

アナモックス菌が生産する複雑な梯子状疎水基の
構築メカニズムの解明に関する研究

2022年12月15日

工学研究科

化学・生物応用工学専攻

D19T3003U

上垣哲心

目次

1 章 序論	3
1-1. はじめに	3
1-2. アナモックス菌の細胞構造と生育	4
1-3. アナモックス反応を担う酵素の構造と反応機構	6
1-4. ラダラン脂質	10
1-5. II型脂肪酸合成とラダラン脂質合成	12
1-6. 本研究の目的	21
2 章 アナモックス菌の SAM MTase の結晶構造解析と ACP との相互作用について	22
2-1. 緒言	22
2-2. ACP 固定化担体の作製	24
2-3. AmxMT1 と ACP の相互作用	24
2-4. AmxMT1 の結晶構造	25
2-5. ACP-SAM AmxMT1 複合体モデルを用いた ACP-AmxMT1 間の相互作用の考察	28
2-6. ドッキングシミュレーションによる AmxMT1 の基質の推定	35
2-7. 実験手法	36
3 章 アナモックス菌のネイティブ ACP に対する抗体の作製と ACP の精製	40
3-1. 緒言	40
3-2. アナモックス菌の培養	41
3-3. アナモックス菌の総脂質の分析	42
3-4. 抗 ACP 抗体の作製・精製	44
3-5. AmxACP の発現確認及び精製	44
3-6. 実験操作	45
4 章 アナモックス菌由来 ACP と相互作用する酵素の同定に向けた近接依存性標識	48
4-1 緒言	48
4-2 ACP 融合 MiniTurbo によるアナモックス菌破碎液上清に対する標識	50
4-3 ACP 融合 APEX による ACPS を発現させた大腸菌破碎液上清及びアナモックス菌破碎液上清に対する標識	50
4-4. ACP 融合 AirID による ACPS を発現させた大腸菌破碎液に対する近接依存性標識	53
4-5. ACP 融合 AirID による AmxMT1 を発現させた大腸菌破碎液、及びアナモックス菌破碎液に対する近接依存性標識	53
4-6 実験操作	56
5 章 結言	60
参考文献	61

1 章 序論

1-1. はじめに

環境中の窒素化合物は微生物による変換によって環境中を循環している。従来、この窒素循環は根粒菌などによって行われる窒素固定、好気条件下で硝化細菌によって行われる硝化、嫌気条件下で脱窒菌によって行われる脱窒の経路から成り立っていると考えられていたが、これらの経路に加えて、嫌気条件下で、亜硝酸とアンモニアから窒素ガスを生成する嫌気性アンモニア酸化 (anaerobic ammonium oxidization, アナモックス反応) とこの窒素代謝を行うアナモックス菌が 1995 年に発見された (図.1) (1-3)。特に、嫌気的な海域における固定化窒素の大気中への放出の約 50%をアナモックス菌が担うと見積もられており(1)、アナモックス菌は環境中の窒素循環において非常に重要である。また、従来のアンモニアを含む排水の処理は硝化と脱窒の二段階反応により行われており、硝化には曝気が必要であり、脱窒には脱窒菌の栄養源として有機物が必要である。これに対して、アナモックスを用いた排水の窒素除去は曝気、有機物の添加を必要とせず、また、反応槽も一つで良いため、低コストで、環境負荷が小さい手法としてヨーロッパなどで広く普及している。

また、アナモックス菌は還元力が非常に高く多くの生物にとって有害なヒドラジンを生産すること、他の天然物には見られない複雑な骨格を有するラダラン脂質を生産するなど (2)、アナモックス反応以外にも物質生産に関する学術的、工業的に価値のある知見が得られることが期待できるため、アナモックス菌に関する多くの研究がなされてきた。序論ではアナモックス菌の特徴、及び、ラダラン脂質について述べる。

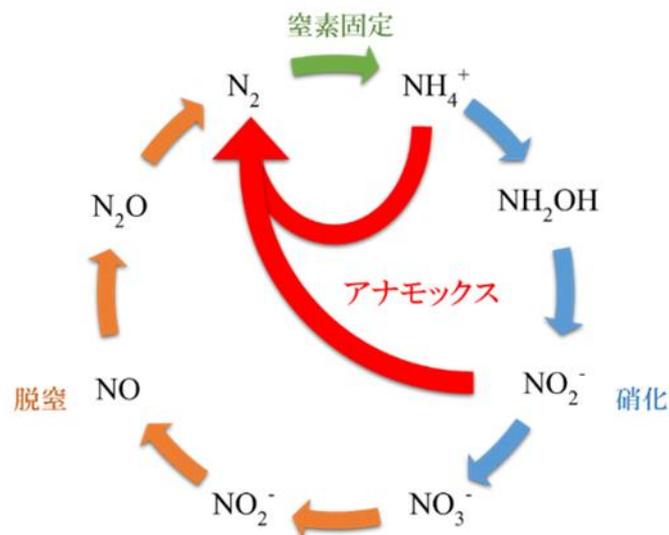


図1. 窒素循環とアナモックス

1-2. アナモックス菌の細胞構造と生育

環境中の窒素化合物は微生物による返還を経て環境中を循環している。従来、この窒素循環は根粒菌などによって行われる窒素固定、好気条件下で硝化細菌によって行われる硝化、嫌気条件下で脱窒菌によって行われる脱窒の経路から成り立っていると考えられていた。しかし、20世紀半ばごろ、度々、海洋学者によって無酸素の海域から、従来の窒素循環では説明のつかないアンモニアの消失が報告され(4)、Brodaらは硝酸または亜硝酸を酸化剤としてエネルギー代謝の最終産物である窒素ガスの生成に用いる化学合成微生物が存在することを予測した(5)。硝化ではアンモニアは好気性アンモニア酸化細菌もしくはアーキアによってヒドロキシルアミンへと変換される。当時、不活性なアンモニアを活性化するために酸素は必須であると考えられていたため、多くの研究者はBrodaらの予測に対して懐疑的であった。同様のアンモニアの消失はオランダのGist-Brocades yeast factoryの嫌気性のリアクター内においてもみられ、その後の研究により、1995年に嫌気条件下で亜硝酸とアンモニアから窒素ガスを生産する嫌気性アンモニア酸化(アナモックス)菌が1995年に初めて発見された(3)。現在に至るまで、*Brocadia*属、*Kuenenia*属、*Jettenia*属、*Anammoxoglobus*属、*Scalindua*属の5属のアナモックス菌が発見されており、これらは進化系統樹において他の生物と早期に分岐しており、アナモックスにより生育に必要なATPを得るなど、他の生物とは大きく異なる特徴を有する(6)。

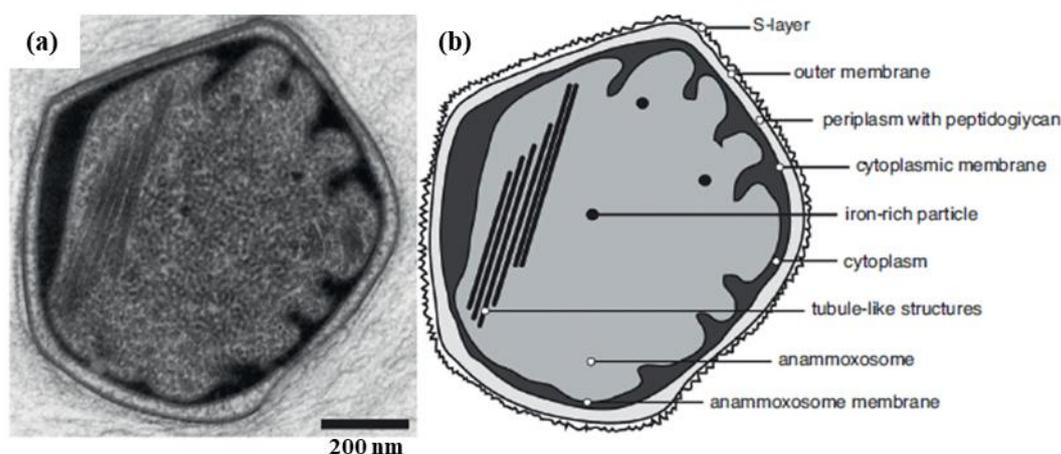


図2. アナモックス菌の細胞構造

(a) はアナモックス菌の電子顕微鏡画像を、(b) はその模式図を示す(2)。

アナモックス菌の細胞は3つの細胞内区画(アナモキシソーム、サイトプラズム、ペリプラズム)から成り立つ(図2)(1, 2)。アナモキシソームはサイトプラズム内に存在し、アナモキシソーム膜と呼ばれる脂質二重膜でサイトプラズムと隔てられており、これは細胞体積の50-70%を占める(2)。標準的な電子顕微鏡による観察では、ペプチドグリカン層が見えなかったことから、アナモックス菌はペプチドグリカンを有していないと考えられていたが、近年、クライオ電子顕微鏡観察や、SDS存在下で細胞を煮沸させることによりペプチドグリカンの糖主鎖を切断するリゾチームにより分解される成分が得られることなどによ

り、アナモックス菌はペプチドグリカンを含むグラム陰性菌であると定義された (7)。また、クライオ電子顕微鏡画像では、アナモックス菌の外膜はS層と呼ばれる表層タンパク質層に覆われていることが明らかとなった (8)。S層はバクテリアやアーキアに見られ、その機能として細胞の保護や形状の安定化、細胞間の接着などが挙げられる (9)。アナモックス菌 *Kuenenia stuttgartiensis* のS層は *kustd1514* によってコードされるタンパク質をサブユニットとする六方対称性の複合体によって形成されることが明らかとなっている (10)。アナモックス菌は浸透圧に対して脆弱であること、及びペプチドグリカン層が電子顕微鏡法では見えないほど薄いことからS層は細胞の形状維持のために存在すると提唱されている (10)。しかし、実験室の環境下ではアナモックス菌はS層を失うことがあり (9)、それにもかかわらずアナモックス菌が生育可能であることから、生理的役割は明らかとはなっていない。

アナモックス菌は、多糖, (糖) タンパク質, 核酸, 脂質などを含む細胞外高分子化合物 (Extracellular polymeric substances, EPS) を放出することによって細胞同士が凝集した形での生育を好む (11, 12)。他のバクテリアにおいて、凝集及びバイオフィルムの形成は *cyclic di-GMP* (c-di-GMP) の濃度に依存する (13)。アナモックス菌の浮遊細胞も同様に、低温、酸性条件、酸素の供給、高濃度の窒素供給などのストレスにตอบสนองして、細胞内のc-di-GMP濃度が上昇し、凝集体を形成する (14)。EPSの組成や特性はアナモックス菌の種間で若干異なるが、一般的にアナモックス菌のEPSは多くの疎水性の官能基を有しており、他のバクテリアのEPSと比較して、より多くのタンパク質を含み、疎水的である。これらの特性は凝集能を高める (15, 16)。

アナモキソソームの内部では ATP 合成のための窒素代謝が行われ、これにより、アナモキソソーム-サイトゾル間にプロトン濃度勾配が生じる。アナモックスは亜硝酸の一酸化窒素への還元、亜硝酸とアンモニアのヒドラジンへの変換、及びヒドラジンの窒素ガスへの

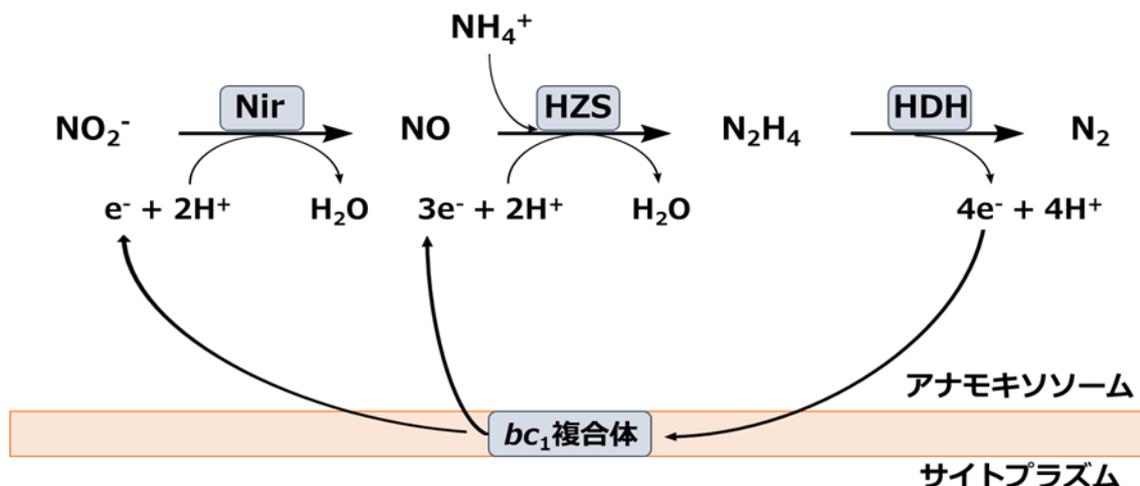


図3. アナモックスと電子伝達

簡略化したアナモキソソーム内の反応、これを担う酵素、および現在提唱されているアナモキソソーム膜を介した電子伝達を示す。Nir: 亜硝酸還元酵素, HZS: ヒドラジン合成酵素, HDH: ヒドラジン脱水素酵素

変換の3段階の反応から成り立つ(図3)。これらの反応を担う、ヒドラジン合成酵素(HZS)、ヒドラジン脱水素酵素(HDH)、亜硝酸還元酵素(Nir)はアナモキソソームに、ATP合成酵素及びプロトン駆動力を形成するためのプロトンポンプである bc_1 複合体はアナモキソソーム膜に局在している(17)。ヒドラジンの分子状窒素への酸化によって得られた電子は、電子伝達タンパク質、キノンなどを介して亜硝酸の還元及び、ヒドラジンの合成に用いられる(2)。この際、アナモキソソーム膜に存在する bc_1 複合体がキノンの酸化によって得られるエネルギーを用いてプロトンをサイトゾルからアナモキソソームへと汲み出し、プロトン濃度勾配が形成されると推定されている(2)。実際に、アナモックス菌から単離したアナモキソソームは、アナモックス反応を行うことが確認されている(18)。しかし、その N_2 生産活性はアナモックス菌細胞と比較して著しく低く、ヒドラジンを供給した場合のみアナモックス菌細胞と同程度であった。これは、アナモックス反応を担う酵素は電子伝達を必要とし、単離されたアナモキソソームでは、NADHやフェレドキシンなどの電子伝達系が適切に機能しないためであると考えられる。

1-3. アナモックス反応を担う酵素の構造と反応機構

前述のとおり、アナモックスは亜硝酸の一酸化窒素への還元、亜硝酸とアンモニアを用いたヒドラジンの合成、及びヒドラジンの分子状窒素への変換の3段階の反応から成り立つ。NOはアナモックスのみならず、脱窒においても重要な中間体であり、脱窒菌では、ヘムタンパク質NirS(19, 20)もしくは銅含有タンパク質NirK(21)によって亜硝酸が還元され、NOが生じる。アナモックス菌*K. stuttgartiensis*において、これらのヘムタンパク質の発現量は他の代謝の鍵酵素と比べて少ない(22-24)。一方で、*Scalindua*属においてNirSの発現量は多く(25)、*Jettenia*属のゲノムにはNirKのみがコードされており(26)、*Brocadia*属のゲノムには既知の亜硝酸還元酵素が存在していない(27)。これらのことから、様々なアナモックス菌において亜硝酸還元の共通したメカニズムは存在しておらず、また、未知の亜硝酸還元酵素が存在すると考えられる。アナモックス菌のゲノムには10または11個のヒドロキシルアミン酸化酵素(HAO)と相同性を示す酵素が保存されている(28)。好気性アンモニア酸化細菌*Nitromonas europaea*由来HAO(NeHAO)は8個のc型ヘムを有するサブユニットから成るホモ三量体である(図4a)(29)。8個のヘムの内7つは第5配位子と第6配位子がともにHis(His/His配位)の6配位型ヘムであり、これらは電子伝達を担う。残る一つ(ヘム4)は第5配位子がHisである5配位型のヘムであり、触媒部位として働く(図4b)。ヘム4はヘム結合モチーフの2つのCysと第5配位子であるHisを介してNeHAOのサブユニットに結合するが、隣接するサブユニットの保存されたTyr残基とも共有結合する。Tyr残基との架橋構造はヘムの触媒活性を酸化反応に適するように調節すると考えられている(30)。

アナモックス菌において、亜硝酸のNOへの還元は*kusete0458*及び*kuste4574*によってコードされるHAO様の酵素AmxNir1とAmxNir2が担っていると推定されている(1)。AmxNir1は*kust0458*によってコードされる電子伝達タンパク質(AmxET)と結合し、これら

