂ 2 mL), 2 L / 3 L フラスコ] に植菌し 37 °C で振盪培養した。細胞濃度が 0.3 になった時点で 100 mg/mL L-Lys 2 mL, 10 mg/mL L-Phe, 50 mg/mL L-Thr 4 mL,

10 mg/mL, L -Ile 10 mL, 10 mg/mL L -Leu 10 mL, 10 mg/mL L -Val 10 mL, 10 mg/mL, Se-Met 12 mLを加え、再度37 °Cで振盪培養し、細胞濃度が0.7の時点で1 mM IPTGを添加し遺伝子の発現を誘導した。18°Cで24時間振盪培養し、培養液を4 °Cで7,790 g、15分間遠心して細胞を回収した。回収した菌体は使用するまで-80 °Cで保存した。

LvqB4 を発現させた菌体を培地 100 mL あたり 10 mL の buffer A (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM imidazole, 150 mM NaCl, 50 mM MgSO₄, 10 % (v/v) glycerol) で懸濁し、懸濁液に 1000 倍希釈となるように 5 mg/mL Sm2 nuclease を添加した。氷上で超音波破碎を行い、38,900 g で 20 分間 4 °Cで遠心分離することで細胞片などの粒子を除去し、上清を回収した。あらかじめ buffer A で平衡化された Ni-NTA カラムにアプライした。10 mM Imidazole, 0.1 % Tween20 を加えた buffer A でカラムを洗浄したのち、250 mM Imidazole を加えた buffer A でカラムに吸着した酵素を溶出した。体積が 1 mL となるまで 30 kDa cut-off Amicon Ultra-15 で濃縮し、buffer A であらかじめ平衡化された HiLoad Superdex 200 16/600 カラムでゲルろ過精製を行なった。精製した試料を再度濃縮し、buffer B (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 250 mM MgSO₄, 5 mM DTT, 10 % (v/v) glycerol) に置換し、タンパク質濃度 20 mg/mL に調製し、-80 °Cで使用するまで保存した。Se-Met 置換体 LvqB4 も同様な方法で精製し、buffer C (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 50 mM MgSO₄, 5 mM DTT, 10 % (v/v) glycerol) に置換し、タンパク質濃度 20 mg/mL に調製して-80 °Cで使用するまで保存した。タンパク質濃度は nano drop protein280 モードで測定した。Se-Met 置換体 LvqB4 も同様な手法で精製した。

CqsB4 を発現させた菌体も LvqB4 と同様に buffer D (50 mM Kpi pH8.0, 500 mM NaCl, 20 % (v/v) glycerol, 5 mM Imidazole, 5 mM GSH) に懸濁し、超音波破碎を行い遠心して上清を回収した。あらかじめ buffer D で平衡化された Ni-NTA カラムにアプライした。10 mM Imidazole, 0.1 % Tween20 を加えた buffer D でカラムを洗浄したのち、250 mM Imidazole を加えた buffer D でカラムに吸着した酵素を溶出した。体積が 1 mL となるまで 30 kDa cut-off Amicon Ultra-15 で濃縮し、buffer D であらかじめ平衡化された HiLoad Superdex 200 16/600 カラムでゲルろ過精製を行なった。

His-tag を切除した CqsB4 は Ni-NTA カラムから溶出した CqsB4 に対して濃度が 1:10 となるように HRV3C プロテアーゼを添加し、セロハンバックに入れて buffer E (50 mM Kpi pH8.0, 500 mM NaCl, 20 % (v/v) glycerol, 5 mM GSH) で 4 °C, 一晚透析を行なった。翌日これを回収し、あらかじめ buffer D で平衡化された Ni-NTA カラムにアプライしたのち、素通り画分を回収した。体積が 1 mL となるまで 30 kDa cut-off Amicon Ultra-

15 で濃縮し、ゲルろ過精製に用いた。精製された CqsB4 は buffer f (50 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl, 10 % (v/v) glycerol, 5 mM GSH+GSSG, 5 mM DTT) に置換し、タンパク質濃度 20 mg/mL で調製し、使用するまで -80 °C で保存した。

2-12. LvqB4/CqsB4 の熱安定化化合物スクリーニング

当初、LvqB4 は高純度に調製できるものの精製後に凝集しやすい傾向にあった。そこで結晶化の成功率を高めるために LvqB4 に対して熱安定化効果を示す化合物のスクリーニングを行なった。リアルタイム PCR の装置を用いて、蛍光物質 (SYPRO orange) を添加し、蛍光強度の変化を追跡する手法である。この物質は疎水的な環境に囲まれると傾向を示す特徴がある。タンパク質は変性すると内部の疎水性領域が露出するので徐々に熱負荷をかけることで変性温度を測定することができる。この手法では温度を横軸にとり、蛍光値を縦軸にとることで変性曲線をプロットし、それを微分して負の一次導関数を算出することで傾きの最大値を変性温度 T_m 値として定義する。

T_m 値の測定に最適なタンパク質濃度 (0.75 mg/mL) を検討したのち、Solubility and Stability Screen HT kit を用いたスクリーニングを行なった。その結果、スペルミン、アルギニンアミド、アルギニンエチルエステル、硫酸マグネシウムで LvqB4 の熱安定性が 3 °C 程度上昇した。MgSO₄ の濃度のさらなる検討を行った結果、500 mM MgSO₄ で最大 5 °C の熱安定性の向上が確認できた。また、プレニルアクセプターである PCQ を添加することで 5 °C 追加で熱安定性を向上させることができた。

同様な手法で野生型 CqsB4 の熱安定化化合物もスクリーニングした。意外にも CqsB4 では MgSO₄ では熱安定化効果を示さなかった。一方で MnCl₂ を添加すると熱安定性が 4 °C ほど上昇した。CqsB4 の金属依存性は Mn²⁺ では活性を示さないため、DMAPP を用いた結晶化を行えると期待されたが、親和性がそれほど高くないためか、結晶化剤との金属塩の析出が激しいため、用いることができなかった。次に CqsB4 Δ Δ でも熱安定性測定を行なった。その結果、GSH+GSSG を添加することでさいだ 10 °C 熱安定性を構造させることができた。濃度検討を行い、結晶化溶液として用いる際の最適濃度を決定した。

2-13. 基質非結合型・基質結合型 LvqB4 の結晶化

実験開始時点では PCQ の調製ができていなかったため、熱安定化効果を示した MgSO₄ のみを添加し、基質非結合型 LvqB4 の結晶化スクリーニングを行なった。約 600 条件程度スクリーニングした結果、15 mg/mL LvqB4 (360 μM), 4 °C で 0.1 M HEPES pH7.0,

20 % MPD を含む条件で LvqB4 と思われる結晶が得られた。この条件を詳細に検討したが、X 回折実験に適した単結晶を得ることができなかった。PCQ の調製が共同研究先でできたので提供してもらい、LvqB4+PCQ のプレニルアクセプター結合型で結晶化スクリーニングを再度実施した。400 条件程度スクリーニングした結果、20 mg/mL LvqB4 (480 μ M), 4 °C で 20 % PEG3,350 を含む条件で良質な単結晶が得られた。一般にタンパク質の結晶化は蒸気拡散法によって作成するため、タンパク質溶液+結晶化溶液を混合すると結晶化溶液側に水分が蒸気として移動するが、LvqB4 の結晶化の場合、理由は不明だがタンパク質溶液側に水分が移動し、沈殿剤濃度が極めて薄い状態で結晶化されていた。回折実験に用いる際、結晶を凍結する時に水分による氷の結晶の形成を防ぐためクライオプロテクタントに浸漬して凍結を行うが、LvqB4 の場合、クライオプロテクタントとして利用可能な濃度の沈殿剤にすぐに浸漬すると結晶の溶解が確認できた。そのため、10 % PEG3,350 => 15 % PEG3,350 => 20 % PEG3,350 => 25 % PEG3,350 と、段階的に浸漬するステップソーキング法を用いる必要があった。またこのステップソーキング溶液にプレニルドナーアナログである CPP 溶液を添加することで、酵素-基質三者複合体結晶を調製した。ステップソーキング溶液に 5 mM CPP となるように添加した。これらを結晶に瞬間的に浸漬し、クライオストリームを用いて 100 K の窒素ガス気流下で瞬間的に凍結させ、液体窒素下で保存した。

Se-Met 置換体の結晶構造 (基質非結合型) は初期スクリーニングで得られていた MPD を用いた結晶化条件を使用して単結晶化を試みた。L-Arg や L-Lys などをタンパク質溶液に添加することでその結晶性が向上するという報告があるため、これを試みた。詳細に条件を検討した結果、200 mM L-Arg を含むタンパク質溶液を用いることで X 線回折実験に使用できる単結晶が得られた。基質結合型と同様にクライオストリームを用いて 100 K の窒素ガス気流下で瞬間的に凍結させ、液体窒素下で保存したのち、X 線回折実験に用いた。

2-14. 基質結合型 LvqB4, Se-Met 置換体 LvqB4 の回折データの収集、構造決定

回折データの収集は SPring-8 のビームライン (BL) BL32XU、BL41XU を利用し、100 K の窒素ガス気流下で実施した。回折データの integration と scaling には XDS パッケージもしくは CCP4 パッケージの pointless、及び aimless を使用した。LvqB4 の初期位相は Se-Met 置換体 LvqB4 の結晶を用いて Se 原子の吸収端近傍である 0.97909 Å の X 線を用いてデータセットを収集し、単波長異常分散法 (SAD) を利用することで決定した。

	substrate non binding form	substrate binding form
	Se-SAD data	High resolution data
Data Collection		
Protein	LvqB4	LvqB4
Beam source	BL41XU (SPring-8)	BL41XU (SPring-8)
Wavelength (Å)	0.97909	0.999999
Resolution range (Å)	49.24 - 1.908 (1.977 - 1.908)	45.69 - 1.71 (1.771 - 1.71)
Space group	P2	P21
Unit cell parameter	a = 74.33, b = 70.03, c = 88.30 (Å) α = γ = 90, β = 111.23 (°)	a = 63.24, b = 71.39, c = 83.89 (Å) α = γ = 90, β = 109.91 (°)
Total reflections	770306 (65953)	404065 (24352)
Unique reflections	65557 (6220)	62675 (4766)
Multiplicity	11.8 (10.6)	6.4 (5.1)
Completeness (%)	96.38 (87.64)	95.91 (73.45)
Mean I/sigma(I)	9.53 (1.76)	10.20 (2.44)
Wilson B-factor	30.94	19.17
Rmerge (%)	0.5679 (4.163)	0.2285 (0.5091)
Rmeas (%)	0.5917 (4.373)	0.2478 (0.5658)
CC1/2	0.932 (0.255)	0.714 (0.811)
Refinement		
Rwork / Rfree	0.1763 / 0.2142	

2-15. CLPP とのドッキングシミュレーション

リガンドモデルの作製は Chem3D (Ver.19.0) で行い、構造精密化は Chem3D パッケージの Molecular Mechanics (MM) 2 計算法で行なった。Auto Dock Tools (Ver1.5.6) を使用して各 PDBQT ファイルを作製したのち、Webina (<https://durrantlab.pitt.edu/webina/>) にて Web 上でドッキングシミュレーションを実施した。プレニルドナーが Mg²⁺ に結合できるようにグリッドボックスを設定し、そのほかのパラメータはデフォルトで行なった。

2-16. LvqB4/CqsB4 の活性測定

LvqB4/CqsB4 の活性測定は Reaction mixture (100 μL) 中に 100 mM Tris-HCl pH8.0, 50 mM MgSO₄, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM GPP/DMAPP, 0.25 mM PCQ, 1.25 μg

LvqB4/CqsB4, 1 mM TCEP で 3 分、30°Cで反応し、100 μ L MeOH を添加し反応をクエンチしたのち LC/MS にて分析した。

また、還元剤として TCEP と NADPH を PCQ 溶液に加えた場合の PCQ の UV-Vis を経時変化を確認したとこと、NADPH ではスペクトルの変化が確認できなかったため TCEP を採用した。

2-17. CqsB4 の結晶化

CqsB4 の結晶化は野生型については熱安定化効果を示した化合物を様々な濃度で添加し、基質結合型の結晶化スクリーニングを行なった。約 5,000 条件程度スクリーニングした結果タンパク質の結晶は得られなかった。基質非結合型 CqsB4 $\Delta\Delta$ においては 5 mM GSSG+GSH を添加して 1,000 条件程度スクリーニングを行なった。その結果 20 mg/mL CqsB4 (480 μ M), 20 °Cで 20 % Glycerol および 2.2 M 硫酸アンモニウムを含む条件で良質な単結晶が得られた。再現性が取れなかったため得られた結晶をクライオストリームによって 100 K の窒素ガス気流下で瞬間的に凍結させ、液体窒素下で保存し実験に用いた。PCQ 結合型 CqsB4 $\Delta\Delta$ の結晶化は 5 mM GSSG+GSH に加えて 50 mM MgSO₄ をタンパク質溶液に含有させることで作成した。His-tag を切除した CqsB4 $\Delta\Delta$ の結晶化スクリーニングを 5,00 条件程度行なった。その結果、PEG3,350 を含むいくつかの条件で結晶が得られた。それぞれ結晶が得られた条件を詳細に検討し、結晶化条件を最適化した。また、プレニルドナーである DMSPP を 5 mM 添加した条件でも良質な単結晶が得られていた。これらをクライオストリームによって 100 K の窒素ガス気流下で瞬間的に凍結させ、液体窒素下で保存し実験に用いた。

2-18. 回折データの収集

回折データの収集は SPring-8 のビームライン (BL) BL32XU、BL41XU を利用し、100 K の窒素ガス気流下で実施した。回折データの integration と scaling には XDS パッケージもしくは CCP4 パッケージの pointless、及び aimless を使用した。

	substrate non binding form	substrate binding form
	high resolution data	High resolution data
<hr/> <i>Data Collection</i> <hr/>		
Protein	CqsB4	CqsB4 + PCQ
Beam source	BL41XU (SPring-8)	BL41XU (SPring-8)
Wavelength (Å)	1.00000	0.999999
Resolution range (Å)	41.04 - 2.0 (2.071 - 2.0)	44.84 - 1.73 (1.792 - 1.73)
Space group	P 43 21 2	P 21 21 21
Unit cell parameter	a = 69.65, b = 69.65, c = 304.74 (Å) $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	a = 73.26, b = 85.25, c = 113.40 (Å) $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Total reflections	103757 (10152)	149144 (14623)
Unique reflections	51977 (5078)	74583 (7314)
Multiplicity	2.0 (2.0)	2.0 (2.0)
Completeness (%)	98.91 (99.92)	99.76 (99.36)
Mean I/sigma(I)	13.40 (0.99)	12.43 (0.63)
Wilson B-factor	42.12	32.02
Rmerge (%)	0.02604 (0.5948)	0.02669 (0.8983)
Rmeas (%)	0.03682 (0.8412)	0.03775 (1.27)
CC1/2	1 (0.878)	1 (0.867)
<hr/> <i>Refinement</i> <hr/>		
Rwork / Rfree	0.236 / 0.260	0.251 / 0.281

3章 ラダラン脂質生合成における鍵酵素と推定されるラジカル SAM 酵素の結晶化に向けた試料調製および結晶化スクリーニング

緒言

3-1. アナモックス菌のラダラン脂質生合成経路

アナモックス菌が生産するラダラン脂質は3つまたは5つのシクロブタン環が連なった歪みの大きな梯子状疎水基を有する脂質である。この歪みの大きさから高エネルギー密度ジェット燃料としての有用性が提案されている。ラダラン脂質の生合成経路の全容は未解明であるが、初めてゲノムが解読された *K. stuttgartiensis* からその生合成に関与すると推定されている34の候補遺伝子が特定されている⁵⁰。これらはクラスター化されており、一部もまたは全ての遺伝子がラダラン脂質生合成に関与している可能性が存在する⁴⁸。現在、ラダラン脂質をカーボンニュートラルな燃料として利用する際の課題として、その生合成経路の全容解明が必須である。いくつかの有機合成例が報告されているが、ステップワイズな反応であり、スケールアップには適していないことが報告されている¹¹⁵。また、シクロブタン環が複数連なった梯子状疎水基の酵素による構築の反応例は既知の酵素反応の中でも前例がない。序論でも述べたように、通常は脂肪酸の生合成に関与しない遺伝子がコードする酵素によって直鎖の飽和脂肪酸を基質として、ラダラン脂質が生合成される経路が提案されている。その経路においてコバラミン依存性ラジカル SAM 酵素が環化反応によってシクロブタン環を形成する機構が提案されている。この可能性について本節では Jawsamycin 生合成機構と現在計算科学的に提案されている新たなラダラン脂質生合成経路を取り上げ概説する。

Jawsamycin (図 46) は抗真菌剤として *Streptoverticillium fervens* HP-891 から単離された化合物で、ポリシクロプロパンを含む。