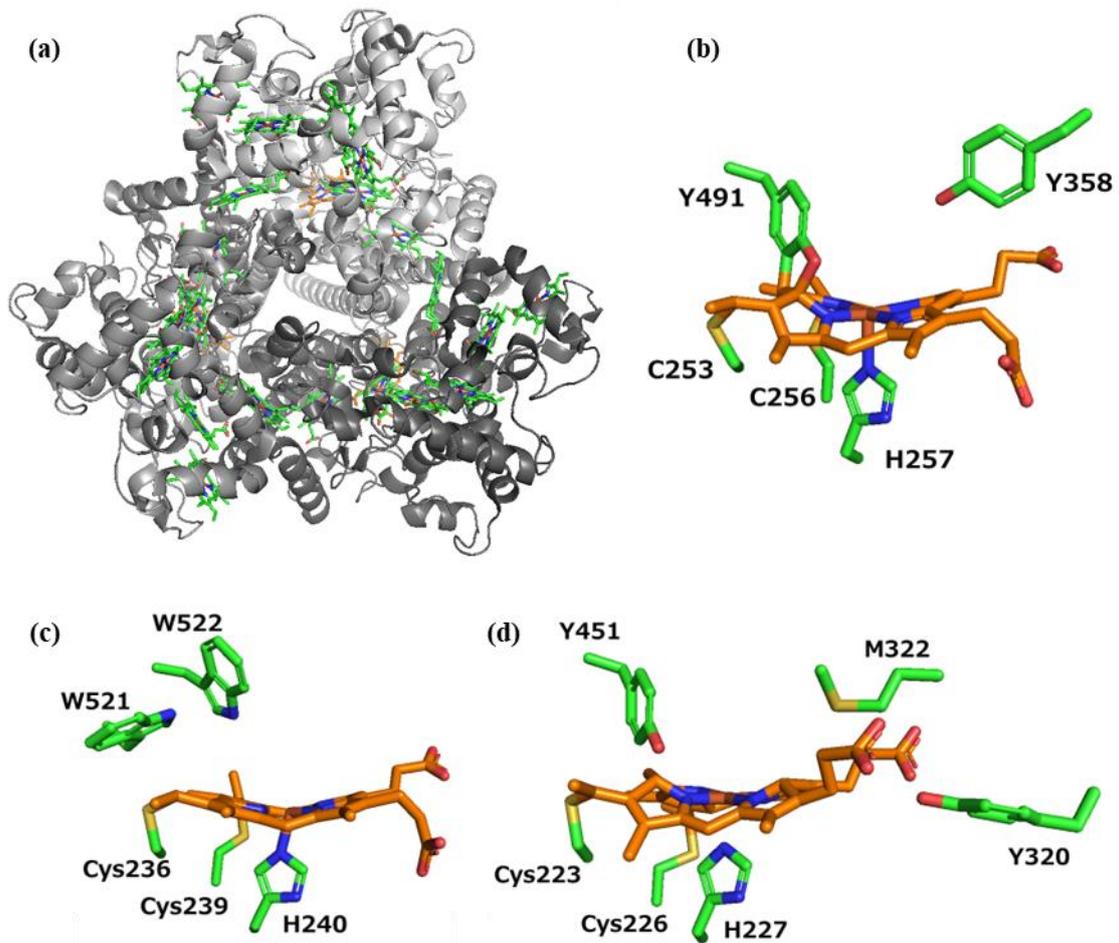


図4. NeHAOとアナモックス菌のHAO様酵素におけるヘム

(a), NeHAOの結晶構造 (PDBID: 6m0q)。ヘム4をオレンジ、その他のヘムを緑のスティックモデルで示す。(b) NeHAOの結晶構造中のヘム4とその周辺に位置する残基を示す (c) AmxNir1の結晶構造中のヘム4とその周辺に位置する残基を示す (PDBID: 4J4J) (d) KsHAOの結晶構造 (PDBID: 4N4J) 中のヘム4とその周辺残基を示す

がそれぞれ6個ずつ会合したヘテロ12量体を形成する。AmxNir2は *kuste4569-74* によってコードされる bc_1 複合体のサブユニットとして働く (24)。 *kuste0457*, *kusetete0458*, *kuste4569-74* に相当する遺伝子はすべてのアナモックス菌ゲノムに保存されている。AmxNir1とAmxNir2はNeHAO同様に、7つのHis/His配位のヘムと5配位型のヘム4を有しているが、これは酸化反応に必要なTyrを欠いており(図4c)、このため、還元反応を触媒すると推定された(2)。実際に、アナモックス菌 *K. stuttgartiensis* から単離されたAmxNir1-AmxET複合体は、ヒドロキシルアミンやヒドラジンを酸化することはできず、電子伝達物質としてphenazine ethosulfateを使用した場合において、亜硝酸を一酸化窒素に還元した(31)。亜硝酸同様に、AmxNir1-AmxET複合体は一酸化窒素及び、ヒドロキシルアミンを還元するが、これらの還元にはphenazine ethosulfateよりも強力な還元剤であるメチルビオロゲンを要した。これらの結果はアナモックス菌細胞内ではAmxNir1-AmxET複合体は亜硝酸を真の基質としており、アナモックス反応における亜硝酸の一酸化窒素への還元を担っていること

を強く支持する。AmxNir2 はアミノ酸配列の情報に基づいて、アナモックス菌における亜硝酸の NO への還元を担っていると推定されているが、これを示す実験的なデータは得られていない (2)。

アナモックスの 2 段階目の反応であるヒドラジンの合成は、ヒドラジン合成酵素 (HZS) によって行われる (32)。これはアナモックス菌に特有であり、アナモックス菌の存在を示すバイオマーカーとしても知られている (33)。*K. stuttgartiensis* 由来の HZS 複合体結晶構造は近年決定され、これに基づいて一酸化窒素とアンモニアからヒドラジンを合成するメカニズムが推定された (34)。*K. stuttgartiensis* のヒドラジン合成酵素は 3 つのサブユニット α , β , γ から構成されるヘテロトライマーのダイマーである (図 5a)。この酵素の反応や構造は新規である一方、2 つの良く研究された過酸化水素の分解を担う酵素である シトクロム *c* ペルオキシダーゼとカタラーゼと同様のメカニズムを用いていると考えられている。サブユニット α は主に six-bladed β プロペラシートによって、サブユニット β は seven-bladed β プロペラによって形成される。 β プロペラ構造は亜硝酸還元酵素 NirS、NO 還元酵素、メタノールメチルアミン脱水素酵素などの様々なタンパク質で見られ、酸化還元反応に必要な補因子であるヘムが結合するための構造基盤となる (35, 36)。

γ サブユニットの構造は、シトクロム *c* ペルオキシダーゼ (37, 38) およびメチルアミン脱水素酵素の補因子であるトリプトファントリプトフィルキノンの合成に関与する MauG (39, 40) の構造に類似しており、これらと同様に 2 分子のヘム (ヘム $\gamma 1$, ヘム $\gamma 2$) を有する。サブユニット γ 内部に位置するヘム $\gamma 1$ は第 5 配位子が His の 5 配位型のヘムであり、これが基質結合部位であると推定される。HZS 表面に露出しているヘム $\gamma 2$ は、典型的な C 型ヘム結合モチーフに結合した His/His 配位の 6 配位型のヘムである。NeHAO において His/His ヘムは、電子伝達を担うことが明らかとなっている (29)。ヘム $\gamma 1$ とヘム $\gamma 2$ 間の距離は 15 Å であり、分子表面に存在するヘム $\gamma 2$ を介して電子伝達物質からヘム $\gamma 1$ へ電子が移動すると推定されている。

α サブユニットも γ サブユニット同様に、HZS 内部奥深くに存在する 5 配位型ヘム (ヘム $\alpha 1$) と表面の近くに存在する His/His 配位の *c* 型ヘム (ヘム $\alpha 2$) を有する。ヘム $\alpha 1$ の第 5 配位子は Tyr である。Tyr 配位のヘムはカタラーゼカタラーゼに一般的であるが (39, 40)、ヘム $\alpha 1$ の配位子である α Tyr591 は CXXCH ヘム結合モチーフには含まれておらず、また、ヘム結合モチーフの α Cys303 と α His587 は亜鉛原子を介してヘム $\alpha 1$ と結合しており、ヘム $\alpha 1$ は HZS の二つ目の活性部位として働く と推定されている。この亜鉛原子は α His587 を鉄原子から離すように回転させ、 α Tyr591 が結合することを補助する、または、ヘムと相互作用することで触媒能の調節を担うと推定されている。ヘム $\alpha 1$ とヘム $\alpha 2$ 間の距離は 31 Å であり、電子伝達を行うには遠く、His/His 配位のヘム $\alpha 2$ の機能は明らかとなっていない。HZS は分子表面から内部に向かって伸びる 2 つのトンネル (major tunnel, minor tunnel) を有している。major tunnel は内部で 2 つに分岐し、それぞれヘム $\gamma 2$ とヘム $\alpha 1$ へと通じており、minor tunnel はヘム $\alpha 1$ へと通じている。これらのことから、HZS 内部に侵入した NO は、ま

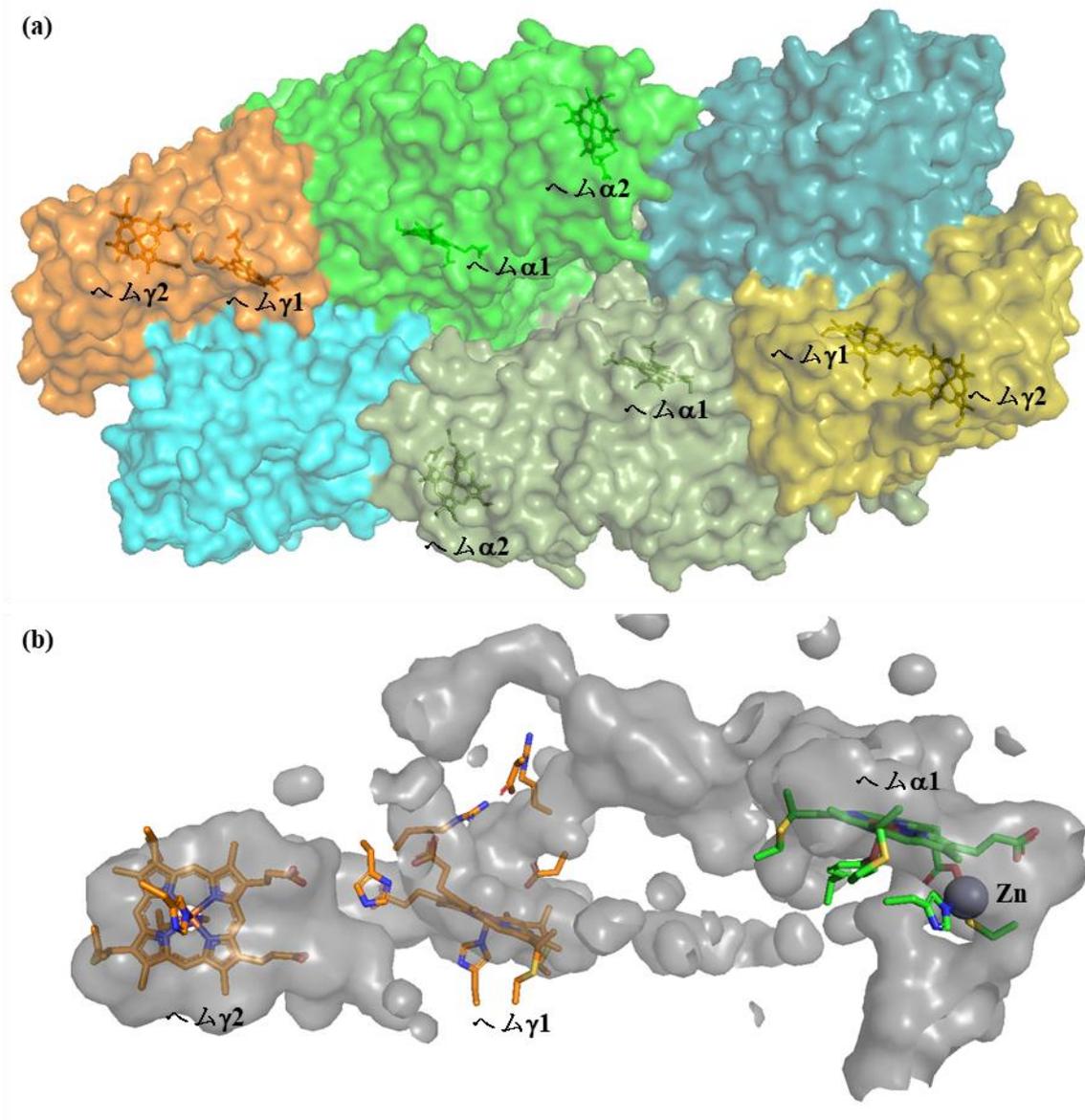


図5. HZSの結晶構造

(a) *K. stuttgartiensis*由来HZSの結晶構造のsurfaceモデルとヘムのスティックモデルを示す (PDBID: 5C2V)。サブユニット α : green, smudge, サブユニット β : cyan, deep teal, サブユニット γ : orange, olive (b) HZSの基質ポケットのsurfaceモデルとヘムのスティックモデルを示す

ず、ヘム $\gamma 2$ でヒドロキシルアミンへと還元され、続いてヒドロキシルアミンアミンはヘム $\alpha 2$ へ移動し、minor tunnel を通って HZS 内部に侵入したアンモニウムイオンがヘム $\alpha 2$ でアンモニアへ変換され、ヒドロキシルアミンの窒素原子を求核攻撃することでヒドラジンが生成されると推定されている。

K. stuttgartiensis のアナモキソソームにはヒドラジン合成酵素、ヒドラジン脱水素酵素、亜硝酸還元酵素に加えて、ヒドロキシルアミン酸化酵素 (KsHAO) が局在している (17)。これは NeHAO と 26%しか相同性を示さないが、これらの構造は N 末端及び C 末端付近を除

いて同様であり、また、8つのヘムの位置も保存されている (41)。NeHAO と KsHAO は共にヒドロキシルアミンを酸化するが、NeHAOによる反応の生成物は亜硝酸であるのに対し、KsHAOによる反応の生成物は一酸化窒素である。NeHAOのヘム4のdistal位付近にはTyr358が位置しており、これは水と結合し、ヘム4に結合した基質を攻撃することを促すことで亜硝酸が生じる。一方で、KsHAOはNeHAOのTyr358に相当するTyr320を有しているが、これはMet323によってヘムから離れるように位置しており、亜硝酸の生成に必要な水分子が基質を攻撃できないため、生成物が一酸化窒素となる(図4d)。アナモックス菌におけるHAOの役割はヒドラジン合成酵素から漏出したヒドロキシルアミンを一酸化窒素へ変換し、ヒドラジン合成酵素へと戻すことであると考えられている (28)。しかし、ヒドラジン合成の過程でヒドロキシルアミンが生産され、これがHZSから漏出することを示すデータは得られていない。

以上のように、アナモックス反応やこれを担うアナモキソソーム内のタンパク質の存在に関する多くの知見が得られている。一方で、アナモックスと共役している電子伝達、アナモキソソーム膜を介したプロトン駆動力の形成とATP合成、及びアナモキソソーム膜との関連を明らかにするための実験的な情報は得られていない。

1-4. ラダラン脂質

一般的に脂質二重膜はイオンの透過性が非常に低いが、無視できない膜を隔てたプロトンの受動拡散により、ATP合成の駆動力となるプロトンの濃度勾配が失われることは、ヒドラジン合成酵素の反応が遅いアナモックス菌の生育において大きな障害である。一般的に、生体膜の主成分はリン酸基などの親水基と、2つのパルミトイル基などの直鎖上の疎水基を有するリン脂質であるが、アナモックス菌の膜には5つの四員環または六員環と3つの四員環が連なった歪みの大きな梯子状疎水基([5]-ラダラン, [3]-ラダラン)を有するラダラン脂質が含まれる(図.6) (42, 43)。アナモックス菌の膜のラダラン脂質が占める割合は、アナモックス菌の種または生育環境、もしくはその両方によって異なるが(43)、アナモックス菌 *Brocadia. anammoxidans* の総脂質におけるラダラン脂質の割合は34%、アナモキソソームを多く含む画分におけるラダラン脂質の割合は53%であり(42)アナモキソソーム膜には多量のラダラン脂質が含まれる。一般的な脂質二重膜に比べて、ラダラン脂質で形成された膜はプロトン透過性が極めて低く、プロトン濃度勾配を維持する役割を担うと考えられている(44)。プロトン濃度勾配の減衰は、脂質二重膜の疎水性領域に水分子が入り込み、これがクラスター化する、またはワイヤー上に連なることで、プロトンジャンプが起こることに起因するが、ラダラン脂質で形成された膜において、梯子上疎水基どうしは強く相互作用し、密にパッキングすることで、水分子の侵入を防いでいると推定されている。また、天然のラダラン脂質のsn-2位には[3]-ラダランが存在している。天然のラダラン脂質は常温常圧下でリポソームを形成可能であるが、sn-2位に[5]-ラダランを有する非天然のラダラン脂質は流動性が低く、常温常圧下ではリポソームを形成できないことから、[3]-ラダランの六員環は流動的な脂質二重膜の形成に寄与していると考えられている(44)。

また、以前ラダラン脂質はアナモックスによって生じる有害な一酸化窒素やヒドラジン
 をアナモキソソーム内に留めることで、サイトゾルに存在する核酸やタンパク質などの生
 体分子を保護する役割を持つと提唱されていたが (42)、ラダラン脂質によって形成された
 リポソームと一般的な脂質によって形成されたリポソームのヒドラジン透過性に有意な差
 は見られなかった (44)。一般的な脂質膜と比較してアナモキソソーム膜が低いヒドラジン
 透過性を示すのか明らかではないが、少なくともラダラン脂質にヒドラジンの拡散を防ぐ
 役割はないと考えられている。ラダラン脂質の梯子状疎水基は他の天然物には見られずそ
 の有機合成が困難であることからその生合成経路・メカニズムが注目されており、また、
 単位体積当たりのエネルギーが大きいことからジェット燃料の利用が期待されている (45)。
 近年、梯子状疎水基は低収率ではあるが有機合成されており、また、物理的な刺激により、
 開裂、自己組織化するユニークな性質を有する化合物の合成も報告されている (図 7) (46)。
 ラダラン脂質生合成経路及び生合成メカニズムを解明することで、梯子状疎水基を有する
 新規物質を酵素的に合成するための有益な知見が得られることが期待される。

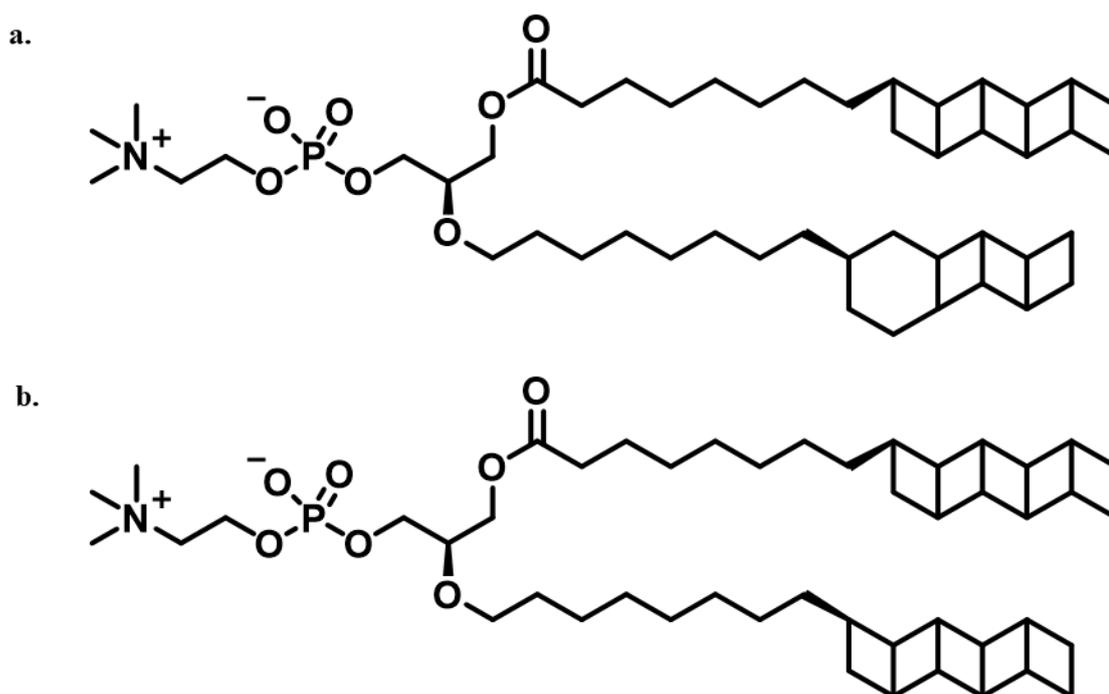


図6. ラダラン脂質の構造

(a), (b) はそれぞれ天然型ラダラン脂質の一例と非天然型ラダラン脂質を表す

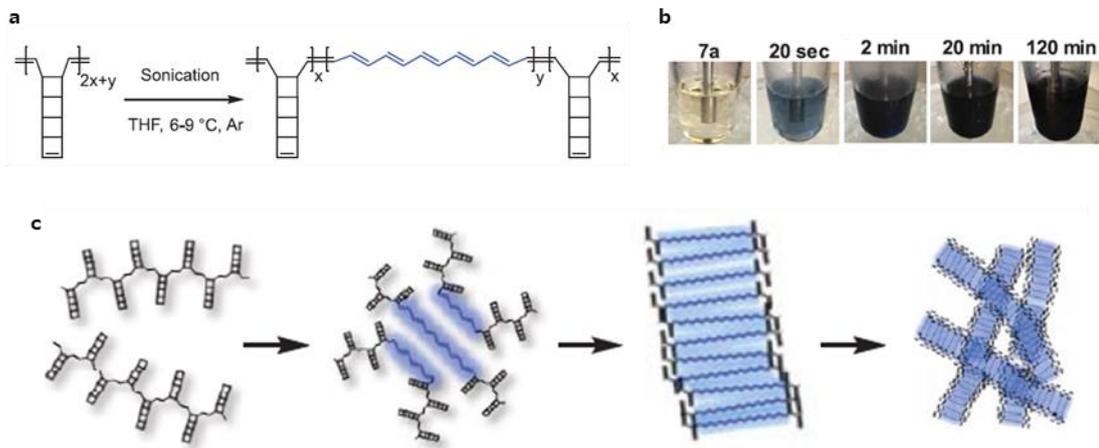


図7. ポリラダランの開裂と自己組織化

(a) 物理的な刺激による非共役ラダランポリマーの共役ポリアセチレンへの変換。(b) 非共役ラダランポリマーへ超音波を当てた際の経時変化。(c) 非共役ラダランポリマーの共役ポリアセチレンへの変換及び自己組織化の模式図(46)。

1-5. II型脂肪酸合成とラダラン脂質合成

アナモックス菌は、他の生物に対して優位に増殖可能な最小培地を用いた嫌気的な連続培養を行うことで、集積培養が可能であるが、一般的な倍加時間は1-数週間と増殖が極めて遅い(1)(2)。また、純粋培養の報告例もなく、プレート培養も困難であるため、天然物の生合成経路の探索研究に広く用いられる遺伝子破壊操作などをアナモックス菌に対して行うことができない。これはアナモックス菌の研究を行う上で大きな障害となっており、ラダラン脂質生合成経路の大部分は未解明であるが、Rattrayらは比較ゲノム解析などに基づいて、ラダラン脂質の生産にはII型脂肪酸合成(FAS II)が関与すると提案した(47)。一般的な細菌の脂肪酸生合成経路FAS IIではアシルキャリアプロテイン(ACP)に共有結合している新生鎖が、伸長反応を担う酵素群により、縮合、還元、脱水、還元(4段階)の反応から成る伸長サイクルを繰り返すことで、炭素鎖長が2ずつ伸長し、最終産物として炭素鎖長16のパルミチン酸が生産される(48)。ACPは10 kDaほどの4ヘリックスバンドルタンパク質であり、分子表面に保存されたSer残基を有している。アポ型のACPは保存されたSer残基に4'-ホスホパンテテイン(ppn)が共有結合することで、ppnを介したアシル基とのチオエステル結合が可能なホロ型となる(48)。FAS IIの全ての伸長サイクルには

マロニルACPが必要であり、これはアセチルCoAカルボキシラーゼ複合体によってアセチルCoAにATP依存的にCO₂が転移されることで生じたマロニルCoAから、マロニル基がマロニルCoA:ACPトランスアシラーゼによってACPへと転移さ

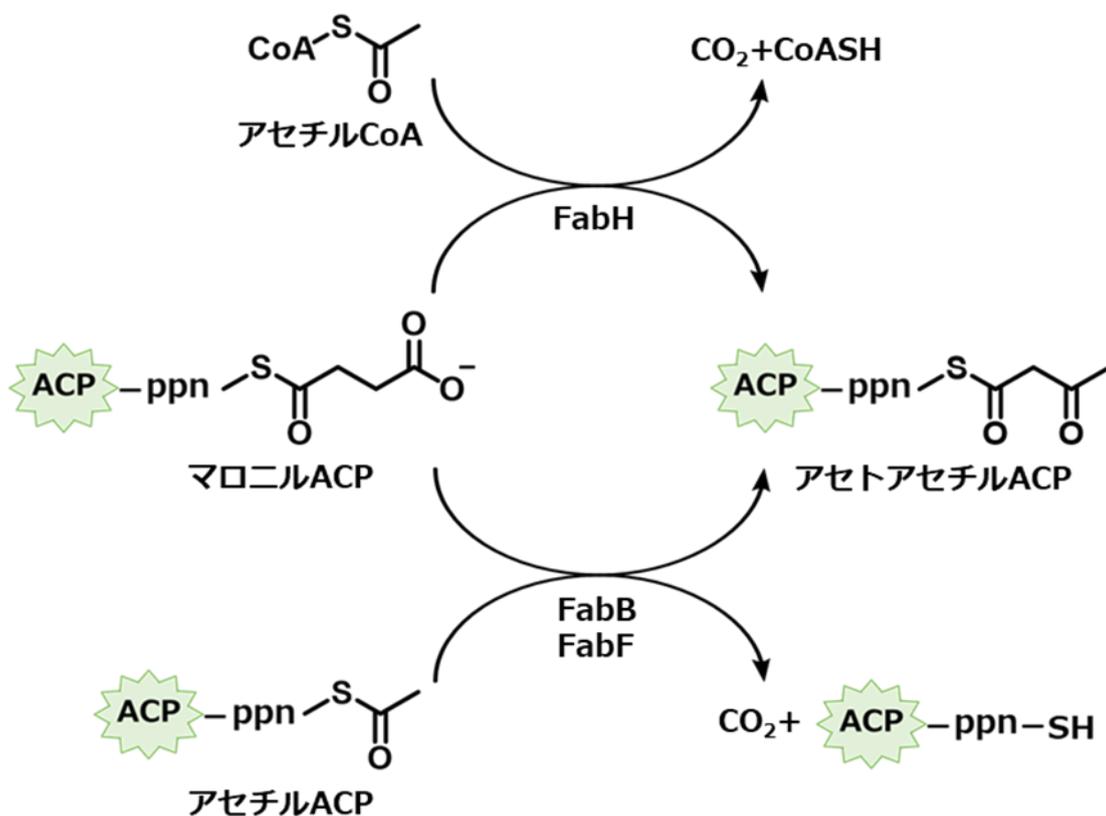


図8. FASIIの開始反応

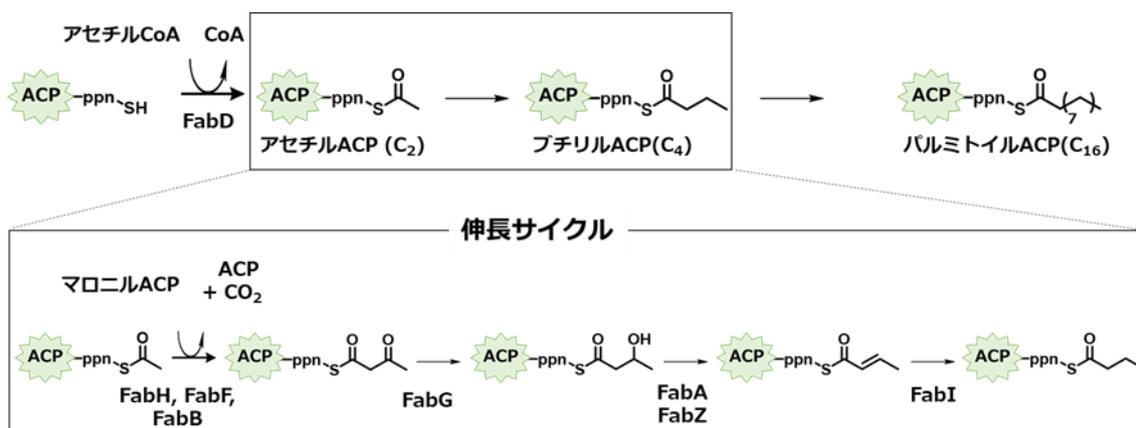


図9. FASIIの伸長反応

れることによって合成される (図 8) (48)。FASIIによる伸長サイクル (図 9) は、 β -ケトアシル ACP 合成酵素III (FabH) によって触媒されるマロニル ACP とアセチル CoA の縮合、 β -ケトアシル ACP 合成酵素I (FabF) または β -ケトアシル ACP 合成酵素II (FabB) によって触媒されるマロニル ACP とアセチル ACP の縮合によって開始される (48)。この反応によって生じたアセトアセチル ACP は NADPH 依存性 β -ケトアシル ACP 還元酵素 (FabD) による還元、 β -ヒドロキシアシル ACP 脱水酵素 (FabZ, FabA) による脱水、エノイル ACP 還元酵素 (FabI, FabK) による還元を受ける。エノイル ACP 還元酵素による還元によって生じたアシル基は β -ケトアシル ACP 合成酵素IまたはIIの基質として働くことができ、次の伸長サイクルが開始される。脂肪酸の伸長を担う酵素は大腸菌における FabF と FabB や FabZ と FabA のように、同一の反応を担う複数の酵素が見られる場合がある。これらは基質特異性や生成物に違いが見られ、これにより、FASIIでは直鎖の飽和脂肪酸のみならず、不飽和脂肪酸や分岐鎖脂肪酸も合成される。例えば、バクテリアの分岐鎖脂肪酸はイソブチル CoA 由来のイソブチル基が結合した ACP を初発物質としてアシル基が伸長することで生産され、これは β -ケトアシル ACP 合成酵素の基質特異性に依存する (49)。また、不飽和脂肪酸の生産は伸長中のアシル基が β -ヒドロキシアシル ACP 脱水酵素による脱水後に還元を受けずに次の縮合反応が起こることによって生産される。大腸菌において伸長中のアシル基の脱水は FabZ が担い、その生成物はトランス型の不飽和アシル ACP であるが、FabZ のホモログである FabA による脱水ではシス型の不飽和アシル ACP が生じる。FASIIにおける縮合反応は一般的に FabF によって行われ、これは直鎖のアシル ACP を基質とするが、FabF のホモログである FabB はシス型の不飽和アシル ACP を基質とすることができる (48)。

ACP は FAS II において生合成中間体を運搬するだけでなく、様々な代謝物の生合成において、FAS II で合成されたアシル基の供与体としても働く。大腸菌由来 ACP は脂肪酸生合成のみではなく、細胞膜の構成成分として働くリポ多糖であるリポド A (50) や哺乳類の細胞膜を破壊する毒素として働くリポタンパク質であるヘモリシン生合成 (51) にも関与する。大腸菌 *E. coli* K12 は AcpP と呼ばれる典型的な脂肪酸生合成に関与する 1 種の ACP のみを

有しており、これがリポド A やヘモリシンなどの生合成を担う。より大きなゲノムを持ち、複雑な二次代謝産物を生産する生物は、複数の ACP を有している場合が多く、これらは独立した一つのタンパク質もしくは多機能酵素のドメインとして存在する。例えば、放線菌多様な二次代謝産物を生産することが知られており、放線菌 *Streptomyces coelicolor* はポリケチドまたはポリペプチド生合成系に関与する多数の酵素の ACP ドメインと 8 種の独立した ACP を有する (52)。脂肪酸やその他の代謝産物の生合成において AcpP やその他 ACP は適切な量の最終産物を生産するために、アセチル CoA などの炭素源を適切な酵素へ受け渡すことでカーボンフラックスを調節する重要な働きを担っていると考えられている (52)。

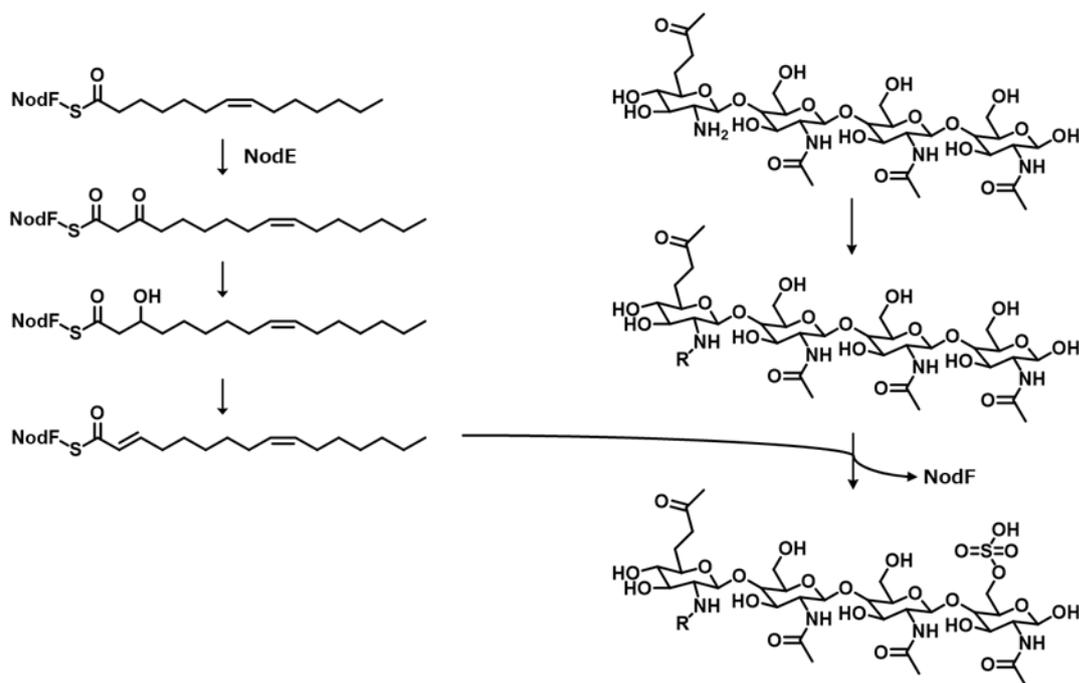


図10. nod因子生合成

根粒菌 *Sinorhizobium meliloti* は AcpP に加えて NodF と呼ばれるホモログを有している。これらは *S. meliloti* が宿主に認識され、根粒を形成するためのシグナル伝達物質であるリポキチンオリゴ糖, nodulation factor (Nod 因子) の生産に関与する。Nod 因子が有するアシル基はいくつかの種類が存在するが、トランス不飽和アシル基を有する Nod 因子はβ-ケトアシル ACP 合成酵素 NodE または NodF を欠損させた変異体においては生産されない。このことから、NodE によってミリストイル AcpP とアセトアセチル NodF が縮合し、続くβ-ケトアシル基の還元、ヒドロキシアシル基の脱水によって生じたトランス不飽和アシル基が FabI の還元を受けずにキチンオリゴ糖へと転移されると推定されている (図 10) (52)。また、スフィンゴ脂質を生産するαプロテオバクテリア *Caulobacter crescentus* は AcpP に加えて、AcpR と呼ばれる ACP を有する。スフィンゴ脂質生合成中間体である 3-オキソ-スフィンガニン はパルミトイル-AcpR と L-セリンの縮合によって生産され、これはセリンパルミトイルトランスフェラーゼ (SPT) によって触媒される。AcpR へとパルミチン酸を転移させるアシル

ACP 合成酵素 (AasR) は、AcpP を基質として認識せず、AcpR のみへ選択的にパルミトイル基を転移し、*C. crescentus* 由来 SPT はパルミトイル-AcpR から L-セリンへパルミトイル基を転移させるが、パルミトイル AcpP を基質として認識しない(図 11) (53)。