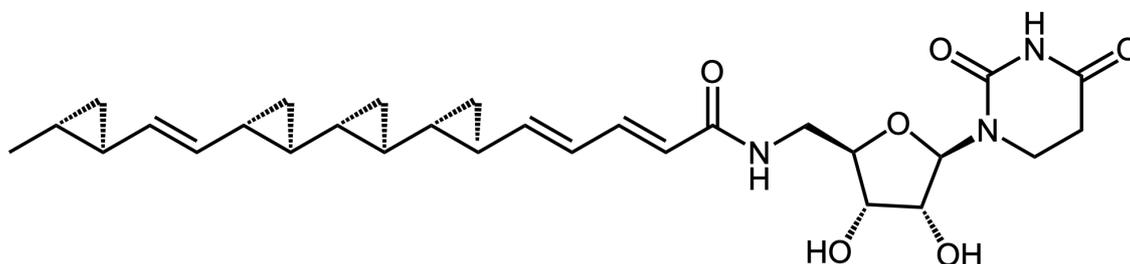


図 46 Jawsamycin

脂肪酸部分のシクロプロパンは全て同じ立体化学を有しており、同位体標識した前駆体を用いた実験からその脂肪酸骨格は共通のポリケチド経路で構成され、シクロプロパン

部位のメチレン基はL-メチオニン由来であることが、アミノヌクレオシド単位はジヒドロウリジンに由来することが示された。また Jawsamycin 生合成遺伝子クラスターの同定と異種発現系の構築、それぞれの酵素の機能解析が試みられた。Jawsamycin 推定生合成遺伝子クラスターは 14 kbp に渡って存在しており、転写調節因子をコードする ORF *jaw3*, *jaw9* を含む九つのオープンリーディングフレームによって構成されていた。*jaw2* が N-アセチルとランスフェラーゼと相同性を示すタンパク質をコードしていることからポリケチド鎖の縮合を担うことが推定された。*jaw4*, *jaw6* が KS-AT-DH-ACP ドメインを含む反復型 PKS と単独の KR をコードしているため、ポリケチドの骨格を構築していると考えられている。そして *jaw5* がラジカル SAM 酵素をコードしており、これがシクロプロパン環の挿入を担っていると提案された。また遺伝子群をバイオインフォマティクス解析したところ、チオエステラーゼをコードする遺伝子が存在しなかったため、*jaw2* による ACP 結合ポリケチド鎖との縮合が支持された。基質アナログを用いた生化学解析結果より Jaw2 は幅広い種類のアシル基質を認識できることを明らかにしていた。*jaw4*, *5*, *6* を異種発現させるとシクロプロパン化ポリケチドが得られるかを検証していた。*S. lividans* を形質転換することで *jaw2*, *4*, *5*, *6* 二重形質転換体と *jaw4*, *5*, *6* 単一形質転換体を作成し、基質を加えた摂食実験を行ったところ、二重形質転換体のみで Jawsamycin が生産された。これにより Jaw2, *4*, *5*, *6* が協奏的に反応することでシクロプロパンユニットを構築しているという仮

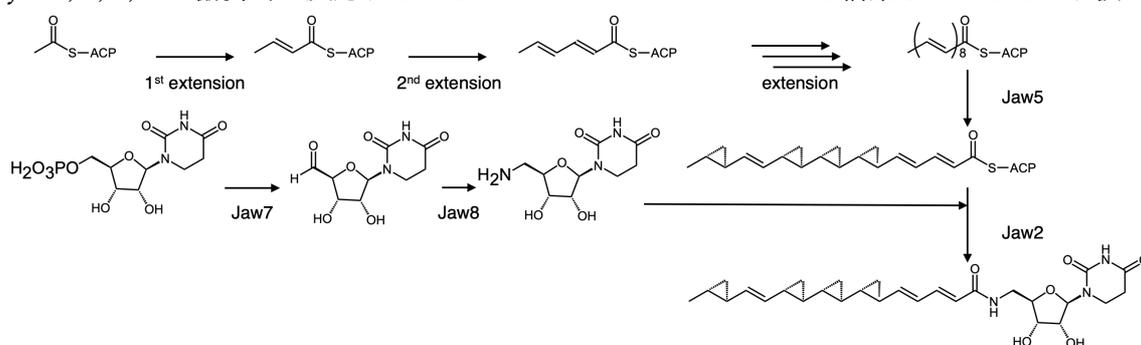


図 47 推定 Jawsamycin 生合成経路

ACP に結合したアシル側鎖が伸張し Jaw5 によってシクロプロパンが挿入される経路が提案されている。

説が実験的に支持された(図 47)。

このように脂肪酸生合成にラジカル SAM 酵素が作用することで不飽和ポリケチドへの環状構造の挿入例がある。しかし、シクロブタン環の形成はエネルギー的に不利であるという提案から、近年オリゴシクロプロパンがラダラン脂質前駆体であるという計算化

学の報告も存在する。この報告によるとラジカル SAM 酵素による飽和脂肪酸へのシクロプロパン環の挿入が起きたのち、不飽和化酵素による梯子状疎水基の構築がエネルギー的には起きやすいと提案されている。ラジカルカチオンを利用する経路やジラジカル、カルボカチオン経路などがそれぞれ詳細な量子計算により考察されていた。その結果として、プロトン化によりシクロプロパンが活性化されたのちにラジカル SAM 酵素による水素原子の引き抜きをトリガーとするハイブリッドメカニズムが最も合理的であると提案されていた。シクロプロパン脂肪酸は多くの種類の細菌のリン脂質に存在することが知られているため、これが前駆体となる経路もありえるかもしれない(図 48)。

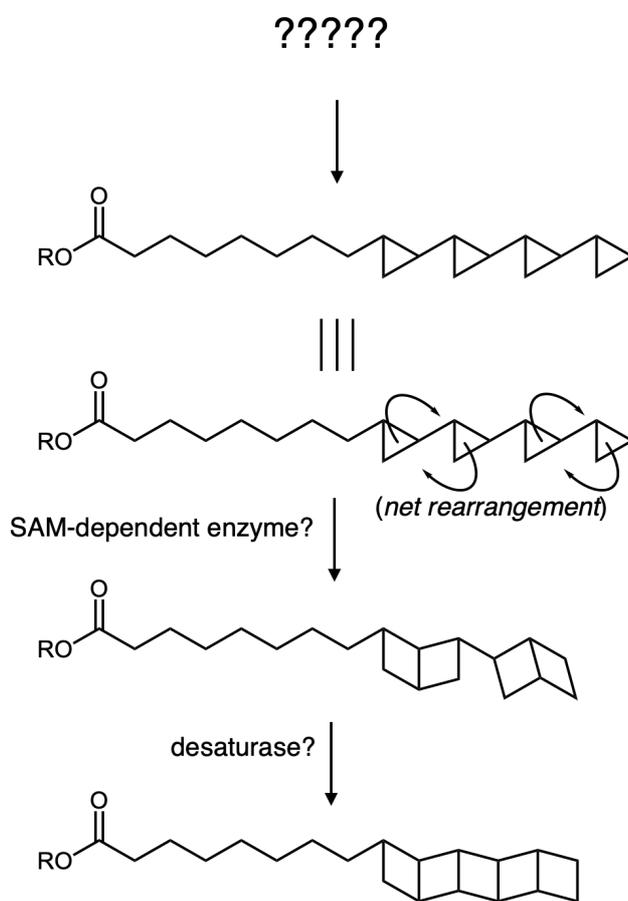


図 48 計算化学により新たに提案されているラダラン脂質生合成経路

しかしこれまでに提案されている多価不飽和脂肪酸を前駆体とする経路であってもその中間体などが検出されていないため実験的にラダラン脂質生合成経路を明らかにする必要がある。生育が極めて遅い微生物でありながらハウスキーピングな酵素の活性が著しく高く中間体が全く検出されない可能性は低いと考えている。多価不飽和脂肪酸が前駆体であれば抽出などの段階で酸化を受けやすいポリエンが反応して別の化合物になったのかも

しれない。しかし、それほど反応性の高くないシクロプロパン環が挿入された化合物はこれまでアナモックス菌の脂質分析の報告からも存在しない。これらの経路が実際に起きているのか、それともさらに未知のメカニズムでラダラン脂質が生合成されているのか、ラダラン脂質の全容解明に注目が集まっている。次節では環化反応を担うとされているラジカル SAM 酵素について環化反応を担う他の酵素を交えて概説する。

3-2. ラダラン脂質推定鍵酵素であるラジカル SAM 酵素

ラジカル SAM 酵素は生物界に約 11 万種以上存在するとされている、アデノシルコバラミン (AdoCbl) 依存性酵素に類似したラジカル反応を触媒する酵素スーパーファミリーである¹¹⁶。ラジカル SAM 酵素および AdoCbl 依存性酵素には共通して 5'-デオキシアデノシルラジカル (5'-dA \cdot) を用いる機構が存在している。しかしこれは酸化性が高く非常に不安定な中間体であるためにこれまでに実験的に直接観察された報告はない¹¹⁷。ただし、アリルアデノシルメチオニンなどを用いた分光学的解析^{118,119}から示されており、5'-デオキシアデノシンの C5'位への放射線標識同位体を用いた解析によって間接的に実証されている¹²⁰。また AdoCbl 依存性酵素はコバラミンの Co-C5'結合のホモリシスを介した 5'-dA \cdot の生成を行うが、ラジカル SAM 酵素ではより単純な補因子である S-アデノシルメチオニンを用いてラジカルの生成を行う。ラジカル SAM 酵素スーパーファミリーは細菌、古細菌、真核生物の全ての生物が保持しており、リボヌクレオチド還元や補因子生合成など、基本的な生物学的プロセスに関与していることから、進化の観点からも非常に興味深い対象として知られている。その具体的な反応メカニズムはスーパーファミリーに今日つしている^{121,122}。アミノ酸配列に特徴があり、ラジカル反応の開始に重要な補因子である [4Fe-4S] クラスターが配位するための CxxCxx ϕ C モチーフ (x は任意のアミノ酸、 ϕ は芳香族アミノ酸) が存在する。このシステインリッチなモチーフで [4Fe-4S] クラスターの 3 つの鉄をライゲーションし、空隙の鉄に SAM が配位する。外部の電子供与体から [4Fe-

4S]が還元されることで活性型となり、SAM への電子供与によって還元的開裂を引き起こすことが 5'-dA \cdot 生成メカニズムであると推定されている(図 49)。

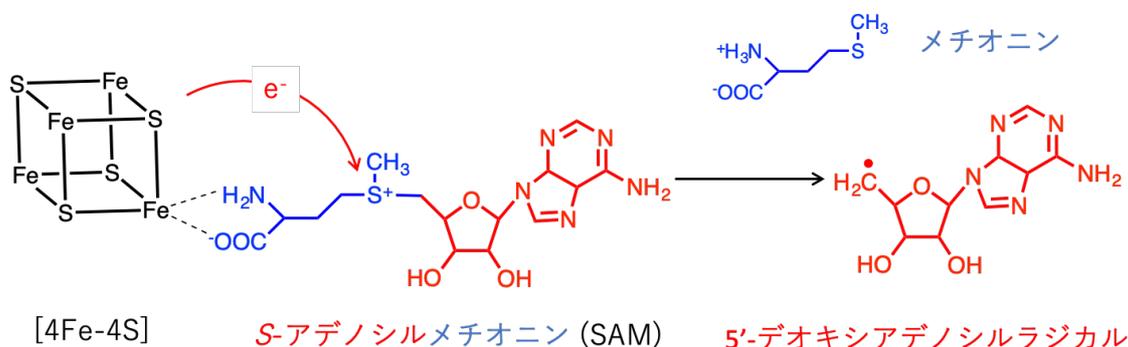


図 49 ラジカル SAM 酵素のラジカル生成機構

また、近年、ラジカル SAM 酵素および AdoCbl 依存性酵素において、ラジカル生成メカニズムに対する新たな分光学的知見が得られている¹²³。この報告ではどちらの高度においても反応中に形成される触媒能力の高い Ω 有機金属中間体が観測されている。これらはよく研究されているラジカル SAM 酵素の EPR/ENDOR 観測によってアノテーションされた。それぞれの分光学的解析によって、還元的開裂を引き起こした SAM、および AdoCbl のアデノシル基が Fe-C5', Co-C5' の有機金属錯体を形成していると推定された。これによりこれまで推定されていたラジカル SAM 酵素の還元的開裂による 5'-dA \cdot の直接の生成による基質からの H 原子の引き抜きによる開始機構ではなく、 Ω 中間体を形成したのちに Fe-C5' のホモリシス開裂によるものであり、ラジカル SAM 酵素スーパーファミリーにおけるラジカル開始機構のパラダイムシフトであると提案されている¹²³。

これまでの研究で多くのラジカル SAM 酵素についての分光学的解析や機能解析が行われ、いくつかの酵素ではその X 線結晶構造解析も報告されている^{124,125}。しかし、大部分が未解明であり、重要な問題が残っている。5'-dA \cdot の制御機構は特定のメカニズムを共有しているのか、それとも個々の酵素が触媒する反応や結合する気質の違いに応じて変化するのか。これらはその結晶構造などからでも明らかにできない。また基本的には同じコアフォールドを持つにもかかわらず、どのように非常に多くの異なるタイプの化学反応を触媒できるように進化してきたのか、ラジカル生成後の各酵素の詳細なメカニズムなど多くの疑問が残されている。これは酵素が酸素感受性で非常に *in vitro* の実験系の再構成が困難である理由となっている。

また生体内では反応性の高いラジカルは細胞内では悪影響を及ぼしやすいことで知られているにも関わらず、これを厳密に制御し、特定の反応を触媒するこの酵素は真核生物、

細菌、古細菌のドメインそれぞれに幅広く分布し、様々な代謝物の生合成経路に関与している。中でも C-C 結合の形成は補酵素や天然物の形成において頻繁に見られ、重要なステップである。歴史的には脂肪酸やポリケチド生合成におけるクライゼン縮合反応のように二電子メカニズムで進行すると考えられていた。このようなメカニズムは活性化された気質が求核剤と求電子剤を生成する。ラジカル SAM 酵素の研究が盛んになされるようになり、ラジカル反応はによる C-C 結合の生成もメジャーであることが明らかとなってきた。これらのラジカルを利用した反応は、ほとんど全て sp^3 と sp^2 炭素中心間で進行するので、2 電子機構とは異なる位置に C-C 結合を形成できる点で注目されている(図 50)。

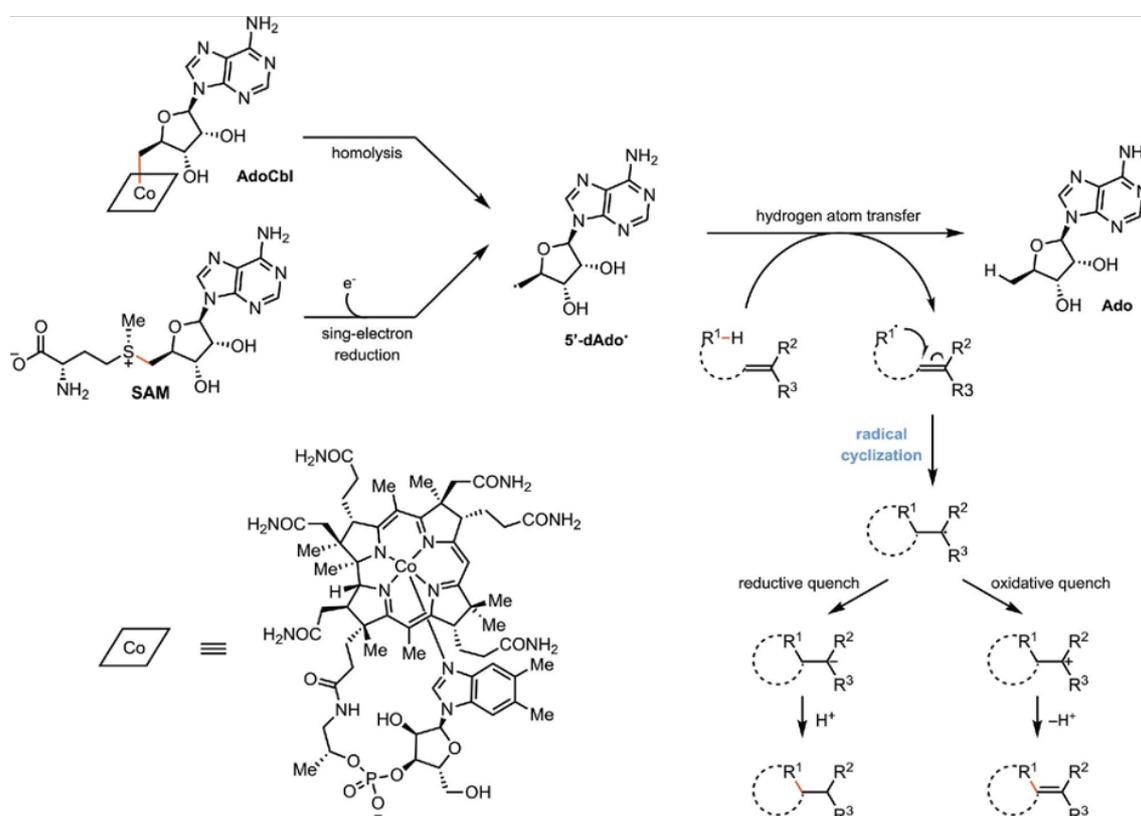


図 50 B12 依存性酵素のラジカル生成機構

これにより構造的にユニークで複雑な代謝物の構築が可能になっている。5'-dAdo• の結合解離エネルギーは $94-101 \text{ kcal/mol}^{-1}$ であり、 sp^3 炭素中心のほとんどの C-H 結合よりも高い。C-H 飽和炭化水素のような未活性炭素であっても切断できるエネルギーである。

さらに、ラジカル SAM 酵素の中にはコバラミンなどの追加の補因子を結合する N 末端ドメインを有するものが増えている。これまでに機能解析された酵素は活性化されていない炭素中心およびリン酸中心のメチル化を担うことが報告されているが最近の研究で炭素