このように、天然物生合成において、生合成中間体を運搬する ACP が生合成を担う酵素に認識されることは非常に重要である。

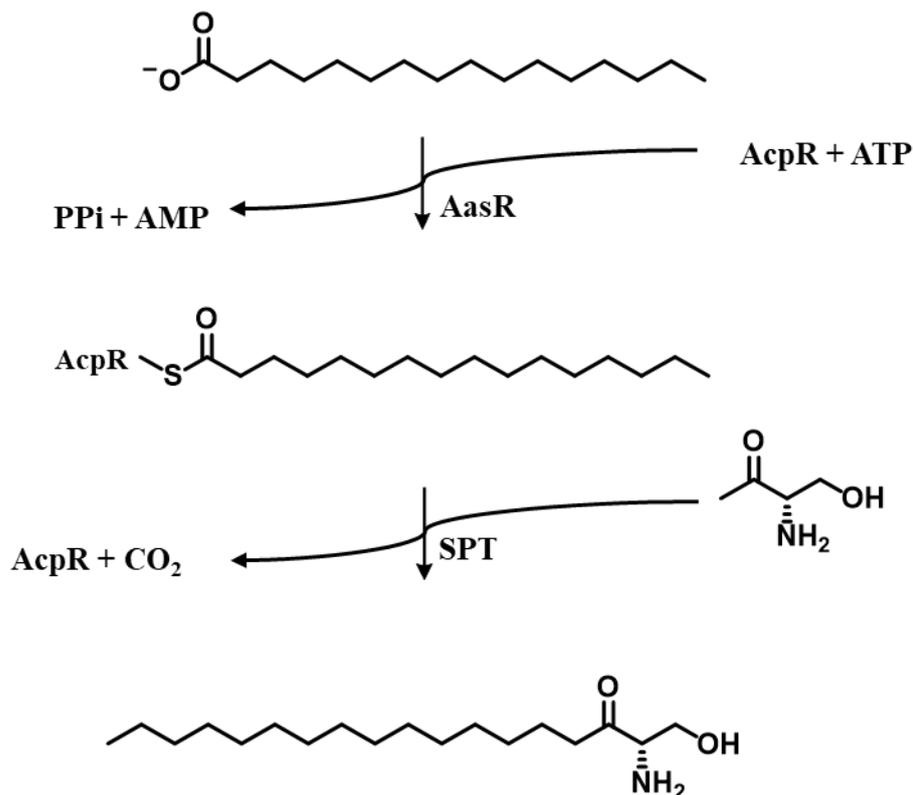


図11.3-オキソ-スフィンガニン生合成

アナモックス菌 *K. stuttgartiensis* も FASII 遺伝子クラスターを有しているが、FASII の典型的な酵素や ACP に加えて、一般的な脂肪酸生合成に関与しない *S*-アデノシルメチオニン (SAM) 依存性メチル基転移酵素 (SAM methyl transferase, SAM MTase), ラジカル SAM 酵素 (radical SAM enzyme, RSE), フィトエン不飽和化酵素と相動性を有する酵素 (phytoene

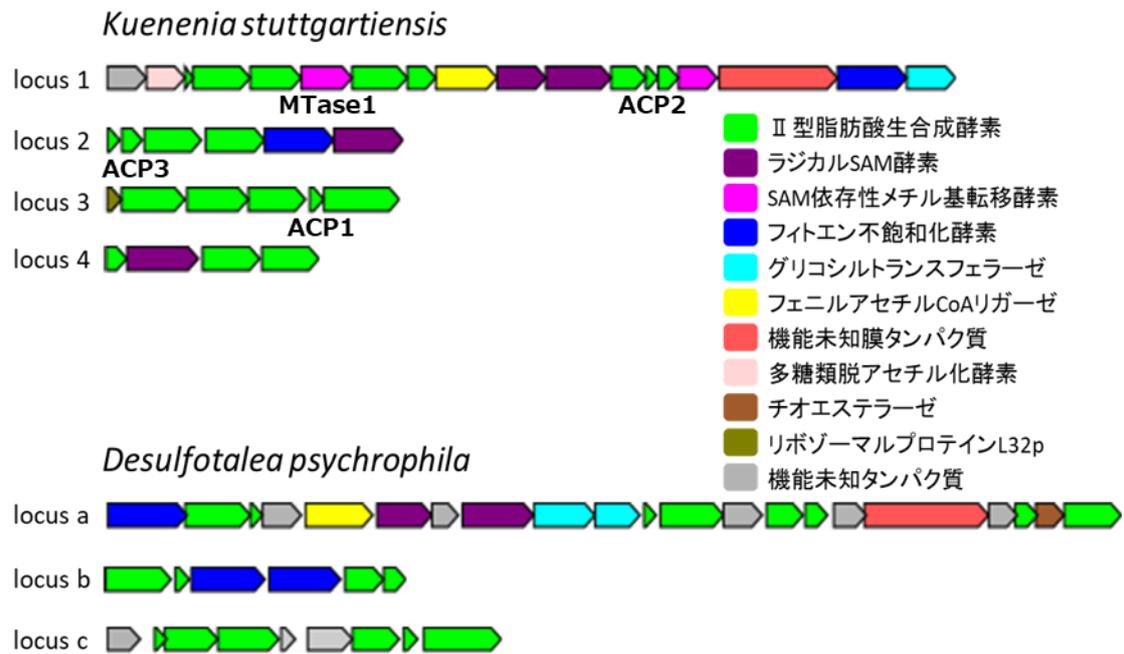


図12. *K. stuttgartiensis* と *D. psychrophila* のFASII遺伝子クラスター

desaturase PDS) などが含まれていた (図 12)。RSE は SAM の還元的開裂によって生じるデオキシアデノシルラジカルを用いて、分子内または分子間の官能基の転移、脱水素、DNA 修復など非常に多様な反応を行い (54)、SAM MTase は幅広い化合物へ SAM のメチル基を基質へと転移させる (55)。これらの酵素の中には、オキセタノシン A 合成において 4 員環を構築するラジカル SAM 酵素 OxsB (56) やメチル基転移に伴い 6 員環を形成する SAM MTase TelD (57) など、環化反応を行うものも報告されている (図 13, 14)。

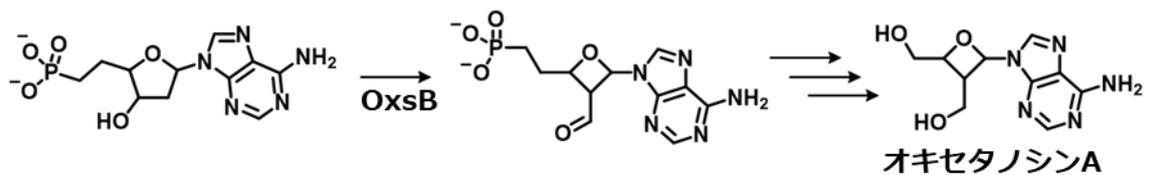


図13. オキセタノシンA合成における四員環の構築

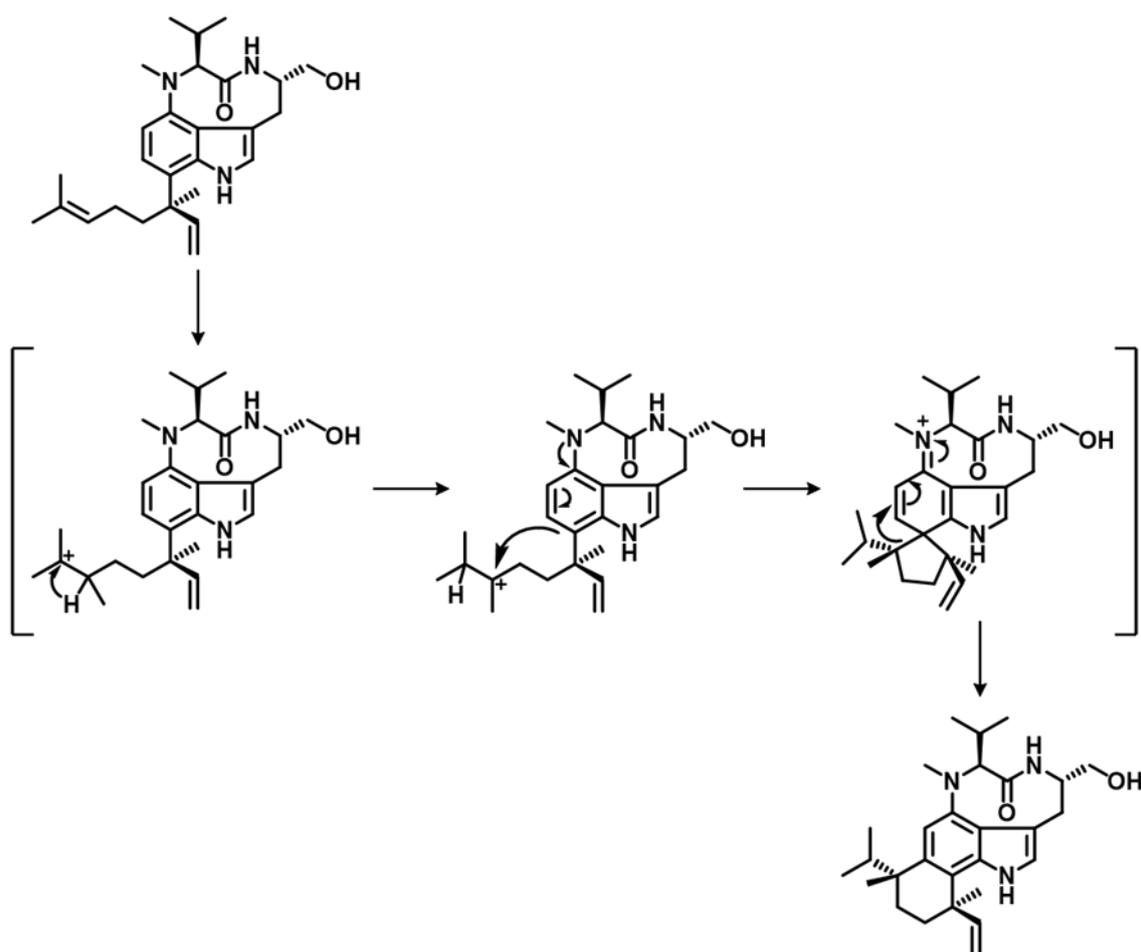


図14. teleocidin B4合成における六員環の構築

また、FASIIにおいて脂肪酸の縮合は β -ケトアシル合成酵素によって行われ、アナモックス菌は複数の β -ケトアシル ACP 合成酵素のホモログを有するが、これらの内、kuste2805, kuste3348, kuste3606は β -ケトアシル ACP 合成酵素に保存されている触媒残基が欠損しており(図15)、縮合反応とは異なる反応を行うと推定される(47)。RSEやPDSホモログを含むFASII遺伝子クラスターは一部のデルタプロテオバクテリアに保存されており、好冷性硫酸還元菌 *Desulfotalea psychrophila* とアナモックス菌 *K. stuttgartiensis* のFASII遺伝子クラスターに共通して存在するSAM依存性酵素遺伝子などが多く存在することが報告された(47)。*D. psychrophila*はラダラン脂質を有していないが、多価不飽和炭化水素を有している。また *K. stuttgartiensis*のラジカルSAM酵素 kuste2803 とSAM MTase kuste3347は *D. Psychrophila*のSAM MTaseやRSEと相同性を示さず、kuste3347(AmxMTase1)は進化系統樹において他のSAM MTaseと早期に分岐していることから、梯子状疎水基を構築する酵素の有力な候補として挙げられている。これらのことから、ラダラン脂質はPDSホモログなどによって合成された多価不飽和アシル ACPがkuste2803またはAmxMT1によって環化されることで生産されると推定された(47)。しかし、多価不飽和脂肪酸のラダランへの変換は吸熱的であ

り自発的には起こりえないこと、さらにオリゴシクロプロパンの梯子状疎水基への変換がほぼ thermoneutral であることが Tantillo らによる理論科学計算により示された (図 15) (58)。

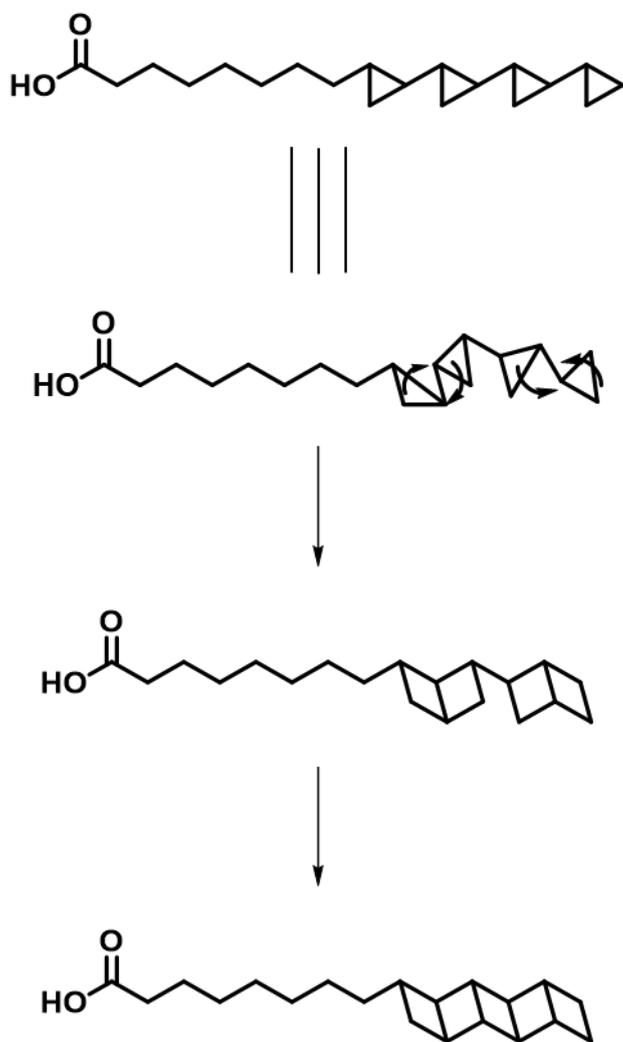


図15. オリゴシクロプロパンの梯子状疎水基への変換

脂肪酸へのシクロプロピル基の挿入は、大腸菌 *Escherichia coli* や結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* などにおいて、SAM MTase に分類されるシクロプロパンシンテースによってなされる (59, 60)。また、放線菌 *Streptovorticillum fervens* 由来ポリケチド Jawsamycine はオリゴシクロプロパンを有しており (61)、これはポリケチド合成酵素 Jaw4 と trans エノイル ACP レダクターゼによって伸長された不飽和アシル基にメチル基が転移されることで構築される。シクロプロパン間の形成がアシル基の伸長が完了した後に起こるか、伸長途中に起こるかは明らかではないが、少なくとも、この反応はラジカル SAM 酵素 jaw5 が担うことが明らかとなっている(61)。

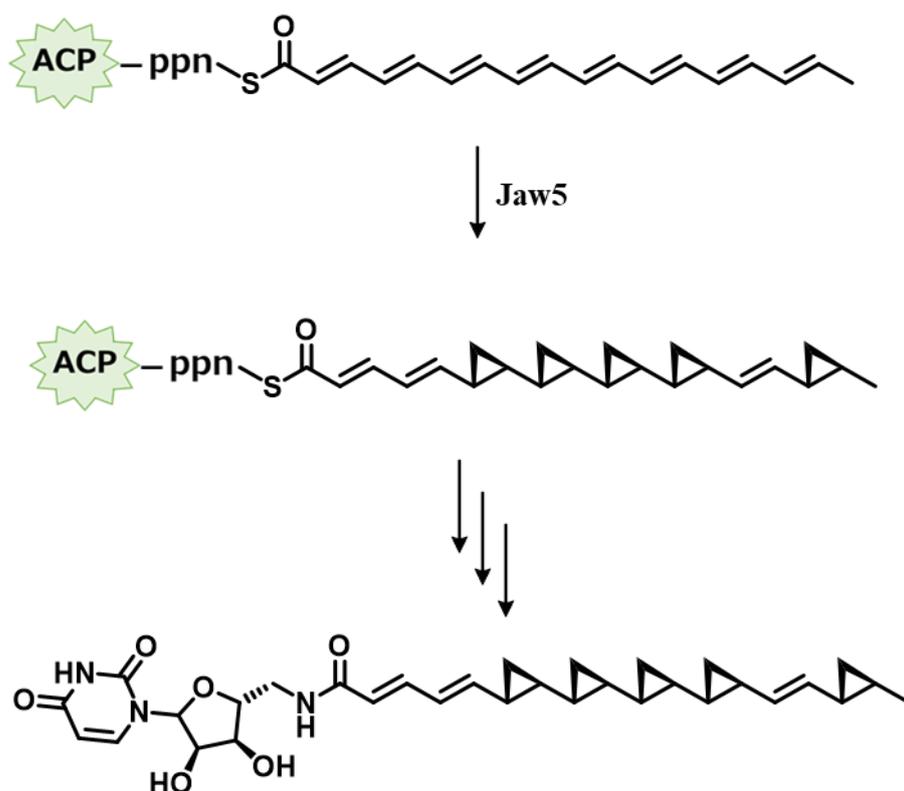


図16. 推定Jawsamycine生合成経路の一例

このため、FAS II 遺伝子クラスターにシクロプロパン環の形成が可能な SAM MTase やラジカル SAM 酵素を有するアナモックス菌において、ラダラン脂質がオリゴシクロプロパンを基に生産されることは Tantillo らの提唱と矛盾しない。このように、ラダラン脂質生合成に関する遺伝的な情報、計算科学的に実現可能なラダラン脂質生合成経路の知見は得られているが (58)、天然物生合成経路の解明に広く用いられる遺伝子破壊をアナモックス菌に対して行うことは極めて困難であり、ラダラン脂質生合成に関与する酵素や生合成中間体を示す実験的なデータは得られていない。

アナモックス菌 *K. stuttgartiensis* は 3 種の ACP, kuste1387 (AmxACP1), kuste3340 (AmxACP2), kuste3603 (AmxACP3) を有しており、これらはゲノムが公開されている淡水生のアナモックス菌である *Brocadia* 属及び *Jettenia* 属においても保存されている (図 12)。アナモックス菌の ACP の内、ACP1 は大腸菌由来 ACP との相同性 (query cover 92%, identity 54%) が高いことから、典型的な脂肪酸生合成に関与すると推定されるが、ACP2 と ACP3 は大腸菌由来 ACP との相同性が低い (AmxACP2: query cover: 39%, identity 41%, AmxACP3: query cover: 38%, identity 47%)。ACP3 は結晶構造解析が行われており、ヘリックス III が非常に柔軟な 3_{10} ヘリックスであることや、ヘリックス 1 と 2 の間に、長いアシル基が ACP へとロードされた際に、チオエステル結合を加水分解から保護すると推定される dual phenylalanine motif を有するなど、他の ACP とは異なる特徴を有する (62)。上述の通り、ACP による代謝物の生産、カーボンフラックスの制御は重要であるが、ラダラン脂質生合

成においてアナモックス菌が有する 3 種の ACP が脂肪酸の伸長を担う酵素, RSE, SAM MTase, PDS などの酵素と相互作用し、ラダラン脂質生合成に関与するかは明らかとなっていない。

1-6. 本研究の目的

本研究ではラダラン脂質生合成経路及び生合成メカニズムの解明に向けて、まず、3種のアナモックス菌由来ACPとAmxMT1の相互作用をプルダウンアッセイにより確認し、結晶構造及びACP-AmxMT1複合体モデルを用いて、アナモックス菌由来ACPが典型的な脂肪酸合成に関与しないSAM依存性酵素と相互作用するかを推定する。また、天然物の生合成経路の探索研究に広く用いられる遺伝子破壊をアナモックス菌に対して行うことは困難であるため、アナモックス菌からACPを精製し、これに結合している生合成中間体を同定すること、並びにACPと相互作用する酵素、すなわちラダラン脂質生合成に関与する酵素を単離・同定することを目指した。

2章 アナモックス菌の SAM MTase の結晶構造解析と ACP との相互作用について

2-1. 緒言

アナモックス菌に特有のラダラン脂質 (42, 43) は、複数の四員環が連なった歪みの大きな梯子状疎水基を有することからその生合成メカニズムが注目されている。一般的に細菌の脂肪酸は II 型脂肪酸生合成系 (FAS II) によって生産される。この経路ではアシルキャリアプロテイン (ACP) に共有結合している新生鎖に対して FAS II の酵素群が、縮合、還元、脱水、還元 の 4 段階の反応から成る伸長サイクルを繰り返すことで、炭素鎖長が 2 ずつ伸長し、最終産物として炭素鎖長 16 のパルミチン酸が生産される (図 9) (48)。アナモックス菌 *Kuenenia stuttgartiensis* の FASII 遺伝子クラスターには、FASII の典型的な酵素や ACP に加えて、一般的な脂肪酸生合成に関与しない S-アデノシルメチオニン (SAM) 依存性メチル基転移酵素 (SAM methyl transferase, SAM MTase), ラジカル SAM 酵素 (radical SAM enzyme, RSE) などが含まれており (図 12) (47)、これらの SAM 依存性酵素のなかには環化反応を触媒するものも存在する (図 13, 14)(56, 57)。アナモックス菌と他の生物の FAS II 遺伝子クラスターの比較などにより、ラダラン脂質は ACP に結合している生合成中間体が SAM 依存性酵素などによって環化されることで生産されると推定されている。特に kuste3347 によってコードされる SAM MTase (AmxMT1) は進化系統樹において他の SAM MTase と早期に分岐していることから、梯子状疎水基の構築に関与する酵素の有力な候補として挙げられている (47)。

また、FAS II において ACP は生合成中間体を様々な酵素へ運搬するうえで非常に重要である。ACP は 10 kDa ほどの 4 ヘリックスバンドルタンパク質であり、分子表面に保存された Ser 残基を有しており、これは 4'-ホスホパンテテイン (ppn) と共有結合する (48)。ACP はアシル基と ppn とのチオエステル結合を介して結合する。FAS II においてアシル基の伸長を担う酵素はすべて ACP と特異的に相互作用し、ACP-酵素複合体を形成する (48))。伸長サイクルの初発反応である 2 分子のアシル ACP の縮合を担う β -ケトアシル ACP 合成酵素や 3 段階目のエノイル ACP の脱水を担うエノイル ACP デヒドロゲナーゼなど、いくつかの大腸菌由来 ACP-酵素複合体は結晶構造が得られている (63, 64)。これらの複合体において、ACP の分子表面に保存された Ser 残基に ppn を介して結合したアシル基が、ACP に結合した酵素の基質ポケット内部に収められる 4 次構造で複合体を形成している (図 17)。 *K. stuttgartiensis* は kuste1387, kuste3340, kuste3603 によってそれぞれコードされる 3 種の ACP (AmxACP1-3) を有しており (47)、これらはゲノムが公開されている淡水生のアナモックス菌である *Brocadia* 属及び *Jettenia* 属においても保存されている。アナモックス菌の ACP の内、AmxACP1 は大腸菌由来 ACP との相同性が高い (query coverage 92%, identity 54%) ことから、典型的な脂肪酸生合成に関与すると推定されるが、AmxACP2 と AmxACP3 は大腸菌由来 ACP との相同性が低い (AmxACP2: query coverage: 39%, identity 41%, AmxACP3: query coverage: 38%, identity 47%)。AmxACP3 の結晶構造はすでに決定されており、ヘリックス III

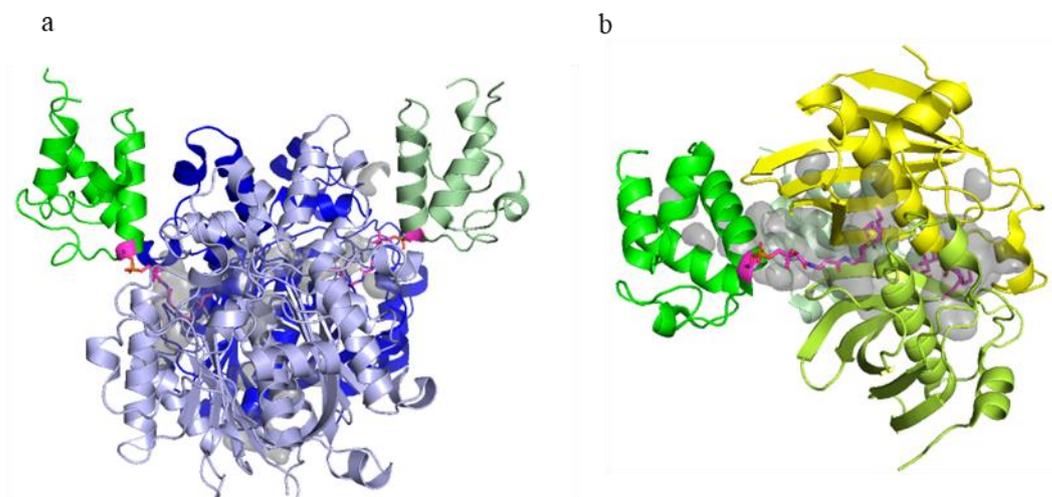


図. 17 ACPと脂肪酸の伸長を担う酵素の相互作用

(a) 大腸菌由来ACP-β-ケトアシルACP合成酵素複合体の結晶構造。ACP chain AとBをそれぞれpale greenとgreenで、β-ケトアシルACP合成酵素 chain AとBをそれぞれlight blueとblueで示す。β-ケトアシルACP合成酵素の基質ポケットをサーフェイスモデルで示す。ACP分子表面の保存されたSer残基と4'-ホスホパンテテインをmagentaのスティックモデルで示す。(b)大腸菌由来ACP-β-ヒドロキシアシルACP脱水酵素複合体の結晶構造。ACP chain AとBをそれぞれpale greenとgreenで、β-ヒドロキシアシルACP脱水酵素chain AとBをそれぞれyellowとlimonで示す。β-ヒドロキシアシルACP脱水酵素の基質ポケットをサーフェイスモデルで示す。ACP分子表面の保存されたSer残基と4'-ホスホパンテテインをmagentaのスティックモデルで示す。

が非常に柔軟な 3_{10} ヘリックスであることや、ヘリックス 1 と 2 の間に、長いアシル基と ppn のチオエステル結合を加水分解から保護すると推定される dual phenylalanine motif を有するなど、他の ACP とは異なる特徴を有する (62)。

現在提唱されている仮説通りに、ラダラン脂質合成に FAS II が関与しているのであれば、ラダラン脂質合成を担う酵素と ACP の相互作用は非常に重要であるが、アナモックス菌が有する 3 種の ACP が RSE, SAM MTase, PDS などの典型的な脂肪酸合成には関与しない酵素との特異的な相互作用は未だ確認されていない。本研究では、まず、3 種のアナモックス菌由来 ACP をそれぞれ固定化した担体を用いて、AmxMT1 を発現させた大腸菌破碎液上清に対してプルダウンアッセイを行うことで、ACP-AmxMT 間に特異的な相互作用が働いているか確認した。続いて、AmxMT1 の結晶構造と既知の SAM MTase の結晶構造を比較することで、AmxMT1 が触媒する反応について考察した。また、高い精度でタンパク質の立体構造を予測する AlphaFold2 (65, 66) を用いて AmxACP-AmxMT1 複合体モデル構築し、ACP が運搬するアシル基が AmxMT1 の基質ポケットに挿入され酵素反応が進行し得るかについて考察した。さらに、AmxMT1 の結晶構造を用いてドッキングシミュレーションを行い、得られたモデルと既知の SAM MTase の反応メカニズムから、AmxMT1 がメチル化する基質を推定した。

結果・考察

2-2. ACP 固定化担体の作製

大腸菌にアナモックス菌 *Brocadia fulgida* 由来 AmxACP1-3 を発現させ、これを精製し (図 18)、セファロース担体に固定化した。固定化された ACP がパートナータンパク質と結合することが可能であるか確認するため、この担体を用いて、ACP に ppn を結合させる *B. fulgida* 由来ホロ ACP 合成酵素 (ACPS) を発現させた大腸菌破碎液上清に対してプルダウンアッセイを行った。ネガティブコントロールである ACP を固定化していない担体を用いた場合と比較して、いずれの ACP 固定化担体を用いた場合においても ACPS のバンドが濃く見られ、固定化された ACP がパートナータンパク質と結合することが可能であることが確認できた (図 19)。

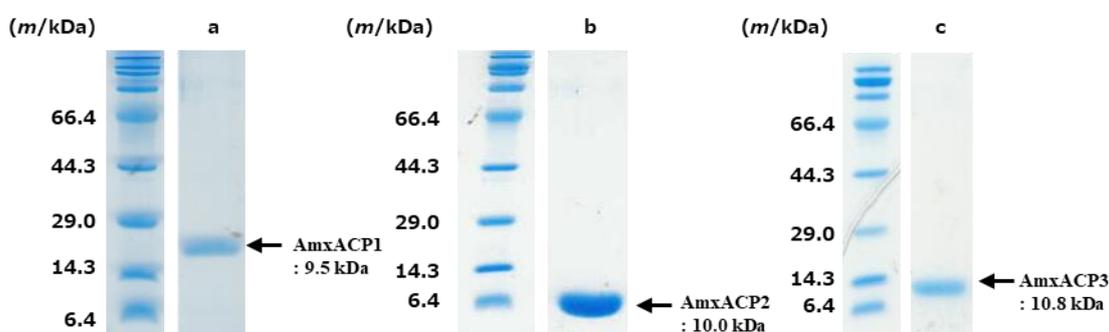


図18. アナモックス菌由来ACPの精製

(a-c) はそれぞれ大腸菌に異種発現させ、精製したAmxACP1, AmxACP2, AmxACP3を示す。

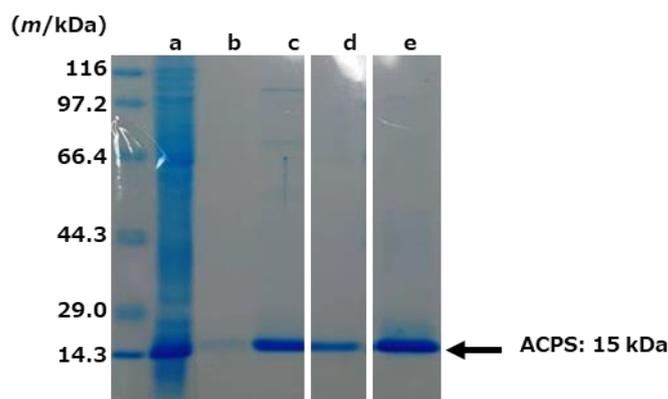


図19. ACPとACPSの相互作用

(a) ACPSを発現させた大腸菌破碎液上清を示す。(b) ACPを固定化していない担体を用いた場合の溶出物を示す。(c-e) AmxACP1, AmxACP2, 及びAmxACP3をそれぞれ固定化した担体を用いた場合の溶出物を示す。

2-3. AmxMT1 と ACP の相互作用

アナモックス菌 *Brocadia fulgida* 由来 AmxACP1, AmxACP2, AmxACP3 をそれぞれ固定化した担体を用いて、His タグを融合した *B. fulgida* 由来 AmxMT1 を発現させた大腸菌破碎液

上清に対してプルダウンアッセイを行った。プルダウン後の試料に対して、抗 His タグ抗体を用いて、ウェスタンブロッティングを行ったところ、ネガティブコントロールである ACP を固定化していない担体を用いた場合と比較して、いずれの ACP 固定化担体を用いた場合においてもバンドが濃く見られ、AmxMT1 が 3 種の ACP 全てと相互作用することが明らかとなった (図 20)。

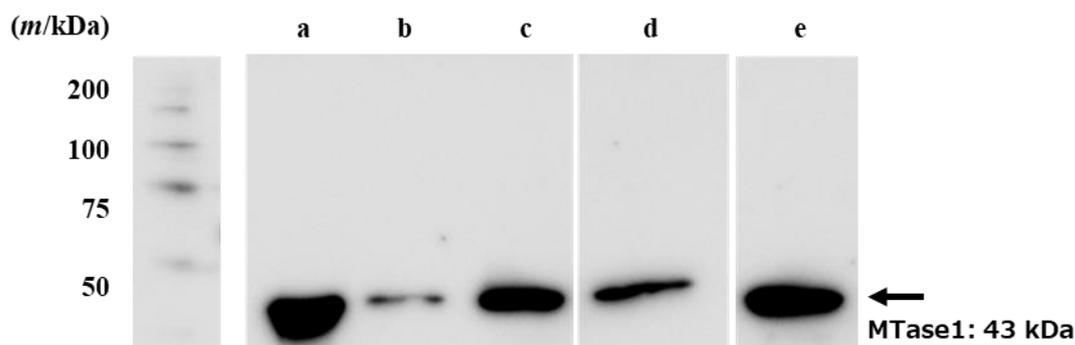


図20. AmxACPとAmxMT1の相互作用

(a) MTase1を発現させた大腸菌破碎液上清を示す。(b) ACPを固定化していない担体を用いた場合の溶出物を示す。(c-e) AmxACP1, AmxACP2, 及びAmxACP3をそれぞれ固定化した担体を用いた場合の溶出物を示す。

2-4. AmxMT1 の結晶構造

B. fulgida 由来 AmxMT1 の結晶構造解析を SAD 法を用いて行い、分解能 1.69 Å の結晶構造が得られた (図 21 a, 表 2)。AmxMT1 は NAD(P)-binding Rossmann fold と類似した 7-stranded β シートと 6 本のアルファヘリックスにより構成されるコアドメイン (N151-V280, P320-349) と 5 本のヘリックスバンドルから成る N 末端ドメインを有しており、これらは他のクラス 1 MTase にも広くみられる (55)。また、コアドメインと N 末端のドメインには、多機能酵素であるポリケチド合成酵素のメチルトランスフェラーゼドメイン (PKS C-MT) にみられるような α ヘリックスが存在していた (67)。このヘリックスと AmxMT1 の N 末端ドメインはコアドメインの上部を覆うように位置することで細長い基質ポケットを形成していた。また、結晶の作製の際にはメチル基ドナーである SAM を加えていたが、基質ポケットの底部の電子密度は SAM ではなく、SAM のメチル基が脱離した S-アデノシルホモシステイン (SAH) と一致していた (図 21 b)。SAH のアデノシル基の 2 つの水酸基は G182 の主鎖、水、D202 の側鎖と水素結合を形成し、芳香環の周辺には疎水性残基である F138, F203, F232, Y254, W229 の側鎖が位置しており、F203 と F232 の側鎖は芳香環と π - π スタッキングにより結合していた。SAH のカルボニル基は R159 の側鎖と塩橋を、水分子, Y181 と A249 の主鎖のカルボニル基, 及び G184 と F185 の主鎖の NH 基と水素結合ネットワークを形成していた。SAH のアミノ基は水分子, D186 の側鎖, C180 の主鎖のカルボニル基, 及び A249 の主鎖

	Se-urea SAD data	High resolution data
Data collection		
Beam source	BL32XU (SPring8)	BL32XU (SPring-8)
Wavelength (Å)	0.9794	1.0
Space group	P 1	P 1
Cell dimensions		
a, b, c (Å)	35.09 47.53 49.73	35.02 48.06 49.83
α, β, γ (°)	82.86 84.24 70.12	82.59 84.12 70.67
Total reflections	1616644	131492
Unique reflections	40436 (6484) _a	38897 (1761) _a
Multiplicity	40.0 (40.6) _a	3.4 (3.5) _a
Completeness (%)	100 (100) _a	97.13 (95.12) _a
Mean I/ σ (I)	13.05 (4.05) _a	7.0 (1.5) _a
R _{meas} (%) _b	23.4 (82.2) _a	10.3(62.0) _a
CC1/2 _c	0.997 _a	0.994 (0.761) _a
Refinement		
Reflections used in refinement		38856 (3800)
Reflections used for R-free		1881 (185)
R-work		0.1802 (0.2128)
R-free		0.2080 (0.2337)
Number of non-hydrogen atoms		2870
Macromolecules		2597
Ligands		0
Solvent		273
Protein residues		315
RMS(bonds)		0.006
RMS(angles)		0.80
Ramachandran favored (%)		99.35
Ramachandran allowed (%)		0.65
Ramachandran outliers (%)		0.00
Rotamer outliers (%)		0.37
Clash score		2.36
Average B-factor		23.64
Macromolecules		22.49
solvent		34.59