骨格の構築を担うものが報告されている。一番初めにコバラミン依存性ラジカル SAM 酵素としてその結晶構造が報告された OxsB を例に取り上げる(図 51)。

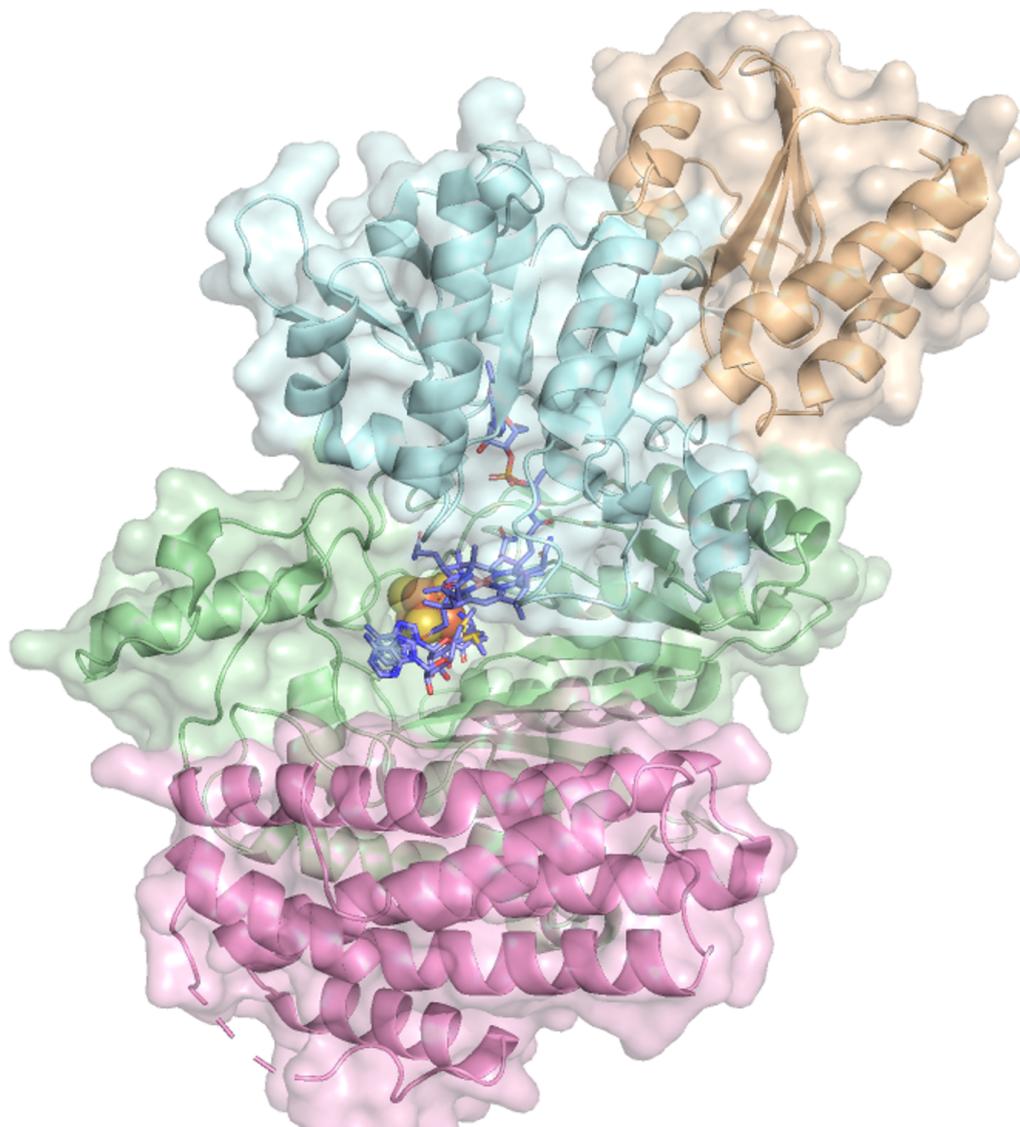


図 51 OxsB の結晶構造

OxsB はコバラミン 依存性ラジカル SAM 酵素で C-C 結合を形成し、抗ウイルス剤であるオキセタノシン A の生合成に関与し、特徴的な 4 員環構造の形成を触媒する¹²⁶。オキセタノシン A はアデニンを塩基とする oxetanosyl-*N*-glycoside 構造を有しており、ウイルスの DNA 重合を阻害することで活性を示す¹²⁷。OxsB の [4Fe-4S]/SAM/AdoCbl 結合型結晶構造より、5'-dA[·] の H 原子の引き抜きによって 5 員環が一時開環し、ラジカルに

よって C-C 結合が生成され縮環したのち、ラジカルクエンチにコバラミンが用いられる機構が提案されている^{126,128}。

また BchE と呼ばれる酵素も C-C 結合の生成によって環状構造を構築するコバラミン依存性ラジカル SAM 酵素として知られている(図 52)。

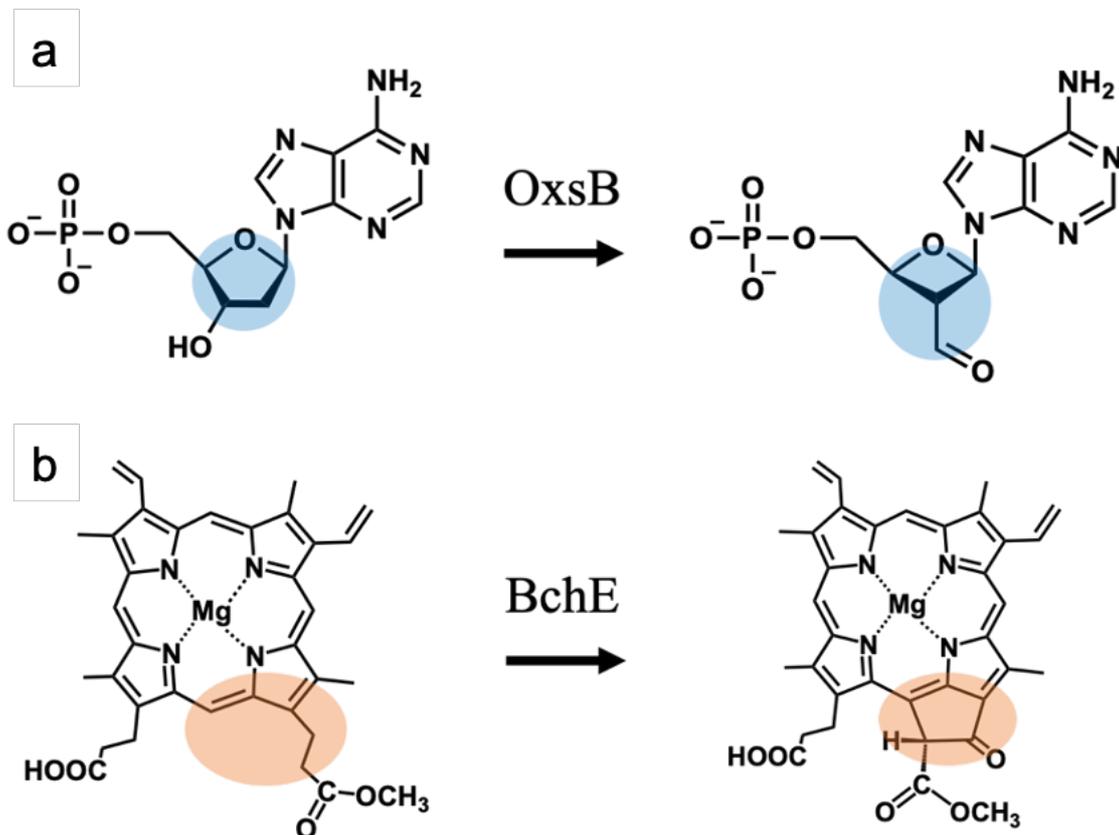


図 52 ラジカル反応によって環状構造の構築を行う酵素 OxsB および BchE の反応

(a). OxsB は 5 員環から 4 員環への縮環反応を触媒する。(b). BchE はポルフィリンの末端に環状構造を構築する。

また、このようなラジカル環化の機構は他の酵素にも存在している¹²⁹。ラジカル環化を触媒する酵素として知られているのはラジカル SAM 酵素以外にシトクロム P450 モノオキシゲナーゼ (P450)、2-オキソグルタル酸ジオキシゲナーゼ (2OGD) などが知られている。これらの酵素はいずれも活性中心にへム、非へム鉄を有しており、どちらも高原子価のフェリルオキシ種 (compound I, ferryl intermediate) を使用した水素原子移動によるラジカル形成を酸化的に行う^{130,131}。化学合成の分野ではラジカル中間体の形成には脱ハロゲン化反応がよく用いられる。

P450 はヘム依存性の大きな酵素スーパーファミリーであり、生体異物代謝やステロイド、脂質、ビタミン、天然物の生合成など様々な内外環境応答の酸化変換を触媒する¹³²⁻¹³⁵。主に水酸化反応がよく知られており、C-H 結合への一原子酸素添加反応を触媒する。エポキシ化、*N, S*-oxidation, *N, O, S*-dealkylation, C-C 結合開裂、バイヤービリガー酸化など多様な反応を触媒できる。その触媒サイクルは酵素の活性部位に基質 (R-H) が結合することで第二鉄のスピンスフトが誘発されレドックスパートナーを介して NAD(P)H から得られる一電子によって Fe^{III} から Fe^{II} への還元から始まる¹³⁶。ヘム-Fe^{II} へ酸素分子が結合して 2 回目の電子移動とプロトン化が起こるとヒドロペルオキシ錯体が形成される。末端の酸素がプロトン化され水が失われることで高原子価なオキソフェリル π カチオン中間体 (Fe^{IV}=O, compound I) が生成される。compound I が基質から水素原子を奪って炭素中心のラジカル種 (R[•]) を生成し、これが相当するヒドロキシルラジカル (Fe^{IV}-OH, compound II) と速やかにリバンドしてヒドロキシル化生成物を生成する¹³⁷。生成物の放出と水の再配置によって鉄の静止状態が再生される。compound I は C-H 結合

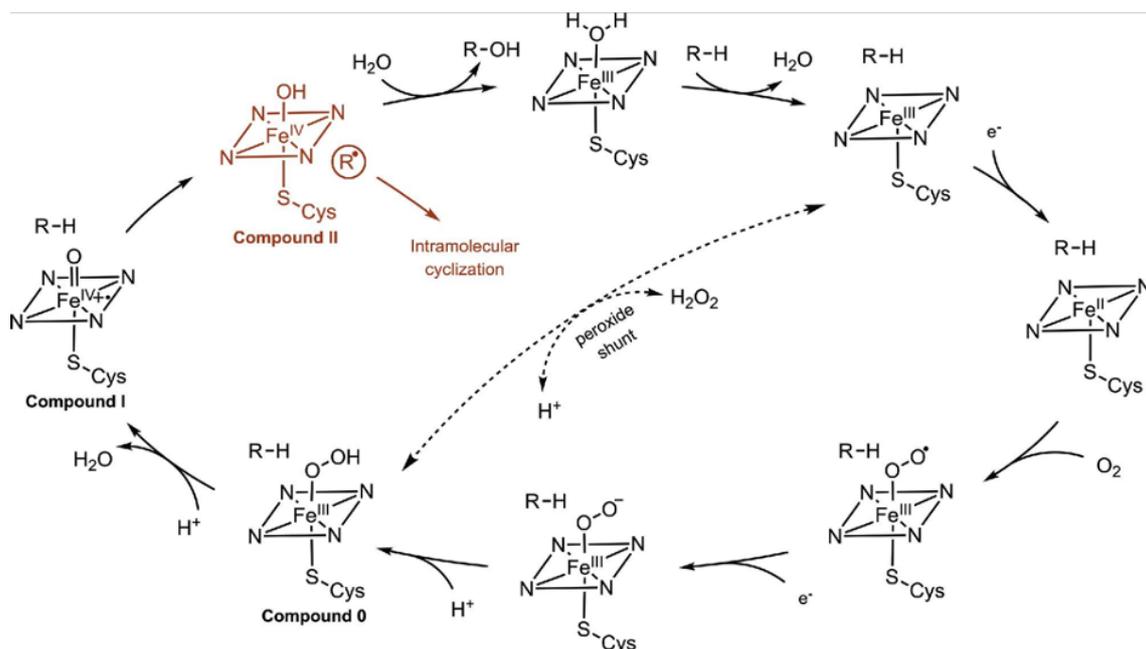


図 53 提案されている P450 の反応メカニズム

だけでなく、フェノール類の O-H 結合やアニリンの N-H 結合からも水素原子に引き抜きによってラジカルを生成することができる(図 53)。P450 が関与するラジカル環化反応物は Mycocyclusin 生合成¹³⁸ や Vancomycin 生合成¹³⁹ においてよく研究されている。

2OGD もまた二次代謝産物の生合成に重要な役割を果たすことで知られる酵素スーパーファミリーである。補因子として非ヘム鉄、共基質として2-オキソグルタル酸(2OG)を用いることで二つの酸素分子の二つの酸素原子のうち、一方の基質と結合させ水酸化し、他方は2OGに取り込ませることでコハク酸と二酸化炭素を生成するジオキシゲナーゼである^{140,141}。活性中心はH-x-D/E-x(n)-Hからなる2-His-1-carboxylate¹⁴²モチーフを含み、構造的にはDSBHフォールドを共有している。この酵素もまた水酸化を主な反応とし、ハロゲン化、環化、不飽和化、エピマー化、C-C結合開裂など、様々な酸化反応を触媒する^{140,143-145}。触媒サイクルは2OGがFe^{II}中心に結合することから始まり、三つの金属結合水分子のうち二つが置換される。基質が結合することで三つ目の水分子が置換され、分子状酸素が結合してFe^{III}-スーパーオキシ中間体が形成される。Fe^{III}-スーパーオキシ中間体の遠位の酸素原子が2OGのC2位を攻撃することでペルオキシヘミケタル二環式中間体を生成し、酸化的脱炭酸によりCO₂を放出してFe^{IV}-オキシ種を生成する。P450

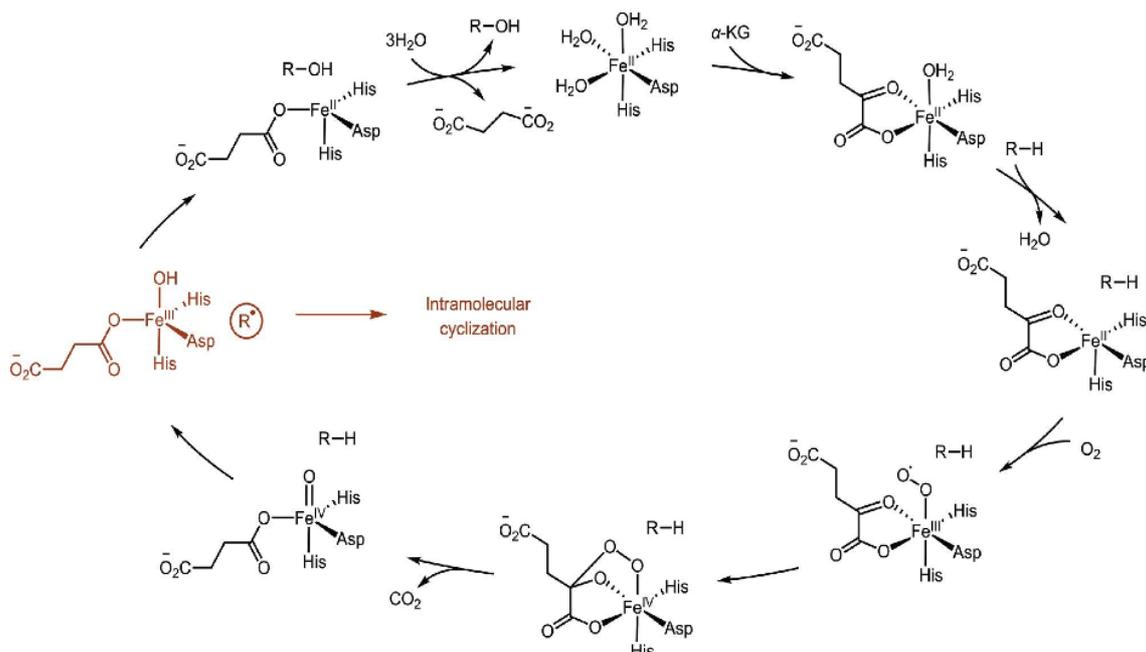


図 54 提案されている 2OGD ファミリーの反応メカニズム

と同様に Fe^{IV}=O 種は基質から水素原子を奪うことでラジカル中間体と Fe^{III}-OH 種を生成する。このラジカルがヒドロキシルラジカルリバウンドすることで水酸化された最終産物が得られる。水酸化された生成物とコハク酸が放出されると、Fe^{II}中心に水分子が再配置され、触媒サイクルが完了する(図 54)¹³¹。2OGD が関与する環化反応は Kainic Acid 生合成¹⁴⁶ や Scopolamine 生合成^{147,148} でよく研究されている。

様々な代謝系に存在し、複雑な炭素骨格の構築を行うラジカル SAM 酵素は数多くその生化学的特徴づけが行われているが、11 万種という母数に対しての解析例としてはごくわずかである。また、環状構造の構築に関与するコバラミン依存性ラジカル SAM 酵素も発見されてきたことから、本研究対象のラジカル SAM 酵素がアナモックス菌のラダロン脂質生合成において、環状構造を構築し歪みの大きな梯子状疎水基を形成する可能性がある。そこで我々は分光学的解析や構造生物学的洞察から本酵素の特徴づけを試みた。

結果・考察

3-3. ホロ型ラジカル SAM 酵素の発現系構築に向けた培養条件および精製条件の最適化

本研究対象のラジカル SAM 酵素については補因子が含まれないアポ型の状態での発現系はすでに鉄-硫黄クラスターの生合成を行う酵素群の発現ベクターである pBD1282 を導入した C43(DE3)株を用いることで大量発現系を構築していた。しかし、鉄-硫黄クラスターは空気中の酸素によって容易に崩壊するため結晶化に向けた高純度な試料調製を行うとアポ型酵素が得られる。化学的な鉄-硫黄クラスターの再構成も試みたが酵素へのダメージが激しく多くが凝集してしまう。またコバラミンも補因子とするため、完全にホロ型で発現させて嫌気条件下での精製手法を確立する必要がある。そこでまずはホロ型ラジカル SAM 酵素の発現系を構築した。

Lanz らによってラジカル SAM 酵素を鉄-硫黄クラスター生合成マシナリーに加えてさらにコバラミントランスポーター pBAD-Btu を共発現させることで収量の増加や可溶性の向上に加え鉄-硫黄クラスターやコバラミンが結合した酵素試料の調製が可能と報告されている(図 55)。

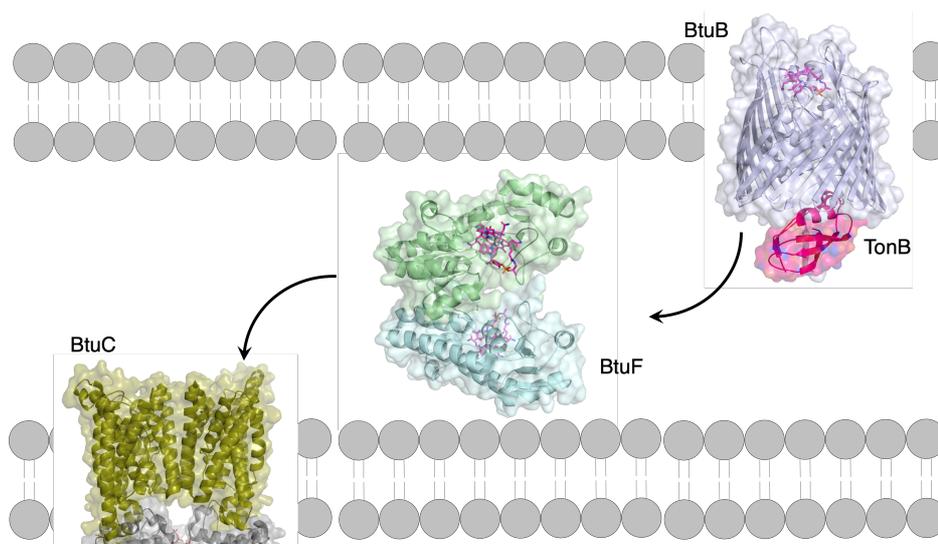


図 55 pBAD42-Btu によって発現する各コバラミントランスポーターの反応

経路

この手法を導入し鉄-硫黄クラスターおよびコバラミン結合型ラジカル SAM 酵素の発現系の構築を行った。はじめに大腸菌 BL21(DE3)株に pBAD-Btu を導入し、発現誘導剤である L-Arabinose の濃度検討および培養時間の検討を行った。最適な濃度、培養時間を決定し、培地にコバラミンを添加することで大腸菌が赤色に呈色し、コバラミンが菌体内に取り込まれていることを確認した。次に pBAD-Btu+pDB1282 を導入した大腸菌へのラジカル SAM 酵素遺伝子を導入し、再度 L-Arabinose の濃度検討および培養時間の検討を行った。これは鉄-硫黄クラスター生合成酵素群の発現遺伝子である pDB1282 もその発現誘導を L-Arabinose によって行うためである。これらの検討の結果、問題なく全ての遺伝子が発現する条件を見出した。

得られたホロ型ラジカル SAM 酵素を Coy 製の嫌気チャンバー内で取り扱うことで、高純度精製条件の検討を行った。コバラミンが光感受性であるため、以降の操作は嫌気暗所環境下で行った。lysozyme 破碎を行い Ni-NTA による粗精製ののち、HiTrapQ を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーによって高純度なホロ型ラジカル SAM 酵素を得ることができた。得られた試料はアポ型とは異なり褐色を呈していた(図 56)。

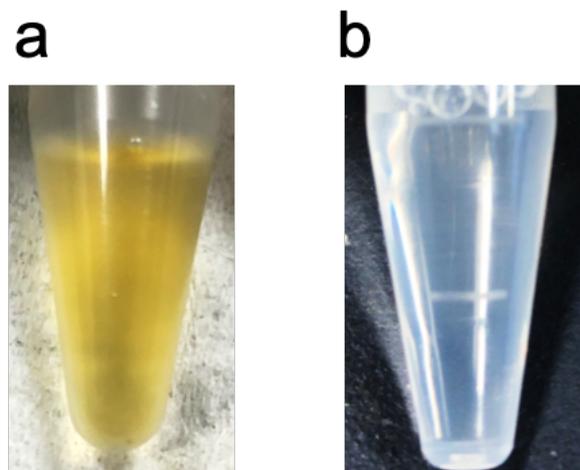


図 56 ホロ型およびアポ型精製試料

(a). 調製したホロ型酵素は有色で茶褐色になる様子が確認できる。(b). アポ型酵素は補因子を持たないため無色である様子が確認できる。

紫外可視吸収スペクトルを測定すると精製試料ではアポ型酵素と比べ 300 nm より高波長側にブロードな吸収が確認された。また鉄-硫黄クラスターおよびコバラミン結合型 Fom3 の紫外可視吸収スペクトルと類似していることから補因子が結合したホロ型ラジカル SAM 酵素が得られていることが示唆された(図 57)。

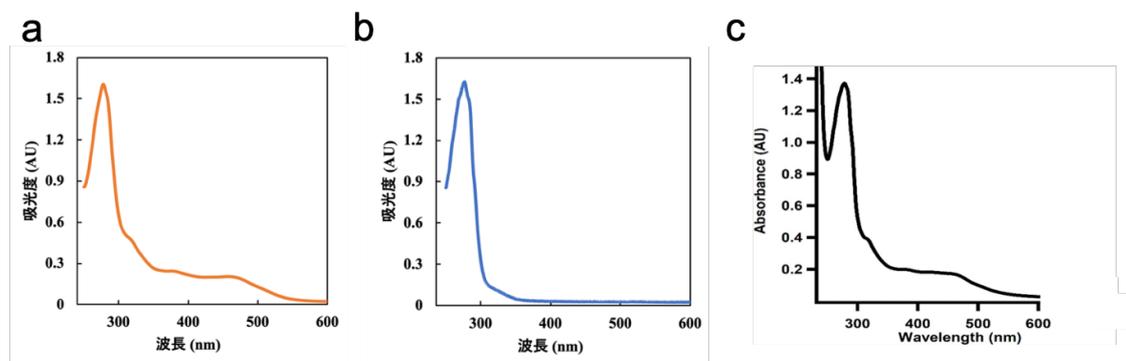


図 57 ホロ型およびアポ型、Fom3 の UV-vis

(a). 精製したホロ型ラジカル SAM 酵素の UV-Vis Fom3 (c) のスペクトルと類似して 300 nm より高波長側にブロードな吸収が確認できる。(b). アポ型ラジカル SAM 酵素の UV-vis 補因子による吸収は確認できなかった。(c). コバラミン依存性ラジカル SAM 酵素 Fom3 のホロ型 UV-vis

また本酵素の場合、鉄-硫黄クラスターとコバラミンの両者が結合しているタンパク質分子のみ活性を持つと予測される。また結晶化においてはタンパク質分子の均一性が重要であるため、本酵素に対する補因子の占有率を分析した。酵素濃度に対して鉄と硫化物が 4 当量、コバラミンは 1 当量であることが望まれる。溶出フラクションを回収し定量用バッファーに置換して濃縮した。タンパク質濃度は TaKaRa Bradford Protein Assay Kit を用いて定量した。2 種の希釈倍率にて分析した平均は 63 μM であった。

鉄濃度は Ferrozine 法を用いて定量した。2 種の希釈倍率にて分析した平均は 246 μM で酵素濃度に対して 3.9 当量であった。硫黄濃度は Methylene Blue 法を用いて定量した 2 種の希釈倍率にて分析した平均は 200 μM で酵素濃度に対して 3.2 当量であった。コバラミンはシアン化カリウム (KCN) を添加して熱処理することでジシアノコバラミンとなる性質を持つ。この化合物は吸収極大 367 nm の紫外可視吸収スペクトルを示し、367 nm でのモル吸光係数 $30,800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ から定量した(図 58)。

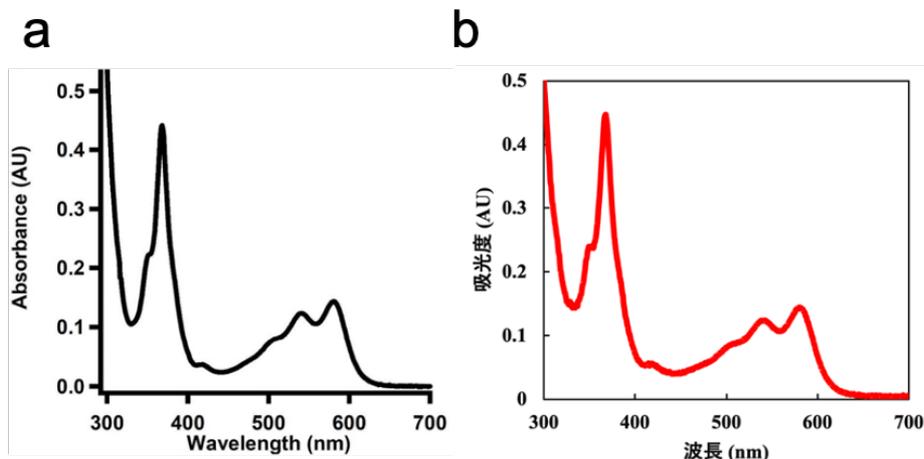


図 58 KCN で処理した酵素の UV-vis

(a). ジシアノコバラミンの UV-vis (b). 精製したラジカル SAM 酵素に対して KCN を加えて煮沸したのちに測定した UV-vis (a)と同様なスペクトルが確認できる。

処理により参考の TsrM と同様のスペクトルが確認された。2 種の希釈倍率にて分析した平均は 60 μM で酵素濃度に対して 0.97 当量であった。以上の結果をまとめると本酵素に対して鉄が 3.9 当量、硫化物が 3.2 当量、コバラミンが 0.97 当量でありホロ型ラジカル SAM 酵素の発現および精製条件の最適化ができた。

3-4. ホロ型ラジカル SAM 酵素の SAM 分解活性

得られたラジカル SAM 酵素が酵素的な活性を有しているかを確認するために、SAM 分解活性を評価した。ラジカル SAM 酵素は基質非存在化でも鉄-硫黄クラスターが外部の電子供与体から還元され活性型 $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ となることで Ω 中間体を形成し、SAM が分解されメチオニンと 5'-dA が生成される。鉄-硫黄クラスターはラジカル SAM 酵素に特徴的なシステインリッチモチーフが存在しない場合でもタンパク質表面に非特異的な結合を起こすことが報告されているため、調製したラジカル SAM 酵素に正しく鉄-硫黄クラスターが結合していない場合はこの SAM 分解活性がないことが予想される。電子供与体は生体内ではフラボトキシンやフェレドキシンなどの電子伝達タンパク質であるが、一般にラジカル SAM 酵素はジチオナイトなどの化学的還元剤においても活性型 $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ への還元ができることが報告されている。そこで酵素 80 μM に対して 10 mM のジチオナイトを添加し、30 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間反応させたのちにギ酸で反応をクエンチし、反応抽出物を LC/MS で分析した。その結果、複数のピークが確認できたが、5'-dA の m/z 252.1 と合致する MS クロマト

グラムが得られた。SAM は不安定な化合物であり、C-5'以外でも自発的に様々な箇所で分解する。そのため他の HPLC で確認されたピークは SAM 分解物だと考えられる。

以上の結果より調製したラジカル SAM 酵素は SAM と電子供与物質があれば酵素的な活性を有している状態であることが示唆された(図 59)。

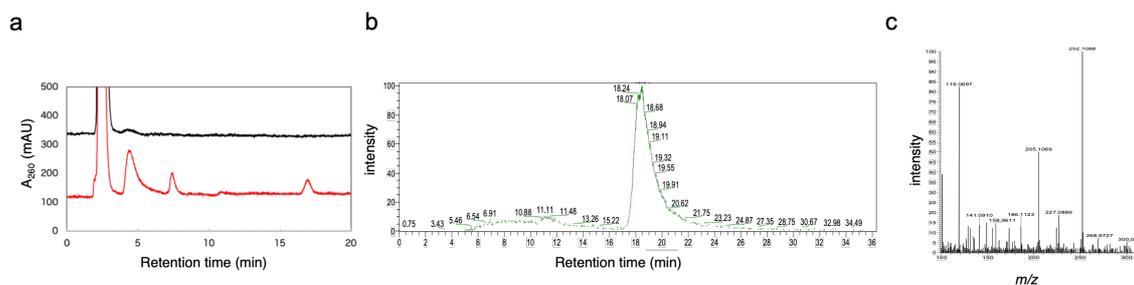


図 59 SAM 分解活性の評価

(a). HPLC を用いた SAM 分解活性評価の結果 コントロール (黒), retention time 17 min のピークが 5'-dAdo。5 min 前後のピークは SAM の自己分解によって生じる化合物
(b). retention time 17 min の MS スペクトル (c). MS スペクトルの分析結果 5'-dAdo に相当する m/z が確認できている。

3-5. ホロ型ラジカル SAM 酵素の嫌気条件下での結晶化スクリーニング

紫外可視吸収スペクトル測定などからホロ型酵素が得られたのでこれらを用いて嫌気条件下で結晶化スクリーニングを行なった。終濃度 1 mM で SAM を添加し約 1,500 条件程度スクリーニングを行なったがタンパク質の結晶は確認できなかった。これはラジカル SAM 酵素の C 末端に付加させている精製に用いるための His-tag の運動性の高さが結晶化を阻害しているためであることが考えられる。これまでの実験からプロテアーゼ処理をして His タグを切除することでラジカル SAM 酵素が様々な会合状態を取りうることを見出していたため、His-tag を切除せずに結晶化を行っていた。しかし、鉄-硫黄クラスター及びコバラミンを再構成することでタンパク質に存在する揺らぎの大きな領域を固定したにも関わらず、結晶が確認できないということは、やはり His-tag の運動性の高さが結晶化を阻害していることが考えられる。そこで化学的な処理による SNAC (Sequence-specific Nickel-Assisted Cleavage) tag の導入を検討した(図 60)。

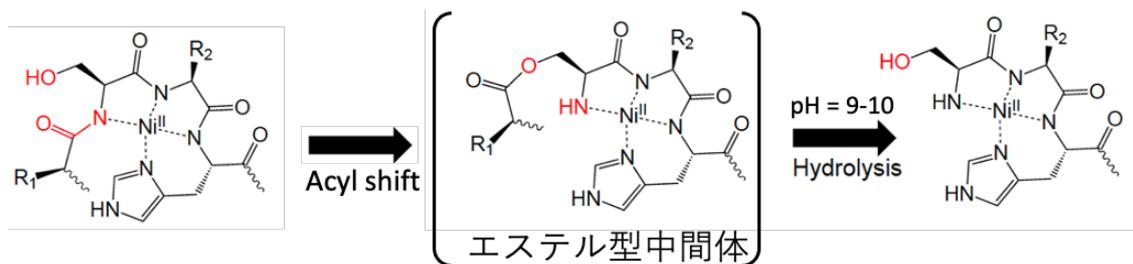


図 60 SNAC-tag による切断反応メカニズム

N 末端 8His-tag 体を構築し、本酵素と His-tag の間に N 末端側から GSHHW の 5 残基を挿入した 8His-tag-SNAC-ラジカル SAM 酵素のプラスミドを作製した。精製した試料を CHES buffer (0.1 M CHES pH8.6, 10 % (v/v) Glycerol, 150 mM NaCl) に置換し、タンパク質濃度を 1.0 mg/mL に調製し、1 mM NiCl₂ を添加し 4 °C および室温で 16 時間処理した。沈殿物を遠心によって取り除き、Rev. IMAC を行うことで His-tag が切除されたラジカル SAM 酵素の回収を試みたが、処理後のタンパク質はほとんどすべてが凝集して沈殿しており、SNAC tag は本酵素に適していないことが明らかとなった(図 61)。

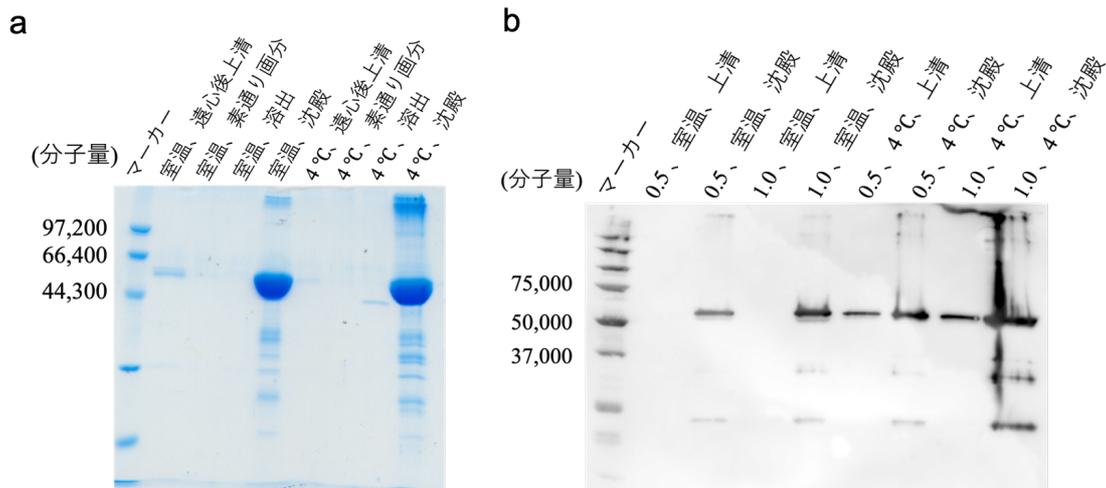


図 61 SANC-tag 切断後の SDS-PAGE およびウェスタンブロット

His-tag の切除は理由が明らかではないものの、ラジカル SAM 酵素の安定性を著しく低下させる働きがあるのだと考えられた。そこで、二次構造予測によるタンパク質自体の柔軟な領域を欠損させた変異体を用いて結晶化を試みた。Predictor of Natural Disordered Regions による予測から本酵素の C 末端側は揺らぎが大きく結晶化に不利であると推測された。そこで、C 末端から 15, 20, 30 残基欠損させた変異体を作製し、試料調製を行った。その結果、C Δ 30 変異体では酵素の収量が著しく低下した。C Δ 15、C Δ 20 変異体では野生型酵素の場合と比較して少し収量が減少したものの、結晶化に用いることのできる量の酵素が得られた。これらを用いて 1,500 条件程度結晶化スクリーニングを行ったが、結晶は得られなかった。

今後は近年急激にその技術革新が起きている Alpha Fold 2 による予測構造から結晶化に適した変異導入等を行い本酵素の構造解析を試みる。

実験手法

3-6. ホロ型ラジカル SAM 酵素の発現

大腸菌 BL21(DE3) 株に pDB1282、pBAD42-Btu、ラジカル SAM 酵素の遺伝子をヒートショック法により導入し、形質転換体を 25 μ g/mL Kanamycin (Kana), 50 μ g/mL Ampicillin (Amp), 50 μ g/mL Spectinomycin (Spec) 含有 LB3 寒天培地にて 37 $^{\circ}$ C、一晩静置培養した。翌日、単一のコロニーを LB3 液体培地 100 mL に植菌し 37 $^{\circ}$ C、150 rpm で 16 時間の前培養を行った。M9 培地 1 L に前培養液を 10 mL 添加して 37 $^{\circ}$ C、180 rpm で震盪培養する。OD₆₀₀=0.2 付近で 0.2 % (w/v) アラビノース、25 μ M FeCl₃、150 μ M シ

ステインを添加し、OD₆₀₀=0.6 付近で 0.5 mM IPTG、25 μM FeCl₃、150 μM L-Cys を添加し 18 °C、180 rpm で 24 時間培養した。培養液を 4 °C で 7,790 g、15 分間遠心して細胞を回収した。回収した菌体は使用するまで -80 °C で保存した。