表2. AmxMT1の構造データの収集及び構造精密化の統計値

(a) 括弧内の数値は、最高分解能の shell data から計算した。(b) $R_{meas} = \frac{\sum hkl \{N(hkl)/[N(hkl) - 1]\}^{1/2} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum hkl \sum_i I_i(hkl)}$ (c) ランダムな half data set 間の相関係数。

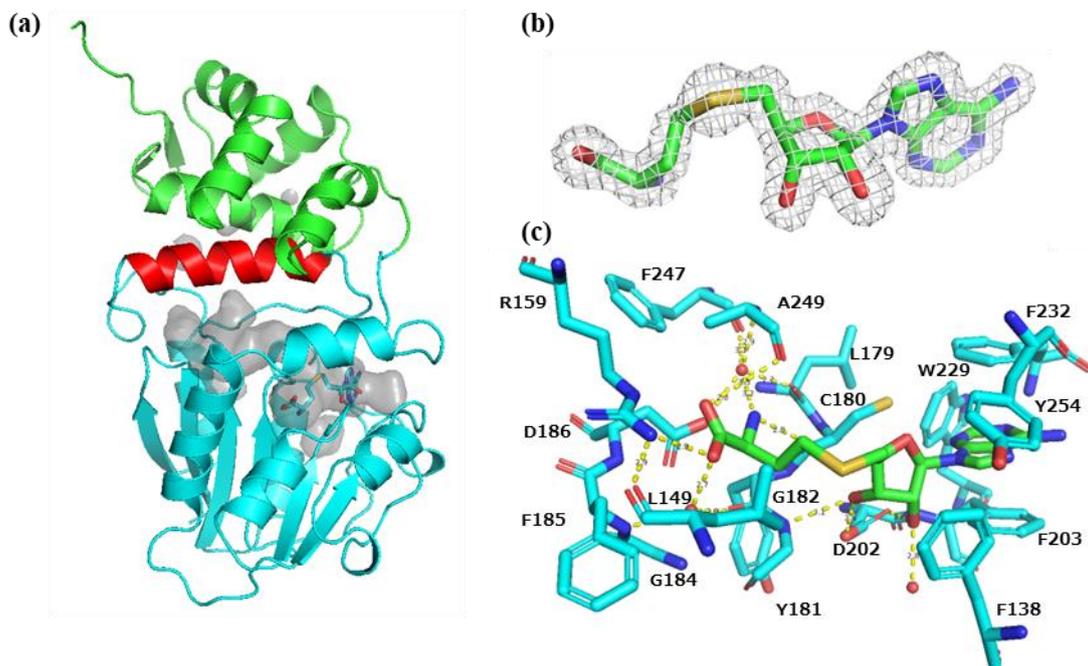


図21. AmxMT1の結晶構造

(a) AmxMT1の全体構造。コアドメイン, N末端ドメイン, 及びこれらに位置する α -ヘリックスをそれぞれcyan, green, redで示す。基質ポケットの表面はサーフェイスモデルで示す。(b) SAHの 3.0 \AA における $F_o - F_c$ Polder omit electron density map (c) SAHとAmxMT1の結合様式。SAHとその周辺のアミノ酸残基をそれぞれgreenとcyanで示す。

のアミノ基と水素結合ネットワークを形成していた (図 21 c)。

AmxMT1は放線菌 *Aspergillus fumigatus* Af293 由来のポリケチド-非リボソーム型ペプチド化合物である pseurotin 生合成においてメチル基転移反応を担う PsoF (68) と最も高い構造類似性を示した (図 22 a)。PsoF の他に構造決定されている PKS C-MT は、真菌 *Monascus purpureus* 由来ポリケチド化合物である citrinin 生合成を担う PKSCTにおいてメチル基転移を触媒する PKSCT C-MT (69) や、海洋性シアノバクテリア *Moorea producens* 由来ポリケチド化合物 Curacin A 生合成を担う CurJ においてメチル基転移を触媒する CurJ C-MT (67) が挙げられる。これらの酵素は AmxMT1 同様にホスホパンテテインとアシル基が収容可能な細長い基質ポケットを有している (図 22 b-d)。バクテリアと真菌由来 PKS-CT の基質ポケット内部には、His-Glu catalytic dyad と Tyr が保存されており、これらの酵素反応は、基質の α 炭素から His-Glu catalytic dyad が基質からプロトンを引き抜き、これによって生じたカルボアニオンが SAM のメチル基を求核攻撃することで進行する (67-69)。この反応の遷移状態において、SAM のメチル基は部分的に正電荷を帯びており、Tyr は SAM のメチル基と CH-O 水素結合を形成し、遷移状態を安定化させることで、メチル基転移を促進させる (67, 70)。AmxMT1 の基質ポケットにも、PKS C-MT とは位置は異なるが catalytic dyad であると推定される H304 と E308, 及び遷移状態の安定化に寄与すると推定される Y254 が存在していた (図 22 e)。これらのことから、AmxMT1 は PKS C-MT と同様のメカニズムで基質をメチル化すると推定された。また、AmxMT1 は Rattray らにより、梯子状疎水基の構築を担う

酵素の候補として挙げられているが、その基質ポケットには嵩高い梯子状疎水基が収納できるほどの空隙が無く、少なくともラダラン脂質生成において環化反応を担ってはいないと考えられる。

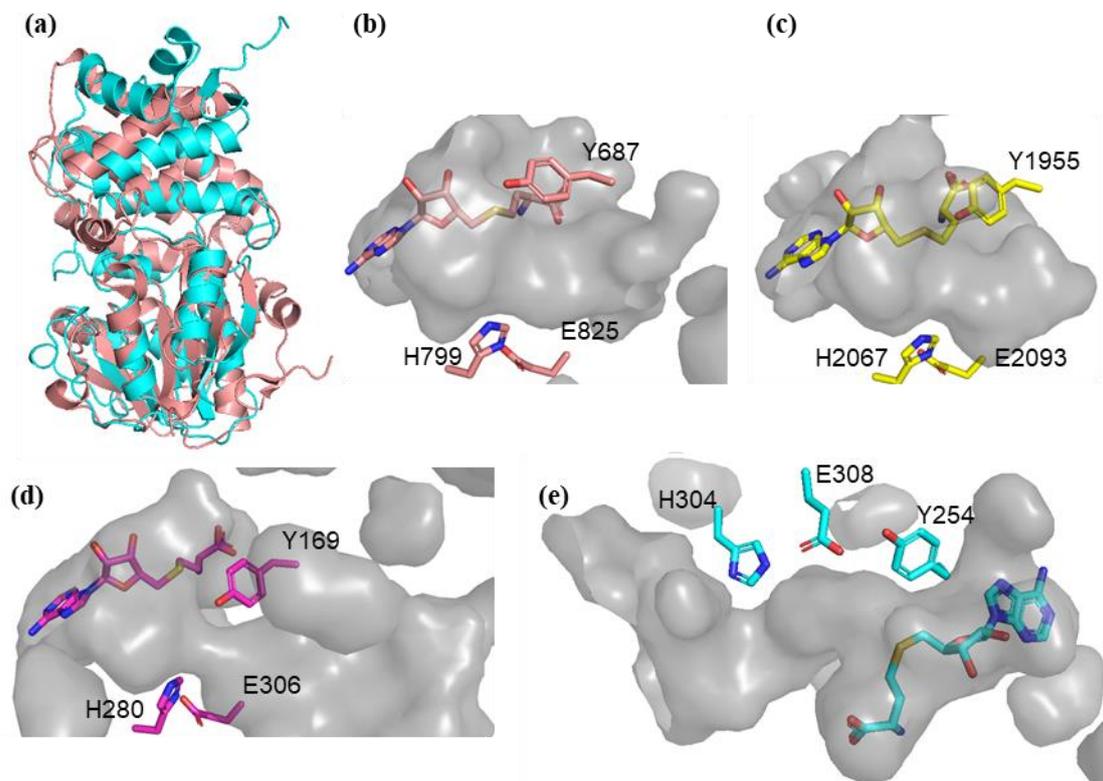


図22. AmxMT1とPKS C-MTの比較

(a) AmxMT1とPsoFの構造の重ね合わせ。AmxMT1とPsoFをそれぞれcyan, pinkで示す。(b-e)はそれぞれPsoF C-MT, citrinin synthase C-MT, CurJ C-MT, AmxMT1の基質ポケットを示す。基質ポケット表面をサーフェイスモデルで、SAHと触媒残基をスティックモデルで示す。

2-5. ACP-SAM AmxMT1 複合体モデルを用いた ACP-AmxMT1 間の相互作用の考察

PKSCT C-MT, CurJ C-MT は多機能酵素である PKS の ACP ドメインに結合したアシル基を基質とする (66, 68)。このことから、これらの PKS C-MT と ACP ドメインは FASII における ACP と β -ケトアシル ACP 合成酵素に見られるような複合体 (62) を形成すると推定される。大腸菌由来 ACP- β -ケトアシル ACP 合成酵素複合体予測モデルを、AlphaFold を用いて構築すると、予測モデルにおける ACP の β -ケトアシル ACP 合成酵素に対する配向は結晶構造における ACP の β -ケトアシル ACP 合成酵素に対する配向とほぼ一致する (図 23a)。このような結合様式は、アナモックス菌の AmxACP1- β -ケトアシル合成酵素複合体予測モデルにおいてもみられた (図 23b)。ACP-ACP-PKS C-MT 複合体の結晶構造は報告例が無いが、ACP-PKSCT C-MT 複合体と ACP-CurJ C-MT 複合体の予測モデルをそれぞれ Alpha Fold により構築すると ACP の分子表面に保存された Ser 残基が PKS C-MT の基質ポケット入り口付

近に位置したモデルが得られ、Ser残基に結合したアシル基が基質ポケット内部に侵入することが可能なモデルが得られた (図 24)。これらのことから、AlphaFold で構築した AmxACP-AmxMT1 複合体予測モデルを用いて、ACP が運搬するアシル基が AmxMT によってメチル化されるかどうかを推定できると期待された。

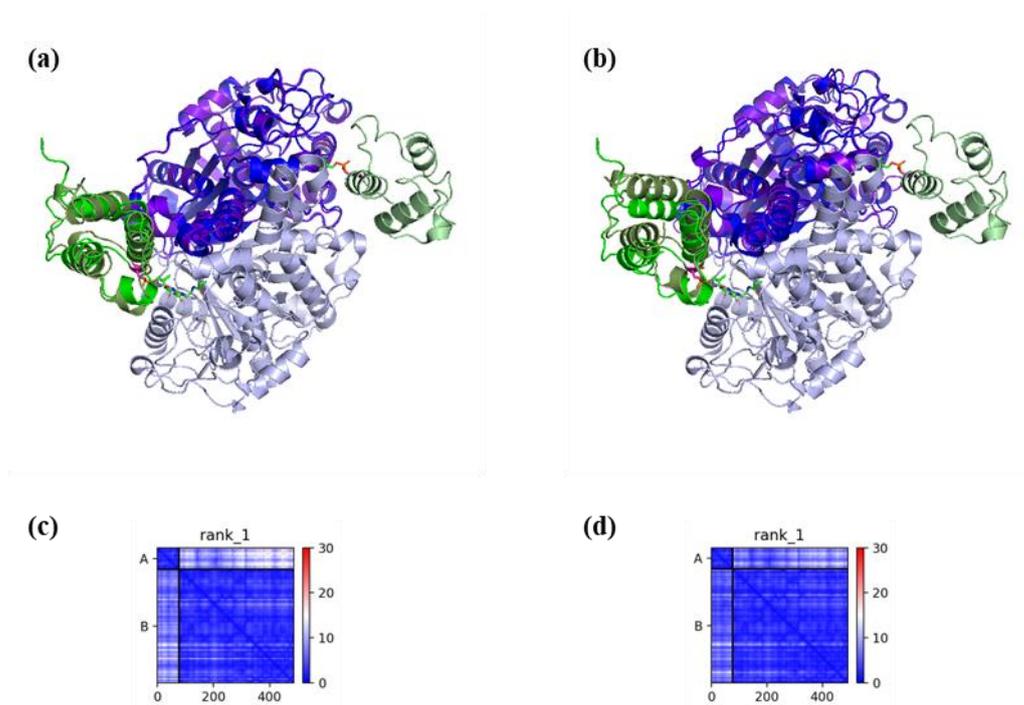


図23. AlphaFoldを用いて構築したACP-βケトアシルACP合成酵素複合体予測モデル
 (a) 大腸菌由来ACP-βケトアシルACP合成酵素複合体の結晶構造と予測モデル。結晶構造中のACP chain AとBをそれぞれpale greenとgreenで、β-ケトアシルACP合成酵素 chain AとBをそれぞれlight blueとblueで示す。αフォルドで予測したモデルにおけるACPとβ-ケトアシルACP合成酵素をそれぞれ smudgeとpurple blueで示す。(b)大腸菌由来ACP-βケトアシルACP合成酵素複合体の結晶構造とアナモックス菌*B. fulgida*由来ACP-βケトアシルACP合成酵素複合体予測モデル。結晶構造中のACP chain AとBをそれぞれpale greenとgreenで、β-ケトアシルACP合成酵素 chain AとBをそれぞれlight blueとblueで示す。αフォルドで予測したモデルにおけるACPとβ-ケトアシルACP合成酵素をそれぞれ smudgeとpurple blueで示す。(c)大腸菌由来ACP-β-ケトアシルACP合成酵素複合体予測モデルのpredicted alignment error。(d) アナモックス菌*B. fulgida*由来ACP-β-ケトアシルACP合成酵素複合体予測モデルのpredicted alignment error。

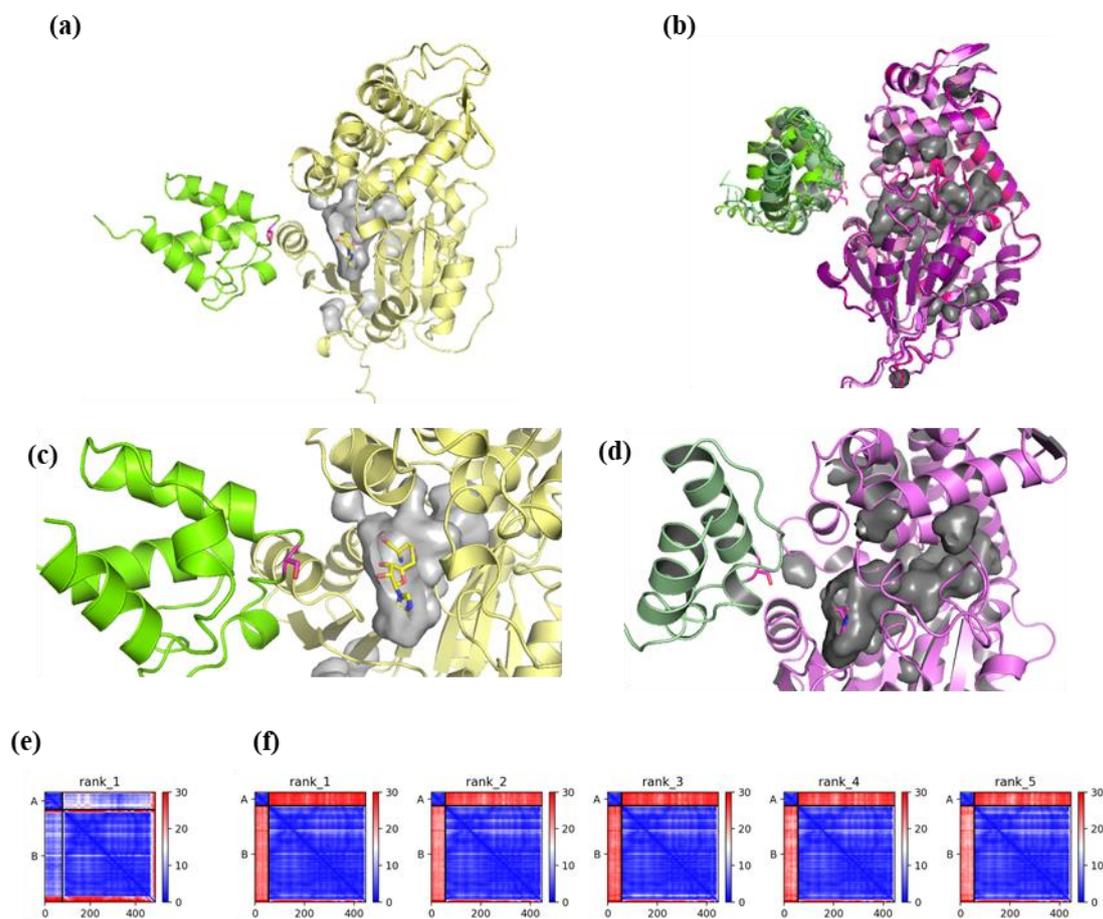


図24. AlphaFoldを用いて構築したACP-PSK C-MT複合体予測モデル

(a) ACP-PSKCT C-MT複合体予測モデルと (b) その基質ポケット入り口付近の拡大図。ACPとCitrinin synthase C-MTをそれぞれchartreuseとpale yellowで示す。結晶構造中基質ポケットをサーフェイスモデルで示す。ACPのSer37をmagentaのスティックモデルで示す。(c) ACP-CurJ C-MT複合体予測モデルrank1-5と (d) rank3の基質ポケット入り口付近の拡大図。Rank1-5における ACPをそれぞれchartreuse, smudge, pale green, lime, forest で、CurJ C-MTをそれぞれhot pink, pink, violet, purple, deep purpleで示す。結晶構造中基質ポケットをサーフェイスモデルで示す。ACPのSer17をmagentaのスティックモデルで示す。(e) ACP-PSKCT C-MT複合体予測モデルのpredicted alignment error。(f) ACP-CurJ C-MT複合体予測モデルrank1-5のpredicted alignment error。