3-7. 嫌気条件下でのホロ型ラジカル SAM 酵素の精製と結晶化

嫌気チャンバー内にあらかじめ用いる試薬や器具類を置いておき、溶存酸素の除去および、平衡化を行った。培養によって得られた大腸菌 25 g に対して buffer A (50 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerol, 10 mM Imidazole, 2 mM PMSF, 1 mM DTT) を 80 mL 加え、0.4 mg/mL リゾチーム、10 mM Sm2 スクレアーゼ、10 mM MgCl₂ を添加して 4 °C で 1 時間静置し、終濃度 2 % となるように Triton X-100 を添加し 4 °C で 30 分間静置し大腸菌の破碎を行った。破碎液を 4 °C、38,900 g で 30 分間遠心分離し細胞片などの粒子を除去し、上清を回収した。あらかじめ buffer A で平衡化された Ni-NTA カラムへ得られた上清をアプライした。終濃度 50 mM Imidazole, 500 mM NaCl となるように加えた buffer A でカラムを洗浄したのち、250 mM Imidazole を加えた buffer A で酵素を溶出した。体積が 1 mL 以下になるように 50 kDa centricon で濃縮し、buffer B (50 mM Tris-HCl pH7.5, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT) + 5 % buffer C (50 mM Tris-HCl pH7.5, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, 1 M NaCl) で平衡化した HiTrapQ にアプライした。最終的に buffer C が 80 % となるようにグラジエントをかけて酵素を溶出した。鉄-硫黄クラスターに特徴的な吸収波長である 410 nm およびコバラミンに特徴的な吸収波長である。380 nm の吸収波長をモニターすることで目的酵素が溶出する画分を選んだ。溶出した酵素は 50 kDa centricon で濃縮し使用するまで -80 °C で保存した。

4章 *Planctomyces limnophilus* を用いたアナモックス菌由来タンパク質の異種発現系構築

緒言

4-1. *P. limnophilus* を用いた異種タンパク質発現系

ラダラン脂質生合成経路解明に向けて我々は推定鍵酵素などの異種発現系構築等を試みてきた。その結果、環化反応を触媒すると推測されているラジカル SAM 酵素については活性型酵素の調製に成功している。さらに、海洋性のアナモックス菌にはその遺伝子が保存されていないものの、その他のゲノムが公開されている *K. stuttgartiensis* などのアナモックス菌には高度に保存されている遺伝子 Kuste3347 についても大腸菌を用いた大量発現系を構築し、その酵素の構造解析が終了している。しかし、ラダラン脂質前駆体の生合成に関与すると提案されている遺伝子 Kuste3607 および 3336 については Javidpour らによって可溶性タグを付加した状態での大腸菌発現系が構築されたものの⁴⁸、当研究室では再現性が確認できなかった。詳細に発現条件等を検討したが我々はこれらの酵素を可溶性酵素として得ることができなかった。生合成経路の解明には一般的には遺伝子破壊株などを作製し生合成中間体などを蓄積させる手法を用いる。しかし、アナモックス菌にとってのラダラン脂質はハウスキーピングな酵素によって生産される生育に必須な遺伝子であると考えられるため、これを破壊すると死滅する可能性が存在している。また、純粋培養、寒天培地による静置培養やシングルコロニーの単離によるスクリーニング手法などは、アナモックス菌の極めて遅い倍加時間、および嫌気性細菌であるという点からいまだにその手法が確立されていない⁴²。そこで我々はアナモックス菌と近縁種である微生物を用いることでラダラン脂質の異種発現ができないかと考えた。アナモックス菌は *Planctomyces* 属と呼ばれるグラム陰性菌で原核生物であるにも関わらず、非常に複雑な細胞構造と生活環を有する微生物に類される。この属の中でも、その全ゲノムが解読され、近年、トランスポゾンシステムなどを用いることで GFP などのモデルタンパク質を発現させることに成功した *Planctomyces limnophilus* に注目した⁵¹⁻⁵³。

Planctomyces 属の微生物は細胞質の区画やエンドサイトーシスのような高分子の取り込みなど真核生物に典型的ないくつの特徴を持つことが報告されている。この属に含まれるいくつかの微生物は真核生物の膜コートタンパク質と高い構造類似性を有するタンパク質をコードする遺伝子を持つ。この膜コートタンパク質は真核生物ではエンドサイトーシスを行う際の小胞の形成に関与すると考えられており、*Planctomyces* 属の微生物も同様の局在を示すことが報告された。系統発生的にはグラム陰性菌であるものの *Gemmata*

obscuriglobus には核膜様の細胞内小器官が観察されている。バイオインフォマティクス解析等では様々な提案がなされているもののこれまでに遺伝学的実験系が構築されていなかったため、十分な実験的証拠が得られていなかった。そこで Boedeker らは *P. limnophilus* を用いたこれらの実験系を構築した⁵⁴。この菌は多細胞ロゼットを形成する能力を持ち、ピンクがかった赤色色素沈着を起こす。また、他の *Planctomyces* と比較して高い成長率を示すことからモデル微生物として提案されていた。そこで EZ-Tn5 トランスポゾンシステムを用いた GFP 発現系の構築が行われた。その結果、細胞内に GFP 蛍光を確認できるレベルでの発現ができたことを報告している。

これらの結果から我々は *P. limnophilus* を用いた異種発現系を構築すればアナモックス菌由来タンパク質を安定に発現させることができるのではないかと考えた。高度に分画された細胞内環境が大腸菌とは異なり、発現しにくいタンパク質に有利に働く可能性がある。ラダラン脂質推定生合成遺伝子クラスター中の全てを組み込むことは困難かもしれないが、推定鍵酵素やいくつかの酵素の組み合わせによってラダラン脂質の生産が可能になることを期待している。また本研究ではすでに報告されているトランスポゾンシステムを用いる系に加えて、ファージインテグラーゼを用いる。トランスポゾンシステムを用いる場合、ゲノムに対してランダムに遺伝子が組み込まれる。その結果、生育に必須な一次代謝を行う酵素遺伝子上に変異が挿入されると形質転換体のスクリーニング効率が悪くなると考えた。ファージインテグラーゼとは溶原性ファージゲノムが宿主菌への感染時に自己ゲノムを組み込む反応を触媒する酵素である。attP と呼ばれる pseudo site を組み込んだドナープラスミドに一過的にインテグラーゼを発現するようにすることで、ゲノム上の attB と呼ばれる領域に相同組み換えを引き起こす。*P. limnophilus* にはこの attB ホモログな配列が5つ存在しており、配列・位置特異的に目的遺伝子を導入できると期待した。

本研究ではアナモックス菌のラダラン脂質生合成経路の全容解明を目的として *P. limnophilus* を用いたラダラン生合成経路の再構築に着手した。

結果・考察

4-2. MIC 測定とカナマイシン感受性株のスクリーニング

P. limnophilus は意外にも多剤耐性菌であることが報告されている。トランスポゾンシステムを用いる場合カナマイシンに対して感受性である必要がある。そこでまず初めに最少生育阻止濃度 (Minimal Inhibitory Concentration: MIC) の測定およびカナマイシン感受性株のスクリーニングを行なった。MIC の値が小さければ小さいほど *in vitro* での抗菌

力が高いことを示し、複数のシャトルベクターを用いた形質転換を視野に入れた薬物耐性遺伝子マーカーの選定のためにこれを行なった。PYGV 培地 (Mineral salt sol. (Hutner/CohenBazire) 20 ml, Peptone (Bacto) 0.5 g, Yeast extract (Bacto) 0.5 g, Distilled water 965 ml, Glucose sol. (2.5 %, sterile-filtered) 10 ml, Vitamin sol. (double conc.) 5 ml, Mineral salt solution (Nitrilotriacetic acid (NTA) 10 g, MgSO₄ x 7 H₂O 29.7 g, CaCl₂ x 2 H₂O 3.34 g, Na₂MoO₄ x 2 H₂O 12.67 mg, FeSO₄ x 7 H₂O 99 mg, Metal salt sol. "44" (see medium 590) 50 ml, Distilled water 900 ml), Vitamin solution (double conc.) Biotin 4 mg, Folic acid 4 mg, Pyridoxine-HCl 20 mg, Riboflavin 10 mg, Thiamine-HCl x 2 H₂O 10 mg, Nicotinamide 10 mg, D-Ca-pantothenate 10 mg, Vitamin B₁₂ 0.2 mg, *p*-Aminobenzoic acid 10 mg, Distilled water 1000 ml) 20 mL で当研究室にあったアンピシリン、ゲンタマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、スペクチノマイシン、カナマイシンについてそれぞれの薬剤を

表 3 MIC 測定結果

	0(control)	1 µg/mL	2 µg/mL	4 µg/mL	8 µg/mL	16 µg/mL	32 µg/mL	64 µg/mL	128 µg/mL	256 µg/mL	
アンピシリン		0.946	0.825	0.950	1.07	0.793	0.873	0.796	0.954	0.996	1.00
ゲンタマイシン			0.903	0.666	0.621	1.10	0.649	0.643	0.582	0.524	0.621
テトラサイクリン			1.03	0.449	0.423	0.945	0.582	0.472	0.067	0.095	0.278
クロラムフェニコール			0.849	0.705	0.692	0.664	0.872	0.970	0.780	1.125	1.162
スペクチノマイシン			0.663	0.672	0.700	0.654	0.685	0.596	0.612	0.567	0.585
カナマイシン			0.672	0.592	0.590	0.610	1.362	0.567	0.50	0.618	0.662

1-256 mg/mL の範囲で測定した。植菌時の OD₆₀₀=0.06 として 5 日間 28°C で浸透培養を行なった。その結果、表に示すような結果が得られた。

P. limnophilus はテトラサイクリンに対して非常に感受性であることが明らかとなった。しかし、薬剤耐性マーカーとしては強力すぎるため、他の薬剤の選定を行わなければならないことも示唆された。そこでアプラマイシンを用いて再度 MIC を測定した。その結果、50 mg/mL あたりで生育阻止がかかったため、これとカナマイシンを薬剤耐性マーカーとして用いることにした。

カナマイシン感受性株のスクリーニングは寒天 PYGV 培地に菌体を塗布し得られたシングルコロニーをカナマイシン含有プレートと非含有プレートにスポッティングすることでレプリカプレートを作製し、スクリーニングした。得られたシングルコロニー2,000個からレプリカプレートを作製した。その結果、20株ほどカナマイシン感受性株が得られた。しかし、この薬剤感受性株を培養するとスクリーニング前と比較して培養しても色素沈着が見られないことから形態が異なる様子が確認できた(図 62)。

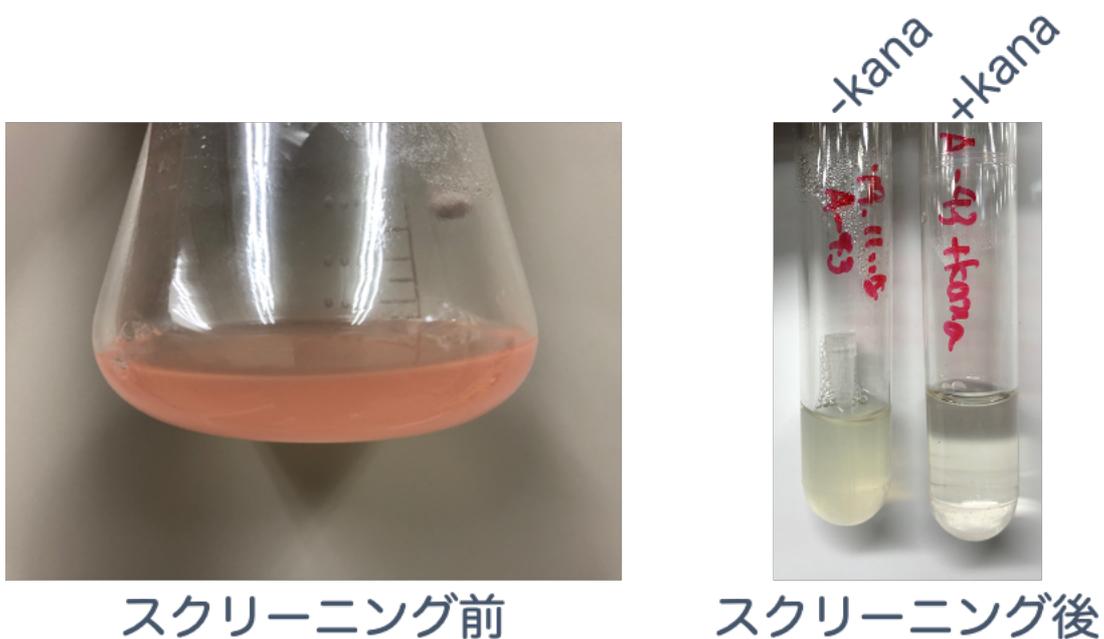


図 62 スクリーニング前後の菌体の様子

そこで、スクリーニング前後の菌体から DNA を抽出し、16S rDNA 解析を行うことにした primer は、公開されている *P. limnophilus* の 16S rDNA が全領域（1.6 kbp）が増幅するように設計し、PCR を行なったのちアガロースゲルを用いた電気泳動によってその PCR 産物の塩基長を確認した(図 63)。

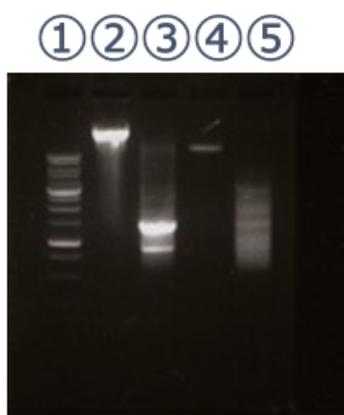


図 63 抽出した DNA を用いた PCR の結果

①DNA マーカー, ②スクリーニング前の菌体から抽出した DNA, ③ ②を鋳型にした PCR 産物,④ スクリーニング前の菌体から抽出した DNA, ⑤ ④を鋳型にした PCR 産物

その結果、スクリーニング後の菌体から抽出した DNA を鋳型とした PCR では目的の領域が増幅されていないことが明らかとなった。そこで、増幅領域を変更し、primer がアニールしやすい領域（1 kbp）を選定し、再度 primer 設計、PCR を行なった。PCR を行う際、アニーリング温度にグラジエントをかけることで最適な PCR 条件の検討も同時に行なった。その結果、65 °C にアニーリング温度を設定した場合に目的の塩基長の増幅が確認できた。このゲルを切り出し精製し、鋳型にして再度 PCR を行なったのちにシーケンス解析を行なったところ、公開されている *P. limnophilus* の 16S rDNA と 1 kbp 一致する結果が得られた。これにより培養の形態が異なる薬剤耐性菌が同一の菌から派生したものであることを明らかにした。培養の形態が異なるのは薬剤によるストレスによって *P. limnophilus* が持つ σ 因子などによって色素沈着を起こす遺伝子が発現しなかったことなどが要因だと考えられる(図 64)。

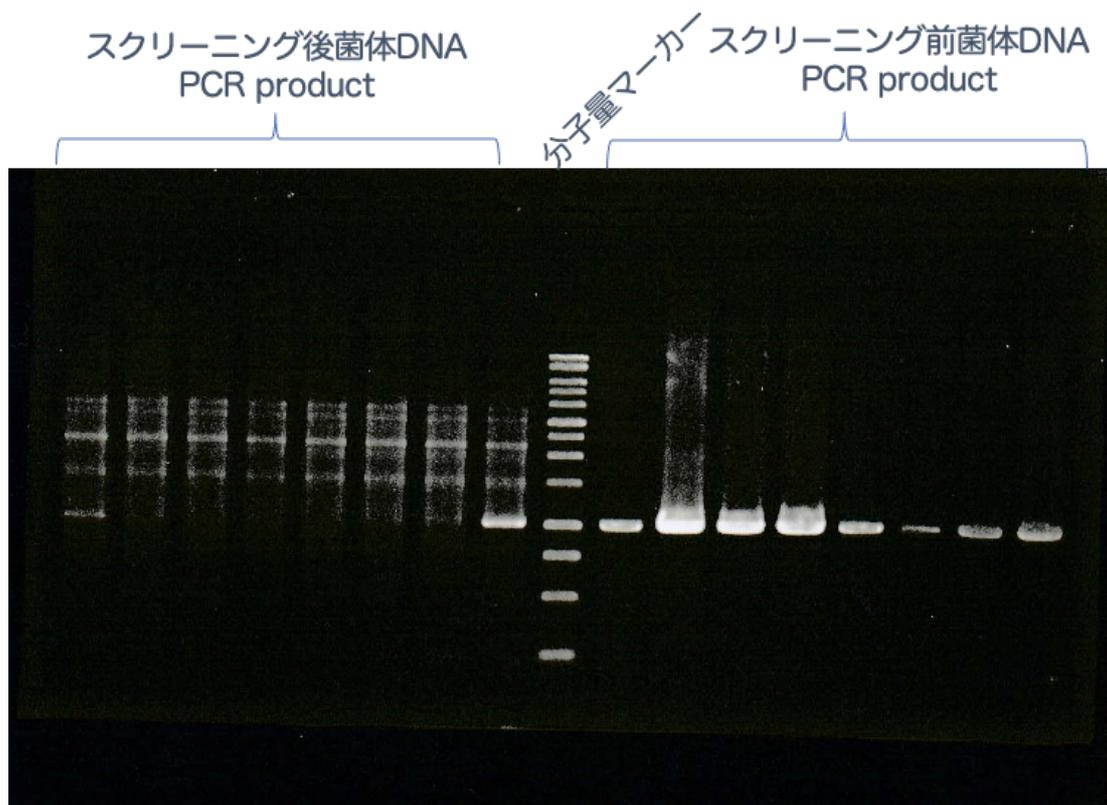


図 64 primer およびアニーリング温度最適化の結果

スクリーニング前後菌体 DNA PCR product はアニーリング温度が左から 55, 55.7, 56.9, 61.1, 63, 64.3, 65 °Cである。

4-3. シャトルベクターを用いた形質転換

スクリーニングによって得られた菌体を用いて形質転換をおこなうため、まずシャトルインテグレーションベクターを作製に着手した。この目的はどの種類のプロモーターが *P. limnophilus* の生体内で機能するのか、それが機能していることを容易に確認する手法の確立のためである。理化学研究所の高橋俊二先生から提供していただいた pTU ベクターを用いてまず形質転換を行なった。pTU には常時発現性プロモーターである aph(2) プロモーターが組み込まれており、その下流にアブラマイシン耐性遺伝子、*gus* が組み込まれている。*gus* 遺伝子は β -グルクロニターゼと呼ばれる酵素を発現する。この酵素が基質である 4-MUG を取り込むと 4-メチルウンベリフェロンと呼ばれる青色に呈色する化合物へと加水分解反応を起こす(図 65)。

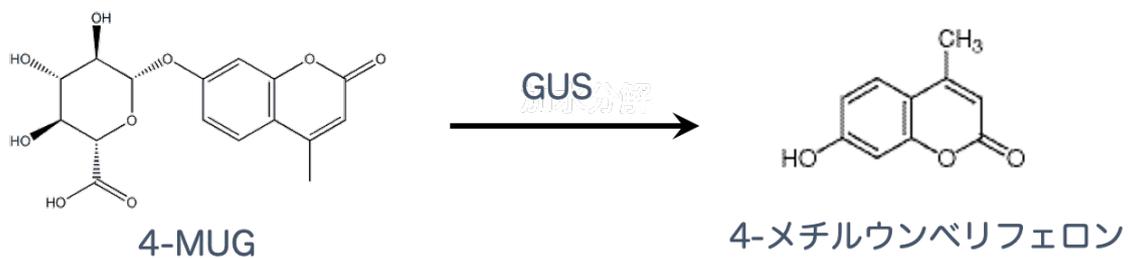


図 65 GUS の反応機構

エレクトロポレーションによる形質転換を行なって PYCV 寒天培地に塗布したものを 28℃で 3-5 日間静置培養し、得られたコロニーに基質を塗布した。しかし、基質が取り込まれなかったのか、GUS が発現していないためか青色に呈色する様子は確認できなかった。しかし、形質転換を行っていないベクターを加えずにエレクトロポレーションのみを行なった菌体をコントロールとした場合には形質転換体と比較して非常にコロニーの形成が少なかったため、薬剤耐性遺伝子は機能していることが示唆された。これらの結果から、エレクトロポレーション条件の最適化および塗布する菌体の量や加えるベクターの量など詳細に検討する必要があることが明らかとなった。

4-4. Tn5 transposome を用いた形質転換

GFP を発現させた手法と同様に、本薬剤感受性株が Tn5 Transposome によるゲノムへのゲノム導入が可能かを調べるために形質転換を行なった。シャトルインテグレーションベクターを導入したようにエレクトロポレーションを用いて EZ-Tn5 を *P. limnophilus* に導入し、菌体の希釈濃度等を変更しながら PYGV 寒天培地へ塗布した。28°C で 3-5 日間静置培養したのち、コロニーの形成度合いを比較した(図 66)。

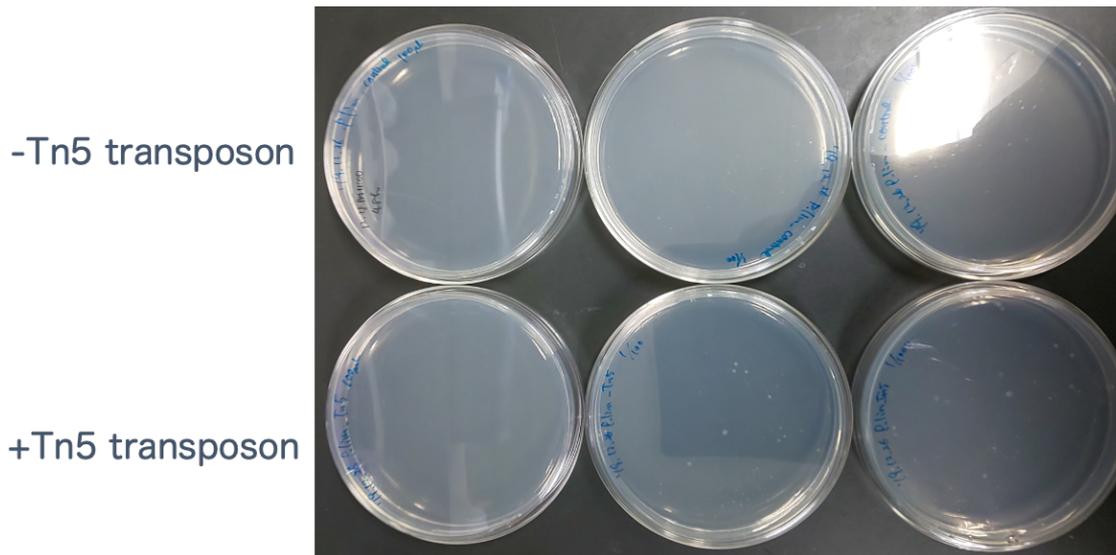


図 66 Tn5 トランスポソームを用いた形質転換の結果

その結果、Tn5 を添加した場合は添加していないものに比べてコロニーの形成している様子が確認できた。また、Tn5 を添加していないものはコロニーが形成されなかったことから、薬剤耐性株のゲノムにカナマイシン耐性カセットが Tn5 によって組み込まれたことを示唆している。

4-5. テトラサイクリン耐性遺伝子を用いた *P. limnophilus* の形質転換

Tn5 Transposome を用いた形質転換に成功したため、シャトルベクターによる遺伝子導入を効率的に行うため、attB サイトを *P. limnophilus* に直接ゲノムに組み込むことにした。MIC 測定から、テトラサイクリンに感受性であることを見出していたので、attB 配列の下流に aph(2) プロモーター、テトラサイクリン耐性遺伝子を配置した遺伝子を人工合成によって作製した。これに対し、Tn5 transposase が認識する 19 bp の配列を付加する PCR を行い、Tn5 transposase と混合することで、Tn5 transposome 酵素-DNA 複合体を作製した。エレクトロポレーション用にコンピテントセル化した *P. limnophilus* を用いて、これを

導入した。その結果、非常に形質転換効率が悪かったものの、テトラサイクリン含有培地で生育した *P. limnophilus* を得ることができた。同定のため、16S rDNA を増幅する PCR を行なったところ、目的の 1 kbp の増幅が確認できた。これをシーケンス解析した結果、解析が行えた領域は全て公開されている *P. limnophilus* の配列と一致したため、*P. limnophilus* であることを明らかにすることができた(図 65)。

```

P.lim168 1 AATGAACGTTGGCGGCATGGATTAGGCATGCAAGTCGAGGGGAAACCCGCAAGGGGGACACCGGGCAACGGGGTAGGAATACATAGGTAACTACCCCTCA 100
220124 0 -----
P.lim168 101 GSAOGGGGATAGCCAAAGGAAACTTTGGGTAAATACCGATGTGATGTGAGATGTGAATGCCATCAAAGGTGAGATTCACCTGAGGAGCGGGTTA 200
220124 0 -----
P.lim168 201 TGCATCATTAGCTTGTGGCGGGTAAOGGGCCACCAAGGCTGCGATGATTAGGGGTTGAGAGCATGGCCCCAACCTGGCACTGAGACACTGGCCA 300
220124 1 -----
P.lim168 301 GACACCTACGGGTGGCTGAGTCGAGAACTTCGGCAATGGGCGAAAGCCTGACCGAGCGATGCCGCGTGGGGATGAAGGCCCTCGGGTTGTAAACCGC 400
220124 46 -----
P.lim168 401 TGTGGAGGGGATGAACTGTATGGGAGCAACTCTCCGTATTTGACAGAGCCCTGGAGGAAGCACGGGGTAAAGTTCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGAA 500
220124 146 -----
P.lim168 501 TGTGCAAAAGTTATTGGAACTACTGGGCTTACAGGGTGGTAGGGCGGATTTTAAAGTCAAGGTGAAATCCCGGGCTCAAACGGGGAACTGCGCCTG 600
220124 246 -----
P.lim168 601 AGACTGGATTGCTCGAGTGAGGCAGGGGTGACGGAACTCCGGTGGAGCGGTGAAATGTGTAGATATCGGAAGGAACGCCAGCAGCGAAAGCGGTACAC 700
220124 346 -----
P.lim168 701 TGGGCTTGTCTGACGCTGAGGCACGAAAGCCAGGGTAGCGAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCCTGGCCGTAAACAATGAGCACTGGGGGAGGGACG 800
220124 446 -----
P.lim168 801 GGTCAACGTTCTTTCCCGTAGCGAAAGCGTTAAGTCTCCCGCTGGGGAGTATGCTCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCTCACACAAGC 900
220124 546 -----
P.lim168 901 GGTGGAGCATGTGGCTTAATTCGAGGCAACCGGAAGAACCTTATCCTAGACTTGACATGGTGGGATTAGTTGGCTGAAAGGTCAATGACGCCCTCGGGTG 1000
220124 646 -----
P.lim168 1001 GAAACATCACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCTGAGTCTGCTGAGATGTCGGTAAAGTCTGCTAAACGAGCGAAAACCCCTGTTCTTAGTTGCCAACAG 1100
220124 746 -----
P.lim168 1101 TCAATGTTGGGACTCTTAAGAAAGACCGCCGGCTCAAGCCGGAGGAAGGCGGGATGACGCTCAAGTCTCTATGGCCTTTATGCTTAGGGTGCACACGTGC 1200
220124 846 -----
P.lim168 1201 TACAATGGGATGTACAGAGGGAACGCCAAGCTGCGAAGCCGAGCAAAACCCAAAAAGCATCCCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCCTGCATGAAG 1300
220124 893 -----
P.lim168 1301 CCGGAATCGCTAGTAATCGCCGGTACGCAATAACGGCGGTGAATGTGTCTGAGCCTTGTAACACACCCCGCTAAGCCACGAAAGCGGGGGCGCCTAA 1400
220124 893 -----
P.lim168 1401 AGACACTGCTTAACCGTAAGGAGCGGTGTTAGGGCGAAACTCGTGATTGGGA 1458
220124 893 -----

```

図 67 増幅した *P. limnophilus* の 16 S rDNA のシーケンス解析結果

今後、このテトラサイクリン耐性株を用いて、シャトルベクターを導入する形質転換を行い、GFP の発現等を確認し、フィトエン不飽和化酵素などのアナモックス菌由来タンパク質を発現させることでラダラン脂質生合成経路の全容解明を目指す。

実験手法

4-6. 培養

Planctomyces limnophilus DSM 3776 は DSMZ-German Collection of Microorganisms and cell Cultures GmbH から購入した。フリーズドライ菌体を PYGV 培地 (Mineral salt sol. (Hutner/CohenBazire) 20 ml, Peptone (Bacto) 0.5 g, Yeast extract (Bacto) 0.5 g, Distilled water 965 ml, Glucose sol. (2.5 %, sterile-filtered) 10 ml, Vitamin sol. (double conc.) 5 ml, Mineral salt solution (Nitrilotriacetic acid (NTA) 10 g, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 29.7 g, $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 3.34 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 12.67 mg, $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 99 mg, Metal salt sol. "44" (see medium 590) 50 ml, Distilled water 900 ml), Vitamin solution (double conc.) Biotin 4 mg, Folic acid 4 mg, Pyridoxine-HCl 20 mg, Riboflavin 10 mg, Thiamine-HCl $\times 2 \text{H}_2\text{O}$ 10 mg, Nicotinamide 10 mg, D-Ca-pantothenate 10 mg, Vitamin B₁₂ 0.2 mg, *p*-Aminobenzoic acid 10 mg, Distilled water 1000 ml) 5 mL に懸濁し、30°C で浸透培養した。十分に増殖が確認できたところで 7,500 g で 10 分間 4 °C で遠心して集菌した。PYGV 培地 + 40 % Glycerol (v/v) を 1:1 で混合した溶液に再度懸濁し、次の実験に用いるまで -80 °C で保存した。

グリセロールストックした菌体は M3 培地 (1 g/L peptone, 1 g/L yeast extract, 1 g/L glucose, 5 mL vitamin solution (double concentrated) 10 mL/L mineral salt solution 10 mM HEPES pH7.5) 5 mL に懸濁し、28°C で増殖するまで培養した。ある程度増殖したら 100 mL M3/500 mL フラスコへ植菌し、再度 28°C で培養した。色素沈着が見られた段階で集菌し、次の実験に用いるまで -80 °C で保存した。

4-7. 形質転換

形質転換はすべて Bio-Rad の Gene Pulser Xcell を用いて行い、Ec3 プログラムを使用した 0.1 cm のギャップキュベットにて 3 kV, 3.5 秒, 600Ω でパルスを与えた。形質転換に用いるコンピテントセルは集菌した菌体を超純水で二回洗浄し 10 % (v/v) グリセロールで二回洗浄し、1.5 mL 10 % (v/v) グリセロールに懸濁して使用した。調製したコンピテントセルは -80 °C で保存していれば 3 ヶ月は使用できた。

EZ-Tn5 transposome 溶液およびシャトルベクターは菌体懸濁液 100 μL に対して 1 μL 添加して形質転換した。形質転換体はエレクトロポレーション後すぐに氷冷した M3 培地 1 mL に懸濁し、28 °C で 2 時間回復培養した。50 μg/mL カナマイシンもしくは 50 μg/mL アプラマイシンを含む M3 寒天培地に塗布し、28 °C で 3-5 日間静置培養した。EZ-Tn5 transposome 溶液およびシャトルベクターを添加していない菌体ではバックグラウンドと

していくつかのコロニーが形成されていた。これは *P. limnophilus* が多細胞ロゼットを形成するためであり、培地面に接していない菌体が存在したためだと考えられている。塗布する菌体数をコントロールすることでこの現象は抑制できた。

16S rDNA の解析および PCR に用いたプライマーはフォワードプライマー 5'- GAT TCC ACC TGA GGA GCG GCT -3', リバースプライマー 5'-GCA CGT GTG CAG CCC TAG ACA-3'である。PCR には KOD FX および KOD ONE を用いて、それぞれ製品に付属したプロトコルを用いて 3 ステップで PCR した。

参考文献

- 1 Jensen, R. A. ENZYME RECRUITMENT IN EVOLUTION OF NEW FUNCTION. *Annual Review of Microbiology* **30**, 409-425, doi:10.1146/annurev.mi.30.100176.002205 (1976).
- 2 Caetano-Anolles, G., Wang, M. W., Caetano-Anolles, D. & Mittenthal, J. E. The origin, evolution and structure of the protein world. *Biochemical Journal* **417**, 621-637, doi:10.1042/bj20082063 (2009).
- 3 Zubay, G. Origins of life on earth and in the cosmos. Second edition. *Origins of life on earth and in the cosmos. Second edition.*, i-xx, 1-564 (2000).
- 4 Gest, H. EVOLUTIONARY ROOTS OF THE CITRIC-ACID CYCLE IN PROKARYOTES. *Biochemical Society Symposia*, 3-16 (1987).
- 5 Huynen, M. A., Dandekar, T. & Bork, P. Variation and evolution of the citric acid cycle: a genomic perspective. *Trends in Microbiology* **7**, 281-291, doi:10.1016/s0966-842x(99)01539-5 (1999).
- 6 Pal, C., Papp, B. & Lercher, M. J. し ぜ *Nature Reviews Genetics* **7**, 337-348, doi:10.1038/nrg1838 (2006).
- 7 Orengo, C. A., Todd, A. E. & Thornton, J. M. From protein structure to function. *Current Opinion in Structural Biology* **9**, 374-382, doi:10.1016/s0959-440x(99)80051-7 (1999).
- 8 Konate, M. M. *et al.* Molecular function limits divergent protein evolution on planetary timescales. *Elife* **8**, 21, doi:10.7554/eLife.39705 (2019).
- 9 Hanukoglu, I. Proteopedia: Rossmann fold: A beta-alpha-beta fold at dinucleotide binding sites. *Biochemistry and Molecular Biology Education* **43**, 206-209, doi:10.1002/bmb.20849 (2015).
- 10 Nakatsu, T., Kato, H. & Oda, J. Crystal structure of asparagine synthetase reveals a close evolutionary relationship to class II aminoacyl-tRNA synthetase. *Nature Structural Biology* **5**, 15-19, doi:10.1038/nsb0198-15 (1998).
- 11 Feng, D. F. & Doolittle, R. F. Progressive alignment of amino acid sequences and construction of phylogenetic trees from them. *Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis* **266**, 368-382 (1996).
- 12 Williamson, M. P., 津本, 浩., 植田, 正. & 前仲, 勝. *Essential タンパク質科学*. (南江堂, 2016).
- 13 Murzin, A. G. CAN HOMOLOGOUS PROTEINS EVOLVE DIFFERENT ENZYMATIC-ACTIVITIES. *Trends in Biochemical Sciences* **18**, 403-405, doi:10.1016/0968-0004(93)90132-7 (1993).

- 14 James, L. C. & Tawfik, D. S. Catalytic and binding poly-reactivities shared by two unrelated proteins: The potential role of promiscuity in enzyme evolution. *Protein Science* **10**, 2600-2607, doi:10.1110/ps.ps.14601 (2001).
- 15 Jeffery, C. J. Enzymes, pseudoenzymes, and moonlighting proteins: diversity of function in protein superfamilies. *Febs Journal* **287**, 4141-4149, doi:10.1111/febs.15446 (2020).
- 16 Fani, R. The Origin and Evolution of Metabolic Pathways: Why and How did Primordial Cells Construct Metabolic Routes? *Evolution Education and Outreach* **5**, 367-381 (2012).
- 17 Schweizer, E. & Hofmann, J. Microbial type I fatty acid synthases (FAS): Major players in a network of cellular FAS systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**, 501-+, doi:10.1128/mmbr.68.3.501-517.2004 (2004).
- 18 McCarthy, A. D. & Hardie, D. G. FATTY-ACID SYNTHASE - AN EXAMPLE OF PROTEIN EVOLUTION BY GENE FUSION. *Trends in Biochemical Sciences* **9**, 60-63, doi:10.1016/0968-0004(84)90184-1 (1984).
- 19 Bukhari, H. S. T., Jakob, R. P. & Maier, T. Evolutionary Origins of the Multienzyme Architecture of Giant Fungal Fatty Acid Synthase. *Structure* **22**, 1775-1785, doi:10.1016/j.str.2014.09.016 (2014).
- 20 Matic, I. Evolution of gene fusions. *Trends in Microbiology* **10**, 311-311, doi:10.1016/s0966-842x(02)02389-2 (2002).
- 21 Hwang, K. S., Kim, H. U., Charusanti, P., Palsson, B. O. & Lee, S. Y. Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* **32**, 255-268, doi:10.1016/j.biotechadv.2013.10.008 (2014).
- 22 Smith, S. & Tsai, S. C. The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases. *Natural Product Reports* **24**, 1041-1072, doi:10.1039/b603600g (2007).
- 23 Tello, M., Kuzuyama, T., Heide, L., Noel, J. P. & Richard, S. B. The ABBA family of aromatic prenyltransferases: broadening natural product diversity. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**, 1459-1463, doi:10.1007/s00018-008-7579-3 (2008).
- 24 Fan, A. L., Winkelblech, J. & Li, S. M. Impacts and perspectives of prenyltransferases of the DMATS superfamily for use in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* **99**, 7399-7415, doi:10.1007/s00253-015-6813-9 (2015).
- 25 Huang, H. *et al.* Structure of a Membrane-Embedded Prenyltransferase Homologous to UBIAD1. *Plos Biology* **12**, 11, doi:10.1371/journal.pbio.1001911 (2014).