K. stuttgartiensis, *B. fulgida*, *J. caeni* 由来の AmxACP1-AmxMT1, AmxACP2-AmxMT1, AmxACP3-AmxMT1 複合体の構造をそれぞれ alphafold2 を用いて構築したところ、モデルが 5 つずつ得られた (図 25-27)。AmxACP1-AmxMT1 複合体モデルの内、*K. stuttgartiensis* 由来 AmxACP1-AmxMT1 複合体 rank1,3, 及び *B. fulgida* 由来 AmxACP1-AmxMT1 複合体 rank1, 4, 5 において、アシル基と ppn を介して結合する Ser 残基 (Ser36) は基質ポケット入り口付近に位置していたが (図 25b)、これらのモデルの predicted alignment error は非常に大きく信頼性は低い (図 25e)。また、いずれの種由来の AmxACP2-AmxMT1 複合体のいずれのモデルにおいても、保存された Ser 残基 (Ser36) は基質ポケット入り口から離れていた (図 26 a-c)。

これに対して、*K. stuttgartiensis* 由来 AmxACP3-AmxMT 1 rank1-5, *B. fulgida* 由来 AmxACP3-MT1 rank1-5, *J. caeni* 由来 AmxACP3-AmxMT1 rank1-5 において、保存された Ser 残基 (Ser41) は基質ポケット入り口付近に位置しており (図 27a-c)、これらの内、多くのモデルは predicted alignment error が小さく信頼性の高いモデルであった (図 27d-f)。信頼性の高い、*K. stuttgartiensis* 由来 AmxACP3-AmxMT1 複合体 rank1, *B. fulgida* 由来 AmxACP3-AmxMT1 複合体 rank1, *J. caeni* 由来 AmxACP3-AmxMT1 複合体 rank1 を重ね合わせると、これらのモデルにおける AmxACP3 の AmxMT1 に対する配向および Ser41 の位置はほぼ同じであった (図 29)。これらのモデルとプルダウンアッセイの結果から、AmxMT1 は AmxACP3 が運搬するアシル基を基質として認識すると推定された。

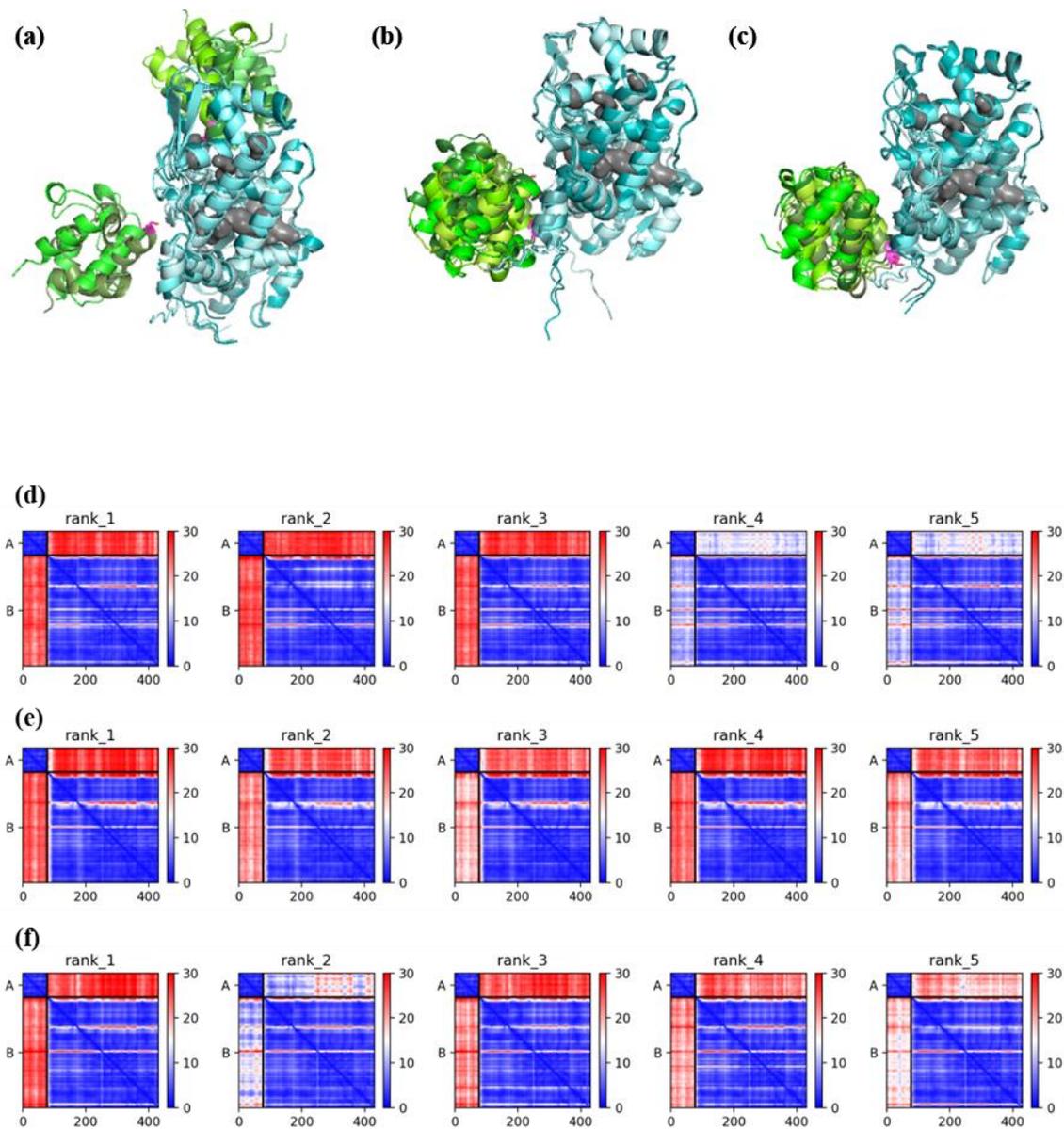


図25. AlphaFold2で構築したAmxACP1-AmxMT1複合体予測モデル

(a) (b) (c) はそれぞれ、*K. stuttgartiensis*由来、*B. fulgida*由来、*J. caeni*由来AmxACP1-AmxMT1複合体予測モデルを示す。これらの複合体rank1-5におけるAmxACP1をそれぞれgreen, chartreuse, smudge, lime, forestで、AmxMT1をそれぞれpale cyan, aquamarine, teal, deep teal, light tealで示す。また、サーフェイスモデルは*B. fulgida*由来AmxMT1の結晶構造の基質ポケットを表す。(d) *K. stuttgartiensis*由来AmxACP1-AmxMT1複合体予測モデルrank1-5のpredicted alignment errorを示す。(e) *B. fulgida*由来AmxACP1-AmxMT1複合体予測モデルrank1-5のpredicted alignment errorを示す。(f) *J. caeni*由来AmxACP1-AmxMT1複合体予測モデルrank1-5のpredicted alignment errorを示す。

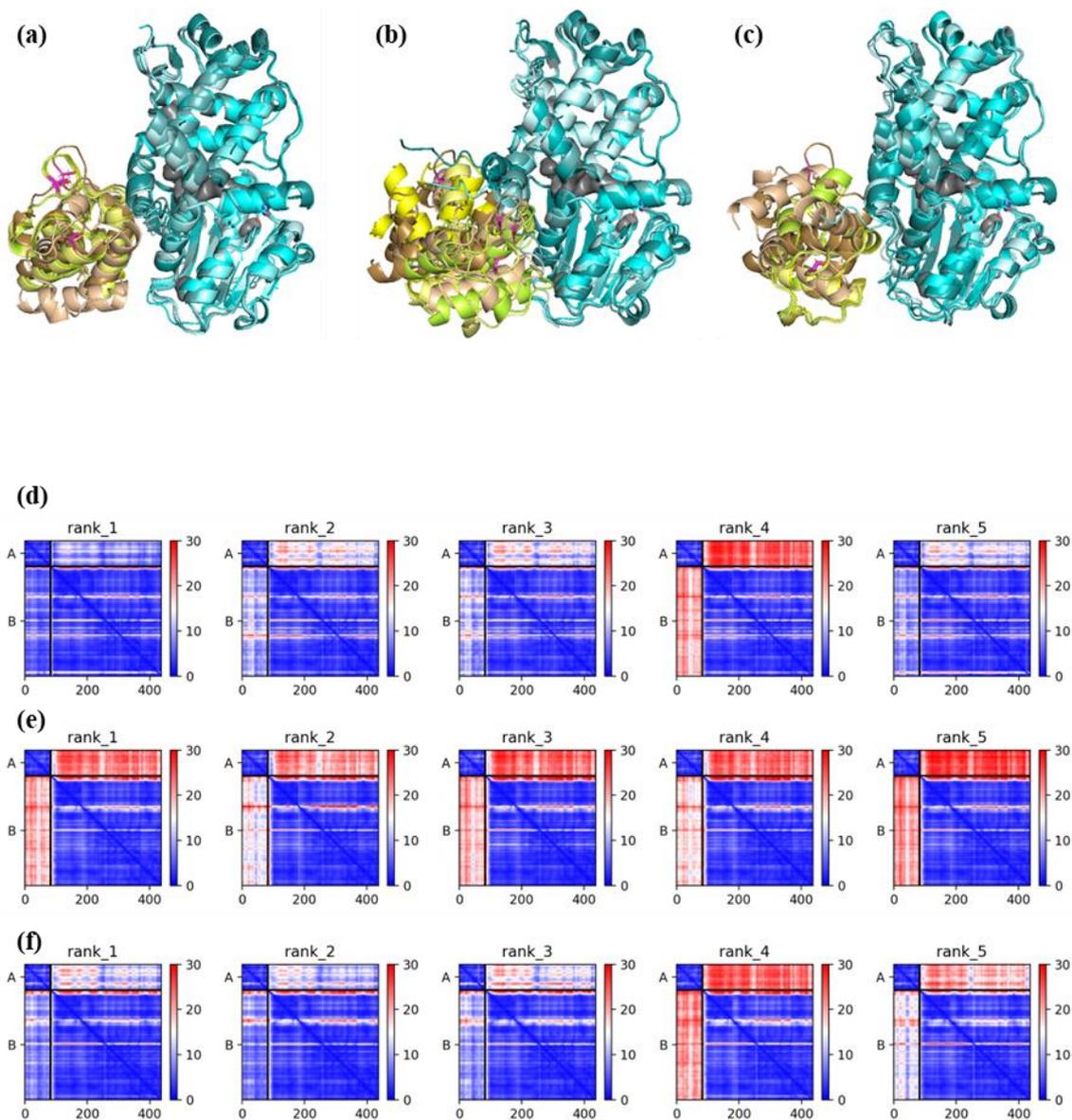


図26. AlphaFold2で構築したAmxACP2-AmxMT1複合体予測モデル

(a) (b) (c) はそれぞれ、*K. stuttgartiensis*由来、*B. fulgida*由来、*J. caeni*由来AmxACP2-AmxMT1複合体予測モデルを示す。これらの複合体rank1-5におけるAmxACP2をそれぞれyellow, pale yellow, limon, wheat, sandで、AmxMT1をそれぞれpale cyan, aquamarine, teal, deep teal, light tealで示す。また、サーフェイモデルは*B. fulgida*由来AmxMT1の結晶構造の基質ポケットを表す。(d) *K. stuttgartiensis*由来AmxACP2-AmxMT1複合体予測モデルrank1-5のpredicted alignment errorを示す。(e) *B. fulgida*由来AmxACP2-AmxMT1複合体予測モデルrank1-5のpredicted alignment errorを示す。(f) *J. caeni*由来AmxACP2-AmxMT1複合体予測モデルrank1-5のpredicted alignment errorを示す。

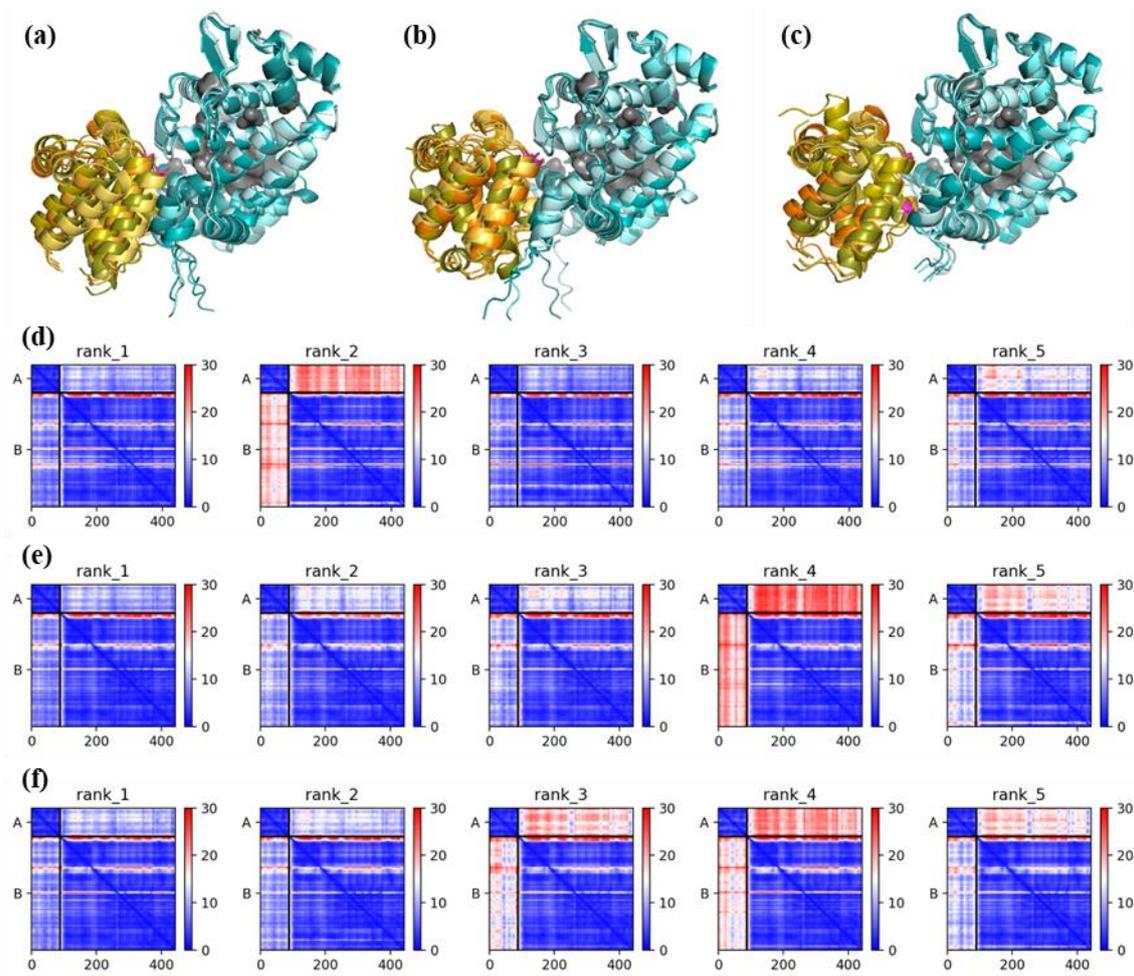


図27. AlphaFold2で構築したAmxACP3-AmxMT1複合体予測モデル

(a) (b) (c) はそれぞれ、*K. stuttgartiensis*由来、*B. fulgida*由来、*J. caeni*由来AmxACP3-AmxMT1複合体予測モデルを示す。これらの複合体rank1-5におけるAmxACP3をそれぞれorange, bright orange, light orange, olive, deep oliveで、AmxMT1をそれぞれpale cyan, aquamarine, teal, deep teal, light tealで示す。また、サーフェイスモデルは (d) *K. stuttgartiensis*由来AmxACP3-AmxMT1複合体予測モデルrank1-5のpredicted alignment errorを示す。(e) *B. fulgida*由来AmxACP3-AmxMT1複合体予測モデルrank1-5のpredicted alignment errorを示す。(f) *J. caeni*由来AmxACP3-AmxMT1複合体予測モデルrank1-5のpredicted alignment errorを示す。

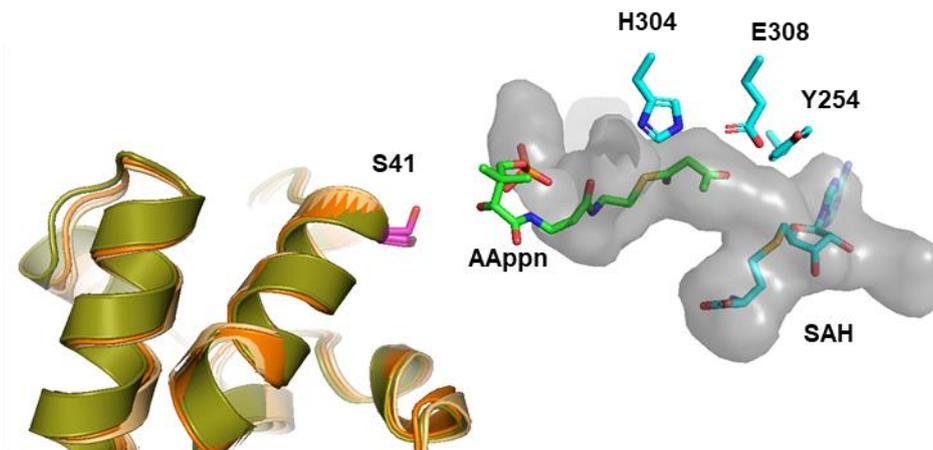


図28. AmxACP3とアセトアセチルppnのAmxMT1に対する推定結合様式

AmxMT1の結晶構造の基質ポケットをサーフェイスモデルで、触媒残基をシアンのスティックモデルで示す。AmxACP3-AmxMT複合体予測モデルにおける*K. stuttgartiensis*由来、*B. fulgida*、*J. caeni*由来AmxACP3をそれぞれorange, pale orange, oliveで示す。アシル基が結合すると推定されるSer残基をマゼンタのスティックモデルで示す。ドッキングシミュレーションによりAmxMT1に結合させたAAppnをgreenのスティックモデルで示す。