- 26 Pojer, F. *et al.* CloQ, a prenyltransferase involved in clorobiocin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 2316-2321, doi:10.1073/pnas.0337708100 (2003).
- 27 Metzger, U., Keller, S., Stevenson, C. E. M., Heide, L. & Lawson, D. M. Structure and Mechanism of the Magnesium-Independent Aromatic Prenyltransferase CloQ from the Clorobiocin Biosynthetic Pathway. *Journal of Molecular Biology* **404**, 611-626, doi:10.1016/j.jmb.2010.09.067 (2010).
- 28 Kuzuyama, T., Noel, J. P. & Richard, S. B. Structural basis for the promiscuous biosynthetic prenylation of aromatic natural products. *Nature* **435**, 983-987, doi:10.1038/nature03668 (2005).
- 29 Bonitz, T., Alva, V., Saleh, O., Lupas, A. N. & Heide, L. Evolutionary Relationships of Microbial Aromatic Prenyltransferases. *Plos One* **6**, doi:10.1371/journal.pone.0027336 (2011).
- 30 Tanner, M. E. Mechanistic studies on the indole prenyltransferases. *Natural Product Reports* **32**, 88-101, doi:10.1039/c4np00099d (2015).
- 31 Ozaki, T., Nishiyama, M. & Kuzuyama, T. Novel Tryptophan Metabolism by a Potential Gene Cluster That Is Widely Distributed among Actinomycetes. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 9946-9956, doi:10.1074/jbc.M112.436451 (2013).
- 32 Takahashi, S. *et al.* Biochemical Characterization of a Novel Indole Prenyltransferase from *Streptomyces* sp SN-593. *Journal of Bacteriology* **192**, 2839-2851, doi:10.1128/jb.01557-09 (2010).
- 33 Kobayashi, M., Tomita, T., Shin-ya, K., Nishiyama, M. & Kuzuyama, T. An Unprecedented Cyclization Mechanism in the Biosynthesis of Carbazole Alkaloids in *Streptomyces*. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **58**, 13349-13353, doi:10.1002/anie.201906864 (2019).
- 34 Schmidt, A. W., Reddy, K. R. & Knolker, H. J. Occurrence, Biogenesis, and Synthesis of Biologically Active Carbazole Alkaloids. *Chemical Reviews* **112**, 3193-3328, doi:10.1021/cr200447s (2012).
- 35 Kobayashi, M. & Kuzuyama, T. Recent Advances in the Biosynthesis of Carbazoles Produced by Actinomycetes. *Biomolecules* **10**, 14, doi:10.3390/biom10081147 (2020).
- 36 Huang, S. *et al.* Biosynthesis of Neocarazostatin A Reveals the Sequential Carbazole Prenylation and Hydroxylation in the Tailoring Steps. *Chemistry & Biology* **22**, 1633-1642, doi:10.1016/j.chembiol.2015.10.012 (2015).

- 37 中島潤 and 栗冠真紀子 and 木村哲哉 and, 栗. 嫌気性アンモニア酸化 (Anammox) 細菌の生態と生理. 三重大学大学院生物資源学研究科紀要 = *The bulletin of the Graduate School of Bioresources Mie University* 巻数なし, 27-37 (2008).
- 38 押木, 守., 佐藤, 久. & 岡部, 聡. 嫌気性アンモニア酸化(anammox)細菌の廃水処理への適用 (特集総説 極限生物たちが切り拓く未来の環境バイオテクノロジー). *Journal of environmental biotechnology* **14**, 21-29 (2014).
- 39 Giblin, A. E. *et al.* The Importance of Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium (DNRA) in the Nitrogen Cycle of Coastal Ecosystems. *Oceanography* **26**, 124-131, doi:10.5670/oceanog.2013.54 (2013).
- 40 Ye, R. W., Averill, B. A. & Tiedje, J. M. DENITRIFICATION - PRODUCTION AND CONSUMPTION OF NITRIC-OXIDE. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 1053-1058, doi:10.1128/aem.60.4.1053-1058.1994 (1994).
- 41 Strous, M., Kuenen, J. G. & Jetten, M. S. M. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 3248-3250 (1999).
- 42 Peeters, S. H. & van Niftrik, L. Trending topics and open questions in anaerobic ammonium oxidation. *Current Opinion in Chemical Biology* **49**, 45-52, doi:10.1016/j.cbpa.2018.09.022 (2019).
- 43 Broda, E. 2 KINDS OF LITHOTROPHS MISSING IN NATURE. *Zeitschrift Fur Allgemeine Mikrobiologie* **17**, 491-493, doi:10.1002/jobm.3630170611 (1977).
- 44 Mulder, A., Vandegraaf, A. A., Robertson, L. A. & Kuenen, J. G. ANAEROBIC AMMONIUM OXIDATION DISCOVERED IN A DENITRIFYING FLUIDIZED-BED REACTOR. *Fems Microbiology Ecology* **16**, 177-183, doi:10.1111/j.1574-6941.1995.tb00281.x (1995).
- 45 Jetten, M., Schmid, M., van de Pas-Schoonen, K., Damste, J. S. S. & Strous, M. Anammox organisms: Enrichment, cultivation, and environmental analysis. *Environmental Microbiology* **397**, 34-57, doi:10.1016/s0076-6879(05)97003-1 (2005).
- 46 Strous, M. *et al.* Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature* **440**, 790-794, doi:10.1038/nature04647 (2006).
- 47 Moss, F. R. *et al.* Ladderane phospholipids form a densely packed membrane with normal hydrazine and anomalously low proton/hydroxide permeability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**, 9098-9103, doi:10.1073/pnas.1810706115 (2018).

- 48 Javidpour, P. *et al.* Investigation of Proposed Ladderane Biosynthetic Genes from Anammox Bacteria by Heterologous Expression in E-coli. *Plos One* **11**, 21, doi:10.1371/journal.pone.0151087 (2016).
- 49 Mascitti, V. & Corey, E. J. Total synthesis of (+/-)-pentacycloanammoxic acid. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 15664-15665, doi:10.1021/ja044089a (2004).
- 50 Rattray, J. E. *et al.* A comparative genomics study of genetic products potentially encoding ladderane lipid biosynthesis. *Biology Direct* **4**, 16, doi:10.1186/1745-6150-4-8 (2009).
- 51 Schreier, H. J., Dejtsakdi, W., Escalante, J. O. & Brailo, M. Transposon Mutagenesis of *Planctomyces limnophilus* and Analysis of a *pckA* Mutant. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 7120-7123, doi:10.1128/aem.01794-12 (2012).
- 52 LaButti, K. *et al.* Complete genome sequence of *Planctomyces limnophilus* type strain (Mu 290(T)). *Standards in Genomic Sciences* **3**, 47-56, doi:10.4056/sigs.1052813 (2010).
- 53 Jogler, C., Glockner, F. O. & Kolter, R. Characterization of *Planctomyces limnophilus* and Development of Genetic Tools for Its Manipulation Establish It as a Model Species for the Phylum Planctomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* **77**, 5826-5829, doi:10.1128/aem.05132-11 (2011).
- 54 Boedeker, C. *et al.* Determining the bacterial cell biology of Planctomycetes. *Nature Communications* **8**, 14, doi:10.1038/ncomms14853 (2017).
- 55 Meksuriyen, D. & Cordell, G. A. BIOSYNTHESIS OF STAUROSPORINE .1. H-1-NMR AND C-13-NMR ASSIGNMENTS. *Journal of Natural Products* **51**, 884-892, doi:10.1021/np50059a012 (1988).
- 56 Pearce, C. J., Doyle, T. W., Forenza, S., Lam, K. S. & Schroeder, D. R. THE BIOSYNTHETIC ORIGINS OF REBECCAMYCIN. *Journal of Natural Products* **51**, 937-940, doi:10.1021/np50059a020 (1988).
- 57 Takada, K., Kajiwara, H. & Imamura, N. Oridamycins A and B, Anti-Saprolegnia parasitica Indolosesquiterpenes Isolated from *Streptomyces* sp KS84. *Journal of Natural Products* **73**, 698-701, doi:10.1021/np1000522 (2010).
- 58 Ding, L. *et al.* Xiamycin, a pentacyclic indolosesquiterpene with selective anti-HIV activity from a bacterial mangrove endophyte. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **20**, 6685-6687, doi:10.1016/j.bmcl.2010.09.010 (2010).

- 59 Howard-Jones, A. R. & Walsh, C. T. Staurosporine and rebeccamycin aglycones are assembled by the oxidative action of StaP, StaC, and RebC on chromopyrrolic acid. *Journal of the American Chemical Society* **128**, 12289-12298, doi:10.1021/ja063898m (2006).
- 60 Xu, Z. L., Baunach, M., Ding, L. & Hertweck, C. Bacterial Synthesis of Diverse Indole Terpene Alkaloids by an Unparalleled Cyclization Sequence. *Angewandte Chemie-International Edition* **51**, 10293-10297, doi:10.1002/anie.201204087 (2012).
- 61 Li, H. X. *et al.* Identification and Characterization of Xiamycin A and Oxiamycin Gene Cluster Reveals an Oxidative Cyclization Strategy Tailoring Indolosesquiterpene Biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* **134**, 8996-9005, doi:10.1021/ja303004g (2012).
- 62 Li, H. X. *et al.* Elucidating the Cyclization Cascades in Xiamycin Biosynthesis by Substrate Synthesis and Enzyme Characterizations. *Organic Letters* **17**, 306-309, doi:10.1021/ol503399b (2015).
- 63 Baunach, M., Ding, L., Willing, K. & Hertweck, C. Bacterial Synthesis of Unusual Sulfonamide and Sulfone Antibiotics by Flavoenzyme-Mediated Sulfur Dioxide Capture. *Angewandte Chemie-International Edition* **54**, 13279-13283, doi:10.1002/anie.201506541 (2015).
- 64 Feng, N. *et al.* Two new antifungal alkaloids produced by *Streptoverticillium morookaense*. *Journal of Antibiotics* **60**, 179-183, doi:10.1038/ja.2007.19 (2007).
- 65 Ruanpanun, P., Dame, Z. T., Laatsch, H. & Lumyong, S. 3-Methoxy-2-methyl-carbazole-1,4-quinone, carbazomycins D and F from *Streptomyces* sp CMU-JT005. *Fems Microbiology Letters* **322**, 77-81, doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02335.x (2011).
- 66 Shinya, K., Tanaka, M., Furihata, K., Hayakawa, Y. & Seto, H. STRUCTURE OF CARQUINOSTATIN A, A NEW NEURONAL CELL PROTECTING SUBSTANCE PRODUCED BY STREPTOMYCES-EXFOLIATUS. *Tetrahedron Letters* **34**, 4943-4944, doi:10.1016/s0040-4039(00)74052-4 (1993).
- 67 Kato, S. *et al.* STUDIES ON FREE-RADICAL SCAVENGING SUBSTANCES FROM MICROORGANISMS .1. CARAZOSTATIN, A NEW FREE-RADICAL SCAVENGER PRODUCED BY STREPTOMYCES-CHROMOFUSCUS DC-118. *Journal of Antibiotics* **42**, 1879-1881, doi:10.7164/antibiotics.42.1879 (1989).
- 68 Kato, S., Shindo, K., Kataoka, Y., Yamagishi, Y. & Mochizuki, J. STUDIES ON FREE-RADICAL SCAVENGING SUBSTANCES FROM MICROORGANISMS .2. NEOCARAZOSTATIN-A,

- NEOCARAZOSTATIN-B AND NEOCARAZOSTATIN-C, NOVEL FREE-RADICAL SCAVENGERS. *Journal of Antibiotics* **44**, 903-907, doi:10.7164/antibiotics.44.903 (1991).
- 69 Sakano, K. I., Ishimaru, K. & Nakamura, S. NEW ANTIBIOTICS, CARBAZOMYCINS-A AND CARBAZOMYCINS-B .1. FERMENTATION, EXTRACTION, PURIFICATION AND PHYSICOCHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES. *Journal of Antibiotics* **33**, 683-689, doi:10.7164/antibiotics.33.683 (1980).
- 70 Shinya, K. *et al.* Carquinostatin B, a new neuronal cell-protecting substance produced by *Streptomyces exfoliatus*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **61**, 1768-1769, doi:10.1271/bbb.61.1768 (1997).
- 71 Tanaka, M., Shinya, K., Furihata, K. & Seto, H. ISOLATION AND STRUCTURAL ELUCIDATION OF ANTIOXIDATIVE SUBSTANCES, CARBAZOQUINOCIN-A TO CARBAZOQUINOCIN-F. *Journal of Antibiotics* **48**, 326-328, doi:10.7164/antibiotics.48.326 (1995).
- 72 Palinski, W. *et al.* LOW-DENSITY LIPOPROTEIN UNDERGOES OXIDATIVE MODIFICATION INVIVO. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 1372-1376, doi:10.1073/pnas.86.4.1372 (1989).
- 73 Kaneda, M., Kitahara, T., Yamasaki, K. & Nakamura, S. BIOSYNTHESIS OF CARBAZOMYCIN-B .2. ORIGIN OF THE WHOLE CARBON SKELETON. *Journal of Antibiotics* **43**, 1623-1626, doi:10.7164/antibiotics.43.1623 (1990).
- 74 Orihara, N., Furihata, K. & Seto, H. Studies on the biosynthesis of terpenoidal compounds produced by actinomycetes .2. Biosynthesis of carquinostatin B via the non-mevalonate pathway in *Streptomyces exfoliatus*. *Journal of Antibiotics* **50**, 979-981, doi:10.7164/antibiotics.50.979 (1997).
- 75 Poulter, C. D. BIOSYNTHESIS OF NON-HEAD-TO-TAIL TERPENES - FORMATION OF 1'-1 AND 1'-3 LINKAGES. *Accounts of Chemical Research* **23**, 70-77, doi:10.1021/ar00171a003 (1990).
- 76 Blagg, B. S. J., Jarstfer, M. B., Rogers, D. H. & Poulter, C. D. Recombinant squalene synthase. A mechanism for the rearrangement of presqualene diphosphate to squalene. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 8846-8853, doi:10.1021/ja020411a (2002).
- 77 Brown, G. R. *et al.* Novel optimised quinuclidine squalene synthase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **7**, 597-600, doi:10.1016/s0960-894x(97)00053-x (1997).

- 78 Petras, S. F., Lindsey, S. & Harwood, H. J. HMG-CoA reductase regulation: use of structurally diverse first half-reaction squalene synthetase inhibitors to characterize the site of mevalonate-derived nonsterol regulator production in cultured IM-9 cells. *Journal of Lipid Research* **40**, 24-38 (1999).
- 79 Washburn, W. N. & Kow, R. INVESTIGATIONS OF SUBSTRATE-SPECIFICITY OF SQUALENE SYNTHETASE. *Tetrahedron Letters*, 1555-1558 (1977).
- 80 Ortizdemontellano, P. R., Wei, J. S., Vinson, W. A., Castillo, R. & Boparai, A. S. SUBSTRATE SELECTIVITY OF SQUALENE SYNTHETASE. *Biochemistry* **16**, 2680-2685, doi:10.1021/bi00631a015 (1977).
- 81 Mookhtiar, K. A., Kalinowski, S. S., Zhang, D. L. & Poulter, C. D. YEAST SQUALENE SYNTHASE - A MECHANISM FOR ADDITION OF SUBSTRATES AND ACTIVATION BY NADPH. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 11201-11207 (1994).
- 82 Popjak, G. & Agnew, W. S. SQUALENE SYNTHETASE. *Molecular and Cellular Biochemistry* **27**, 97-116 (1979).
- 83 Pandit, J. *et al.* Crystal structure of human squalene synthase - A key enzyme in cholesterol biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **275**, 30610-30617, doi:10.1074/jbc.M004132200 (2000).
- 84 Liu, C. I. *et al.* Structural insights into the catalytic mechanism of human squalene synthase. *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* **70**, 231-241, doi:10.1107/s1399004713026230 (2014).
- 85 Wendt, K. U. & Schulz, G. E. Isoprenoid biosynthesis: manifold chemistry catalyzed by similar enzymes. *Structure* **6**, 127-133, doi:10.1016/s0969-2126(98)00015-x (1998).
- 86 Lesburg, C. A., Zhai, G. Z., Cane, D. E. & Christianson, D. W. Crystal structure of pentalenene synthase: Mechanistic insights on terpenoid cyclization reactions in biology. *Science* **277**, 1820-1824, doi:10.1126/science.277.5333.1820 (1997).
- 87 Gu, P. D., Ishii, Y., Spencer, T. A. & Shechter, I. Function-structure studies and identification of three enzyme domains involved in the catalytic activity in rat hepatic squalene synthase. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 12515-12525, doi:10.1074/jbc.273.20.12515 (1998).
- 88 Lin, F. Y. *et al.* Mechanism of action and inhibition of dehydrosqualene synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 21337-21342, doi:10.1073/pnas.1010907107 (2010).

- 89 Zhao, R. Y., Xiao, W., Cheng, H. L., Zhu, P. & Cheng, K. D. Cloning and characterization of squalene synthase gene from *Fusarium fujikuroi* (Saw.) Wr. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **37**, 1171-1182, doi:10.1007/s10295-010-0764-z (2010).
- 90 Liang, P. H. Reaction Kinetics, Catalytic Mechanisms, Conformational Changes, and Inhibitor Design for Prenyltransferases. *Biochemistry* **48**, 6562-6570, doi:10.1021/bi900371p (2009).
- 91 Rondeau, J. M. *et al.* Structural basis for the exceptional in vivo efficacy of bisphosphonate drugs. *Chemmedchem* **1**, 267-273, doi:10.1002/cmdc.200500059 (2006).
- 92 Guo, R. T. *et al.* Bisphosphonates target multiple sites in both cis- and trans-prenyltransferases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 10022-10027, doi:10.1073/pnas.0702254104 (2007).
- 93 Hyatt, D. C. *et al.* Structure of limonene synthase, a simple model for terpenoid cyclase catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 5360-5365, doi:10.1073/pnas.0700915104 (2007).
- 94 Pan, J. J., Bugni, T. S. & Poulter, C. D. Recombinant Squalene Synthase. Synthesis of Cyclopentyl Non-Head-to-Tail Triterpenes. *Journal of Organic Chemistry* **74**, 7562-7565, doi:10.1021/jo9014547 (2009).
- 95 Liu, C. I., Jeng, W. Y., Chang, W. J., Ko, T. P. & Wang, A. H. J. Binding Modes of Zaragozic Acid A to Human Squalene Synthase and Staphylococcal Dehydrosqualene Synthase. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 18750-18757, doi:10.1074/jbc.M112.351254 (2012).
- 96 Umeno, D. & Arnold, F. H. Evolution of a pathway to novel long-chain carotenoids. *Journal of Bacteriology* **186**, 1531-1536, doi:10.1128/jb.186.5.1531-1536.2004 (2004).
- 97 Vining, L. C. ROLES OF SECONDARY METABOLITES FROM MICROBES. *Ciba Foundation Symposia* **171**, 184-198 (1992).
- 98 Firn, R. D. & Jones, C. G. The evolution of secondary metabolism - a unifying model. *Molecular Microbiology* **37**, 989-994, doi:10.1046/j.1365-2958.2000.02098.x (2000).
- 99 Chappell, J. BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR-BIOLOGY OF THE ISOPRENOID BIOSYNTHETIC-PATHWAY IN PLANTS. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**, 521-547, doi:10.1146/annurev.pp.46.060195.002513 (1995).
- 100 Mori, T. Enzymatic studies on aromatic prenyltransferases. *Journal of Natural Medicines* **74**, 501-512, doi:10.1007/s11418-020-01393-x (2020).

- 101 Saleh, O., Haagen, Y., Seeger, K. & Heide, L. Prenyl transfer to aromatic substrates in the biosynthesis of aminocoumarins, meroterpenoids and phenazines: The ABBA prenyltransferase family. *Phytochemistry* **70**, 1728-1738, doi:10.1016/j.phytochem.2009.05.009 (2009).
- 102 Grundmann, A., Kuznetsova, T., Afiyatullo, S. S. & Li, S. M. FtmPT2, an N-prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*, catalyses the last step in the biosynthesis of fumitremorgin B. *Chembiochem* **9**, 2059-2063, doi:10.1002/cbic.200800240 (2008).
- 103 Schultz, A. W., Lewis, C. A., Luzung, M. R., Baran, P. S. & Moore, B. S. Functional Characterization of the Cyclomarin/Cyclomarazine Prenyltransferase CymD Directs the Biosynthesis of Unnatural Cyclic Peptides. *Journal of Natural Products* **73**, 373-377, doi:10.1021/np9006876 (2010).
- 104 Ding, Y. S. *et al.* Genome-Based Characterization of Two Prenylation Steps in the Assembly of the Stephacidin and Notoamide Anticancer Agents in a Marine-Derived *Aspergillus* sp. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 12733-12740, doi:10.1021/ja1049302 (2010).
- 105 Unsold, I. A. & Li, S. M. Reverse prenyltransferase in the biosynthesis of fumigaclavine C in *Aspergillus fumigatus*: Gene expression, purification, and characterization of fumigaclavine C synthase FGAPT1. *Chembiochem* **7**, 158-164, doi:10.1002/cbic.200500318 (2006).
- 106 Grundmann, A. & Li, S. M. Overproduction, purification and characterization of FtmPT1, a brevianamide F prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology-Sgm* **151**, 2199-2207, doi:10.1099/mic.0.27962-0 (2005).
- 107 Schuller, J. M. *et al.* Structure and Catalytic Mechanism of a Cyclic Dipeptide Prenyltransferase with Broad Substrate Promiscuity. *Journal of Molecular Biology* **422**, 87-99, doi:10.1016/j.jmb.2012.05.033 (2012).
- 108 Yin, W. B., Grundmann, A., Cheng, J. & Li, S. M. Acetylaszonalenin Biosynthesis in *Neosartorya fischeri* IDENTIFICATION OF THE BIOSYNTHETIC GENE CLUSTER BY GENOMIC MINING AND FUNCTIONAL PROOF OF THE GENES BY BIOCHEMICAL INVESTIGATION. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 100-109, doi:10.1074/jbc.M807606200 (2009).
- 109 Yu, X., Liu, Y., Xie, X. L., Zheng, X. D. & Li, S. M. Biochemical Characterization of Indole Prenyltransferases FILLING THE LAST GAP OF PRENYLATION POSITIONS BY A 5-DIMETHYLALLYLTRYPHOPHAN SYNTHASE FROM *ASPERGILLUS CLAVATUS*. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 1371-1380, doi:10.1074/jbc.M111.317982 (2012).

- 110 Winkelblech, J. & Li, S. M. Biochemical Investigations of Two 6-DMATS Enzymes from Streptomyces Reveal New Features of L-Tryptophan Prenyltransferases. *Chembiochem* **15**, 1030-1039, doi:10.1002/cbic.201400046 (2014).
- 111 Miyamoto, K. *et al.* A 7-dimethylallyl tryptophan synthase from a fungal Neosartorya sp.: Biochemical characterization and structural insight into the regioselective prenylation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **22**, 2517-2528, doi:10.1016/j.bmc.2014.02.031 (2014).
- 112 Luk, L. Y. P. & Tanner, M. E. Mechanism of Dimethylallyltryptophan Synthase: Evidence for a Dimethylallyl Cation Intermediate in an Aromatic Prenyltransferase Reaction. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 13932-+, doi:10.1021/ja906485u (2009).
- 113 Metzger, U. *et al.* The structure of dimethylallyl tryptophan synthase reveals a common architecture of aromatic prenyltransferases in fungi and bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 14309-14314, doi:10.1073/pnas.0904897106 (2009).
- 114 Elshahawi, S. I. *et al.* Structure and specificity of a permissive bacterial C-prenyltransferase. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 366-+, doi:10.1038/nchembio.2285 (2017).
- 115 Mascitti, V. & Corey, E. J. Enantioselective synthesis of pentacycloanammoxic acid. *Journal of the American Chemical Society* **128**, 3118-3119, doi:10.1021/ja058370g (2006).
- 116 Sofia, H. J., Chen, G., Hetzler, B. G., Reyes-Spindola, J. F. & Miller, N. E. Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Research* **29**, 1097-1106, doi:10.1093/nar/29.5.1097 (2001).
- 117 Vey, J. L. & Drennan, C. L. Structural Insights into Radical Generation by the Radical SAM Superfamily. *Chemical Reviews* **111**, 2487-2506, doi:10.1021/cr9002616 (2011).
- 118 Magnusson, O. T. & Frey, P. A. Interactions of diol dehydrase and 3',4'-anhydroadenosylcobalamin: Suicide inactivation by electron transfer. *Biochemistry* **41**, 1695-1702, doi:10.1021/bi011947w (2002).
- 119 Magnusson, O. T., Reed, G. H. & Frey, P. A. Characterization of an allylic analogue of the 5'-deoxyadenosyl radical: An intermediate in the reaction of lysine 2,3-aminomutase. *Biochemistry* **40**, 7773-7782, doi:10.1021/bi0104569 (2001).
- 120 Moss, M. & Frey, P. A. THE ROLE OF S-ADENOSYLMETHIONINE IN THE LYSINE 2,3-AMINOMUTASE REACTION. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 14859-14862 (1987).

- 121 Duschene, K. S., Veneziano, S. E., Silver, S. C. & Broderick, J. B. Control of radical chemistry in the AdoMet radical enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology* **13**, 74-83, doi:10.1016/j.cbpa.2009.01.022 (2009).
- 122 Marsh, E. N. G., Patterson, D. P. & Li, L. Adenosyl Radical: Reagent and Catalyst in Enzyme Reactions. *Chembiochem* **11**, 604-621, doi:10.1002/cbic.200900777 (2010).
- 123 Byer, A. S. *et al.* Paradigm Shift for Radical S-Adenosyl-L-methionine Reactions: The Organometallic Intermediate Omega Is Central to Catalysis. *Journal of the American Chemical Society* **140**, 8634-8638, doi:10.1021/jacs.8b04061 (2018).
- 124 Nicolet, Y. Structure-function relationships of radical SAM enzymes. *Nature Catalysis* **3**, 337-350, doi:10.1038/s41929-020-0448-7 (2020).
- 125 Layer, G., Heinz, D. W., Jahn, D. & Schubert, W. D. Structure and function of radical SAM enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology* **8**, 468-476, doi:10.1016/j.cbpa.2004.08.001 (2004).
- 126 Bridwell-Rabb, J., Zhong, A. S., Sun, H. G., Drennan, C. L. & Liu, H. W. A B-12-dependent radical SAM enzyme involved in oxetanocin A biosynthesis. *Nature* **544**, 322-U321, doi:10.1038/nature21689 (2017).
- 127 Izuta, S. *et al.* INHIBITORY EFFECTS OF TRIPHOSPHATE DERIVATIVES OF OXETANOCIN-G AND RELATED-COMPOUNDS ON EUKARYOTIC AND VIRAL-DNA POLYMERASES AND HUMAN-IMMUNODEFICIENCY-VIRUS REVERSE-TRANSCRIPTASE. *Journal of Biochemistry* **112**, 81-87, doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123870 (1992).
- 128 Zhong, A. S., Lee, Y. H., Liu, Y. N. & Liu, H. W. Biosynthesis of Oxetanocin-A Includes a B-12-Dependent Radical SAM Enzyme That Can Catalyze both Oxidative Ring Contraction and the Demethylation of SAM. *Biochemistry* **60**, 537-546, doi:10.1021/acs.biochem.0c00915 (2021).
- 129 Ye, Y. X., Fu, H. G. & Hyster, T. K. Activation modes in biocatalytic radical cyclization reactions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **48**, 18, doi:10.1093/jimb/kuab021 (2021).
- 130 Wang, B. & Li, D. Y. Structure and Catalytic Mechanism of Cytochrome P450. *Chinese Journal of Organic Chemistry* **29**, 658-662 (2009).
- 131 Martinez, S. & Hausinger, R. P. Catalytic Mechanisms of Fe(II)-and 2-Oxoglutarate-dependent Oxygenases. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 20702-20711, doi:10.1074/jbc.R115.648691 (2015).

- 132 Cochrane, R. V. K. & Vederas, J. C. Highly Selective but Multifunctional Oxygenases in Secondary Metabolism. *Accounts of Chemical Research* **47**, 3148-3161, doi:10.1021/ar500242c (2014).
- 133 Denisov, I. G., Makris, T. M., Sligar, S. G. & Schlichting, I. Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chemical Reviews* **105**, 2253-2277, doi:10.1021/cr0307143 (2005).
- 134 Rudolf, J. D., Chang, C. Y., Ma, M. & Shen, B. Cytochromes P450 for natural product biosynthesis in Streptomyces: sequence, structure, and function. *Natural Product Reports* **34**, 1141-1172, doi:10.1039/c7np00034k (2017).
- 135 Urlacher, V. B. & Girhard, M. Cytochrome P450 Monooxygenases in Biotechnology and Synthetic Biology. *Trends in Biotechnology* **37**, 882-897, doi:10.1016/j.tibtech.2019.01.001 (2019).
- 136 McLean, K. J., Luciakova, D., Belcher, J., Tee, K. L. & Munro, A. W. in *Monoxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Mechanisms of Cytochrome P450* Vol. 851 *Advances in Experimental Medicine and Biology* (eds E. G. Hrycay & S. M. Bandiera) 299-317 (Springer-Verlag Berlin, 2015).
- 137 de Montellano, P. R. O. Hydrocarbon Hydroxylation by Cytochrome P450 Enzymes. *Chemical Reviews* **110**, 932-948, doi:10.1021/cr9002193 (2010).
- 138 Belin, P. *et al.* Identification and structural basis of the reaction catalyzed by CYP121, an essential cytochrome P450 in Mycobacterium tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 7426-7431, doi:10.1073/pnas.0812191106 (2009).
- 139 Yim, G., Thaker, M. N., Koteva, K. & Wright, G. Glycopeptide antibiotic biosynthesis. *Journal of Antibiotics* **67**, 31-41, doi:10.1038/ja.2013.117 (2014).
- 140 Hausinger, R. P. in *2-Oxoglutarate-Dependent Oxygenases* (eds R. P. Hausinger & C. J. Schofield) 1-58 (Royal Soc Chemistry, 2015).
- 141 Loenarz, C. & Schofield, C. J. Expanding chemical biology of 2-oxoglutarate oxygenases. *Nature Chemical Biology* **4**, 152-156, doi:10.1038/nchembio0308-152 (2008).
- 142 Hegg, E. L. & Que, L. The 2-His-1-carboxylate facial triad - An emerging structural motif in mononuclear non-heme iron(II) enzymes. *European Journal of Biochemistry* **250**, 625-629, doi:10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00625.x (1997).
- 143 Gao, S. S., Naowarajna, N., Cheng, R. H., Liu, X. T. & Liu, P. H. Recent examples of -ketoglutarate-dependent mononuclear non-haem iron enzymes in natural product biosyntheses. *Natural Product Reports* **35**, 792-837, doi:10.1039/c7np00067g (2018).

- 144 Herr, C. Q. & Hausinger, R. P. Amazing Diversity in Biochemical Roles of Fe(II)/2-Oxoglutarate Oxygenases. *Trends in Biochemical Sciences* **43**, 517-532, doi:10.1016/j.tibs.2018.04.002 (2018).
- 145 Zwick, C. R. & Renata, H. Harnessing the biocatalytic potential of iron- and alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases in natural product total synthesis. *Natural Product Reports* **37**, 1065-1079, doi:10.1039/c9np00075e (2020).
- 146 Chekan, J. R. *et al.* Scalable Biosynthesis of the Seaweed Neurochemical, Kainic Acid. *Angewandte Chemie-International Edition* **58**, 8454-8457, doi:10.1002/anie.201902910 (2019).
- 147 Hashimoto, T. & Yamada, Y. HYOSCYAMINE 6-BETA-HYDROXYLASE, A 2-OXOGLUTARATE-DEPENDENT DIOXYGENASE, IN ALKALOID-PRODUCING ROOT CULTURES. *Plant Physiology* **81**, 619-625, doi:10.1104/pp.81.2.619 (1986).
- 148 Zhang, L. *et al.* Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 6786-6791, doi:10.1073/pnas.0401391101 (2004).

終章

本研究では微生物の天然物生合成系に見られる機能と多様化について構造生物学的な視点から調査した。酵素が受け入れる基質の多様化については芳香環にプレニル基を転移する酵素 IptA, CqsB4, LvqB4 を研究対象としてその結晶構造を解明し、詳細な解析によって反応メカニズムの提案や新規化合物創出への知見の提供などができた。酵素の機能多様化には未知の部分がまだまだ多く存在している。これらの解明への足がかりとして自然界におけるインドールアルカロイド生合成、カルバゾールアルカロイド生合成の普遍性、これらの生合成機構の多様性の一端を解明できたと考えている。複雑な炭素骨格に窒素原子を含むアルカロイド系天然物は重要な創薬資源であり、構造多様性を生み出す多彩な二次代謝経路や酵素反応の理解につながるだろう。

また既存の酵素に加えて新たな酵素が加えられることで新たな物質生産系が作り出される例としてアナモックス菌のラダラン脂質生合成経路の解明を目指し、その生合成推定鍵酵素について構造解析への実験基盤を構築した。新規異種発現系の構築にも着手し、これまでに明らかにされていなかったラダラン脂質の生合成についてこれからの実験を加速しうる系を構築できた。これが構築できればラダラン脂質の生合成のみならず、大腸菌での異種発現が困難なタンパク質を必要とする生合成経路の解明にも応用できるだろう。

近年の構造生物学研究の成長は目覚ましく、Cryo-EM を用いた超巨大タンパク質複合体の構造解析や、時分割 X 線解析による反応過程の可視化、さらに人工知能による精密な構造予測など、ここ数年で飛躍的な成果を出してきた。

特に AlphaFold2 による構造予測の精度は高く、LvqB4 は未発表の新規構造であったにも関わらず、実際の構造と変わらない予測結果を示している。

これまでに我々は、生合成の設計図を読み解く研究を行ってきたが、今後は新しい設計図を書くという、方向に飛躍的な展開が期待できるのではないだろうか。

アミノ酸配列やタンパク質の合理的デザインによる人為的な天然物様機能分子の自由な創成による所謂、真のタンパク質工学、ができる時代がそう遠くない未来に訪れるのではないだろうか。

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、佐藤祐介テニュアトラック講師、及び今までのメンバーに深く感謝致します。

東京大学 大学院 農学生命科学研究科 葛山智久教授、並びに東京大学 大学院農学生命科学研究科 日本学術振興会特別研究員 永田隆平研究員には、ベクター等のサンプルや結晶化に必要な備品の提供、及びCqsB4, LvqB4の活性測定を行なって頂き、実験方針の相談等で大変お世話になりました。心より感謝を申し上げます。

理化学研究所 環境資源科学研究センター 天然物生合成ユニット ユニットリーダーの高橋俊二先生、及びスタッフ一同には、研究を進めるにあたって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。*P. limnophilus*の実験系の立ち上げがスムーズに行えるよう取りはからって頂いたことで、滑り出しよく実験に取り組みました。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の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、岡本賢治教授、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。