2-6. ドッキングシミュレーションによる AmxMT1 の基質の推定

PKS C-MT が基質の炭素原子に SAM のメチル基を転移させる際、反応は基質の脱プロトン化によって開始される (67)。メチル化される炭素原子は隣接する 2 つのカルボニル基によって脱プロトン化が促進される必要があり、例えば、CurJ C-MT は β -ケトアシル ACP をメチル化するが、ベータヒドロキシアシル ACP をメチル化できない (67)。また、AmxMT1 の基質ポケットは浅く、SAM 結合部位よりも奥にアシル基を収容可能な空隙が存在しないことから、AmxMT は短鎖 β -ケトアシル ACP をメチル化すると推定される。そこで、webina を用いて、最も短い β -ケトアシル基を有するアセトアセチル ppn (AAppn) をドッキングシミュレーションにより AmxMT1 の結晶構造に結合させた。その結果、AAppn が AmxMT1 の基質ポケットに隙間なく収まるモデルが得られた (図 28)。AAppn の α 炭素は基質からプロトンを引き抜く catalytic dyad であると推定される His304 と Glu308、及び SAH の硫黄原子近い位置にあった。これらの結果から、AmxMT1 はアセトアセチルなどの短鎖 β -ケトアシル基をメチル化することが示唆された。

近年、Tantillo らにより、定量的科学計算により、オリゴシクロプロパンの梯子状疎水基への変換がほぼ thermoneutral であることが示された (図 15) (58)。脂肪酸へのシクロプロピル基の挿入は、大腸菌 *Escherichia coli* や結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* などにおいて、SAM MTase に分類されるシクロプロパンシンターゼによってなされる (59, 60)。また、放線菌 *Streptoverticillum fervens* 由来ポリケチド Jawsamycine が有するシクロプロピル基は不飽和アシル基にメチル基がラジカル SAM 酵素 jaw5 によって挿入されることで構築される (60)。このため、FASII 遺伝子クラスターにシクロプロパン環の形成が可能な SAM MTase やラジカル SAM 酵素を有するアナモックス菌において、ラダラン脂質がオリゴシクロプロパンを

基に生産されることは Tantillo らの提唱と矛盾しない。このため、AmxMT1 がシクロプロパン環を形成する可能性についても考察した。大腸菌や結核菌由来のシクロプロパン合成酵素はアシル基の二重結合にメチル基を転移させ、シクロプロパン環を形成する (59, 60)。これらの基質ポケットには、シクロプロパン環形成後に、基質からプロトンを引き抜くことにより反応を停止させると推定される重炭酸イオンが存在する (59, 60, 71)。本研究で得られた AmxMT1 の結晶構造において、重炭酸イオンは見られず、加えて、SAM と基質が反応の進行が可能なコンフォメーションをとるように基質ポケットに収まった場合に、重炭酸イオンが入るだけの空隙がないため、既知の MTase と同様のメカニズムでは AmxMT1 はシクロプロパン合成酵素としては働かないと推定される。AmxMT1 の真の基質は明らかではないが、本研究で得られた情報、及び既知の SAM MTase の反応メカニズムは AmxMT1 が短鎖 β -ケトアシル AmxACP3 をメチル化することを支持する。

2-7. 実験手法

2-7-1. ACP の発現・精製

Brocadia fulgida 由来 AmxACP1, AmxACP2, AmxACP3 をそれぞれコードする遺伝子を大腸菌での発現に適したコドン使用頻度となるように人工合成し、これらをそれぞれ pET28b に挿入した。また、AmxACP1 の C 末端には HRVC3 認識配列と 8×His タグを、AmxACP2 と AmxACP3 の C 末端には TEV プロテアーゼ認識配列と 8×His タグを付加した。AmxACP1, AmxACP2, 及び AmxACP3 発現ベクターをそれぞれ導入した大腸菌 BL21(DE3) 培養液 1 mL を 25 μ g/mL のカナマイシン, 500 μ M IPTG, 0.025% グルコースを含む LB 培地 100 mL に加え、30°C, 150 rpm で振盪培養した。16-24 h 後に培養液を 4°C, 6000 rpm で 10 分間遠心分離し、ペレットを -80°C で保存した。アナモックス菌由来 ACP の精製は His タグの切断に使用するプロテアーゼを除いてすべて同じ条件で行った。アナモックス菌由来 ACP を発現させた大腸菌を菌体 1 g 当たり 5 mL の ACPA バッファー (50 mM KPi pH8.0, 200 mM NaCl, 500 μ M DTT) に懸濁し、PMSF, Sm2 ヌクレアーゼ, リゾチーム, TritonX 100 をそれぞれ終濃度 2 mM, 6 μ g/mL, 0.5 mg/mL, 0.5% となるように加え、4°C, 30 min 転倒混和した。続いて、無細胞抽出液を 10000 rpm, 30 min 遠心分離し、上清を再度、4°C, 18000rpm, 20 min 遠心分離した。上清に等量の 2-プロパノールを加え、4°C, 10 min 静置し、ACP A バッファーで 2 倍希釈し、4°C, 10000 rpm, 10 min 遠心分離した。上清を A バッファーで平衡化した Ni-NTA agarose を充填したカラムへアプライし、20 CV の ACPA バッファーで洗浄を行った。ACP は、ACP B バッファー (200 mM NaCl, 250 mM イミダゾール, 500 μ M DTT, 50 mM KPi pH8.0) で溶出した。得られた ACP の濃度を 280 nm の吸光度から算出し、AmxACP1 には HRV3C プロテアーゼを AmxACP2 と AmxACP3 には TEV プロテアーゼをそれぞれ 1/10 等量加え、4°C, o/n 転倒混和した。ACP C バッファー (50 mM KPi pH8.0, 200 mM NaCl, 500 μ M DTT) で 12.5 倍希釈し、再度 Ni-NTA agarose へアプライし、フロースルーを回収した。1CV の ACP C バッファーで担体を洗浄し、これをフロースルーと混合し、Amicon Ultra 3 k を用いて濃縮した。

2-7-2. ACP 固定化担体の調製

AmxACP1, AmxACP2, AmxACP3 をそれぞれカップリングバッファー (0.2M NaHCO₃, 500 mM NaCl) に希釈と濃縮を繰り返すことで置換し、BCA アッセイにより濃度を測定し、0.7 mg/mL とした。1 mM HCl で洗浄した NHS-activated Sepharose 100 μL と 200 μL の 0.7 mg/mL ACP 溶液を混合し、4°C, o/n 転倒混和し、ACP を担体に固定化した。スピンドウンし担体を回収し、上清に未反応の ACP が残っていないことを SDS-PAGE により確認した。担体に 200 μL のブロッキングバッファー (500 μM エタノールアミン pH8.3, 500 mM NaCl) を加え、4°C, o/n 転倒混和し、未反応の NHS 基を不活性化した。スピンドウンすることで担体を回収し、1 mL の PBST で 3 回洗浄した。

2-7-3. ACPS の発現・抽出

B. fulgida 由来 ACPS をコードする遺伝子 (*broful00293*) を大腸菌での発現に適したコドン使用頻度となるように人工合成し、pET28b に挿入した。これを導入した大腸菌 BL21(DE3) 培養液 1 mL を 25 μg/mL のカナマイシン, 500 μM IPTG, 0.025% グルコースを含む LB 培地 100 mL に加え、30°C, 150 rpm で振盪培養した。24 h 後に培養液を 6000 rpm で 10 分間遠心分離し、ペレットを -80°C で保存した。PMSF, Sm2 ヌクレアーゼ, リゾチーム, TritonX 100 をそれぞれ終濃度 2 mM, 6 μg/mL, 0.5 mg/mL, 0.5% となるように加え、4°C, 30 min 転倒混和した。続いて、無細胞抽出液を 10000 rpm, 30 min 遠心分離し、上清を再度、4°C, 18000rpm, 20 min 遠心分離した。

2-7-4. AmxMT1 の発現・精製

B. fulgida 由来 AmxMT1 をコードする遺伝子が大腸菌での発現に適したコドン使用頻度となるように人工合成し、これを pET28b に挿入した。AmxMT1 の C 末端には TEV プロテアーゼ認識配列と 6×His タグを付加し、また、ディスオーダー領域であると予測された N 末端 5 残基は欠損させた。AmxMT1 発現ベクターを導入した大腸菌 C43(DE3) pGro7 培養液 1 mL を 25 μg/mL, 30 μg/mL のカナマイシン, 500 μM IPTG, 0.025% グルコース, 0.026% アラビノースを含む TB 培地 700 mL に加え、25°C, 150 rpm で振盪培養した。16 h 後に培養液を 4°C, 6000 rpm で 10 分間遠心分離し、ペレットを -80°C で保存した。AmxMT1 を発現させた大腸菌を菌体 1 g 当たり 5 mL の AmxMT1 A バッファー (50 mM Tris-HCl pH8.0, 100 NaCl, 10 % グリセロール, 20 mM イミダゾール) に懸濁した。PMSF を終濃度 2 mM となるように、少量のリゾチームと Sm2 ヌクレアーゼを加え、菌体を超音波破碎し、無細胞抽出液を 4°C, 10000 rpm 30 min 遠心分離した。上清を A バッファーで平衡化した Ni-NTA agarose を充填したカラム ヘアプライシ、20 CV の AmxMT1 A バッファーで洗浄を行った。AmxMT1 は、AmxMT1 B バッファー (50 mM Tris-HCl pH8.0, 100 mM NaCl, 10 % グリセロール, 250 mM イミダゾール) で溶出した。Amicon Urutla 30 k を用いて、AmxMT1 を体積が 10 mL 以下になるまで濃縮し、濃度を 280 nm の吸光度から算出し、等量の TEV プロテアーゼと混合し、半透膜に入れ、1L の AmxMT1 C バッファー (50 mM Tris-HCl pH8.0, 100 NaCl, 10 % グリセロール)

ール4°C)を用いて4°Cで、一晚透析した。再度Ni-NTA agaroseを用いて精製し、フロースルーと洗浄画分を回収した。続いて、superdex75 カラムと AmxMT1 C バッファーを用いてゲルろ過精製を行った。

2-7-5. プルダウンアッセイ

AmxMT1, ACPS を発現させた大腸菌をそれぞれ菌体 1g 当たり、5 mL のプルダウンバッファー (20 mM KPi pH8.0, 200 mM NaCl, 10 % グリセロール) に懸濁し、PMSF, Sm2ヌクレアーゼ, リゾチーム, TritonX 100 をそれぞれ終濃度 2 mM, 6 µg/mL, 0.5 mg/mL, 0.5%となるように加え、4°C, 30 min 転倒混和した。続いて、無細胞抽出液を 10000 rpm, 30 min 遠心分離し、上清を再度、4°C, 18000rpm, 20 min 遠心分離し、上清を回収した。AmxMT1, または ACPS を含む大腸菌破砕液上清 500µL をそれぞれ 25µL の ACP 固定化担体と混合し、4°C, 一晚転倒混和した。スピンドウンし、担体を回収し、これを 500µL のプルダウンバッファーで 2 回洗浄した。担体に 50µL の SDS サンプルバッファーを加え 95°C, 5 min インキュベートし、溶出物に対して、マウス由来 His タグ抗体と HRP 標識ヤギ由来抗マウス IgG を用いてウェスタンブロッティングを行った。また、ネガティブコントロールとして、ACP 固定化担体の代わりに、エタノールアミンによるブロッキングのみを行ったセファロース担体を用いて同様の操作を行った。

2-7-6. AmxMT1 の結晶構造解析

精製後の AmxMT1 を 10 mg/mL になるまで、Amicon Ultra 30 K を用いて濃縮し、DTT と SAM をそれぞれ終濃度 5 mM, 2.25 mM となるように加えた。1 µL の AmxMT1 溶液と等量の 0.1 M HEPES pH 7.0, 15 % polyethylene glycol 2000 を混合し、蒸気拡散法により 20 °C で結晶化させた。SAD 法による位相決定に用いる結晶は飽和濃度のセレノウレアを含む 250 mM 酢酸ナトリウム, 25 % ポリエチレングリコール 3,350, 10 % グリセロール, 10 mM ジチオナイトに浸した (72)。結晶は 100 K の窒素ガスの気流下で瞬間凍結し、セレノウレアを結合させた SAD 法に用いるデータセットは 0.9794 Å, 高分解能データセットは 1.0 Å の X 線を用いて、SPring-8 BL32XU で収集した。高分解能の AmxMT1 結晶構造は SAD 法により得られた構造を用いて、分子置換法により決定した。SAD 法による位相決定及び初期のモデル構築は Phenix suite を、モデル構築及び精密化は Coot と Phenix refine により行った。(73, 74)。

2-7-7. Alpha Fold によるタンパク質の構造予測

全ての予測モデルは AlphaFold2 advanced を用いて構築した。複合体のモデル構築の際には ACP:酵素を 1:1 とした。

2-7-8. ドッキングシミュレーション

ドッキングシミュレーションは Webina 1.0.3 を用いて行った。Chem3D 16.0 (Perkin Elmer)

で MM2 処理により構造を最適化した *S*-アセトアセチル-4'-ホスホパンテテインのモデル構造をリガンドとして、水素原子を付加し SAH を取り除いた AmxMT1 の結晶構造をアクセプターとして用いた。ボックスサイズは $15 \times 8 \times 15 \text{ \AA}^3$ を使用し、SAH とリガンドのクラッシュを避けるように設定した。

3章 アナモックス菌のネイティブ ACP に対する抗体の作製と ACP の精製

3-1. 緒言

アナモックス菌が生産するラダラン脂質 (42, 43) は 5 つの四員環または六員環と 3 つの四員環が連なった歪みの大きな梯子状疎水基 ([5]-ラダラン, [3]-ラダラン) を有することからその生合成メカニズムが注目されている。一般的にバクテリアの脂肪酸は II 型脂肪酸生合成系 (FASII) で生産される。この経路ではアシルキャリアプロテイン (ACP) に共有結合している新生鎖が、FAS II の酵素群により、縮合、還元、脱水、還元 の 4 段階の反応から成る伸長サイクルを繰り返すことで、炭素鎖長が 2 ずつ伸長し、最終産物として炭素鎖長 16 のパルミチン酸が生産される (48)。比較ゲノム解析などに基づいて、ラダラン脂質は FAS II と同様に、ACP に結合している生合成中間体を基に生産されると提案されている。ACP は 10 kDa ほどの 4 ヘリックスバンドルタンパク質であり、分子表面に保存された Ser 残基を有しており、これは 4'-ホスホパンテテイン (ppn) と共有結合する (48)。ACP は 10 kDa ほどの 4 ヘリックスバンドルタンパク質であり、分子表面に保存された Ser 残基を有しており、これは 4'-ホスホパンテテイン (ppn) と共有結合する。ACP はアシル基と ppn とのチオエステル結合を介して結合し、伸長反応を担う様々な酵素へと運搬する (48)。アナモックス菌の FASII 遺伝子クラスターには 3 種の ACP (AmxACP1, AmxACP2, AmxACP3) がコードされている (47)。これらの内、AmxACP1 は典型的な脂肪酸生合成に関与する大腸菌由来 ACP との相同性 (query coverage 92%, identity 54%) が高いことから、典型的な脂肪酸生合成に関与すると推定されるが、AmxACP2 と AmxACP3 は大腸菌由来 ACP との相同性が低い (AmxACP2: query coverage: 39%, identity 41%, AmxACP3: query coverage: 38%, identity 47%)。また、ACP3 は結晶構造解析が行われており、ヘリックス III が非常に柔軟な 3_{10} ヘリックスであることや、ヘリックス 1 と 2 の間に、長いアシル基が ACP へとロードされた際に、チオエステル結合を加水分解から保護すると推定される dual phenylalanine motif を有するなど、他の ACP とは異なる特徴を有する (62)。

天然物生合成経路探索研究の解明には、遺伝子破壊が広く用いられているが、アナモックス菌は増殖が極めて遅く、遺伝子組み換えを行えない。このため、ラダラン脂質生合成経路の解明には、アナモックス菌の遺伝子破壊を必要としない方法が求められる。大腸菌において、ACP は細胞内に豊富に存在しており、大腸菌湿潤菌体重量 1 g 当たり約 120-150 μ g 得ることができ、その 8-12% にはアシル基が結合している (75)。大腸菌のアシル ACP の大部分は FASII の生合成中間体である炭素鎖長が 15 以下の中鎖アシル ACP であり、最終産物である炭素鎖長が 16 のパルミトイル ACP はほとんど存在しない (75)。このことから、アナモックス菌においても同様に、ラダラン脂質生合成中間体が結合している ACP が蓄積していると期待される。そこで、アナモックス菌からネイティブ ACP を精製し、これに結合している生合成中間体を同定すること、及びラダラン脂質生合成中間体の運搬を担う ACP を同定することを目指す。前述のとおり、アナモックス菌は遺伝子組み換えが行えないため、ACP にタンパク質の精製に広く用いられる His タグなどのタグを付加することは

できない。タグのついていないタンパク質を精製することは容易ではなく、また、収量も多くは見込めない。そこで、抗 ACP 抗体を作製・精製し、これを固定化した担体を用いて、アナモックス菌からネイティブ ACP を精製した。

結果・考察

3-2. アナモックス菌の培養

アナモックス菌の培養には反応器の出口をアナモックス菌が透過できないポアサイズの膜で覆うことで増殖した細胞の漏出を防ぐことができる Membrane bio reactor (MBR) (1,2, 76) を用いた。アナモックス菌が他の生物に対して優位に生育可能な、有機物を含まず、 NO_2^- と NH_4^+ を含む培地を用いて、MBR を窒素で充填させることで嫌氣的に保ちながら、湖山池の堆積物からアナモックス菌が **dominant** となる菌叢を培養した。細菌の 16SrRNA V3-V4 領域の配列を増幅するプライマーを用いて、菌叢解析を行ったところ、44.5 %が *Brocadia* 属アナモックス菌であった (図 29)。

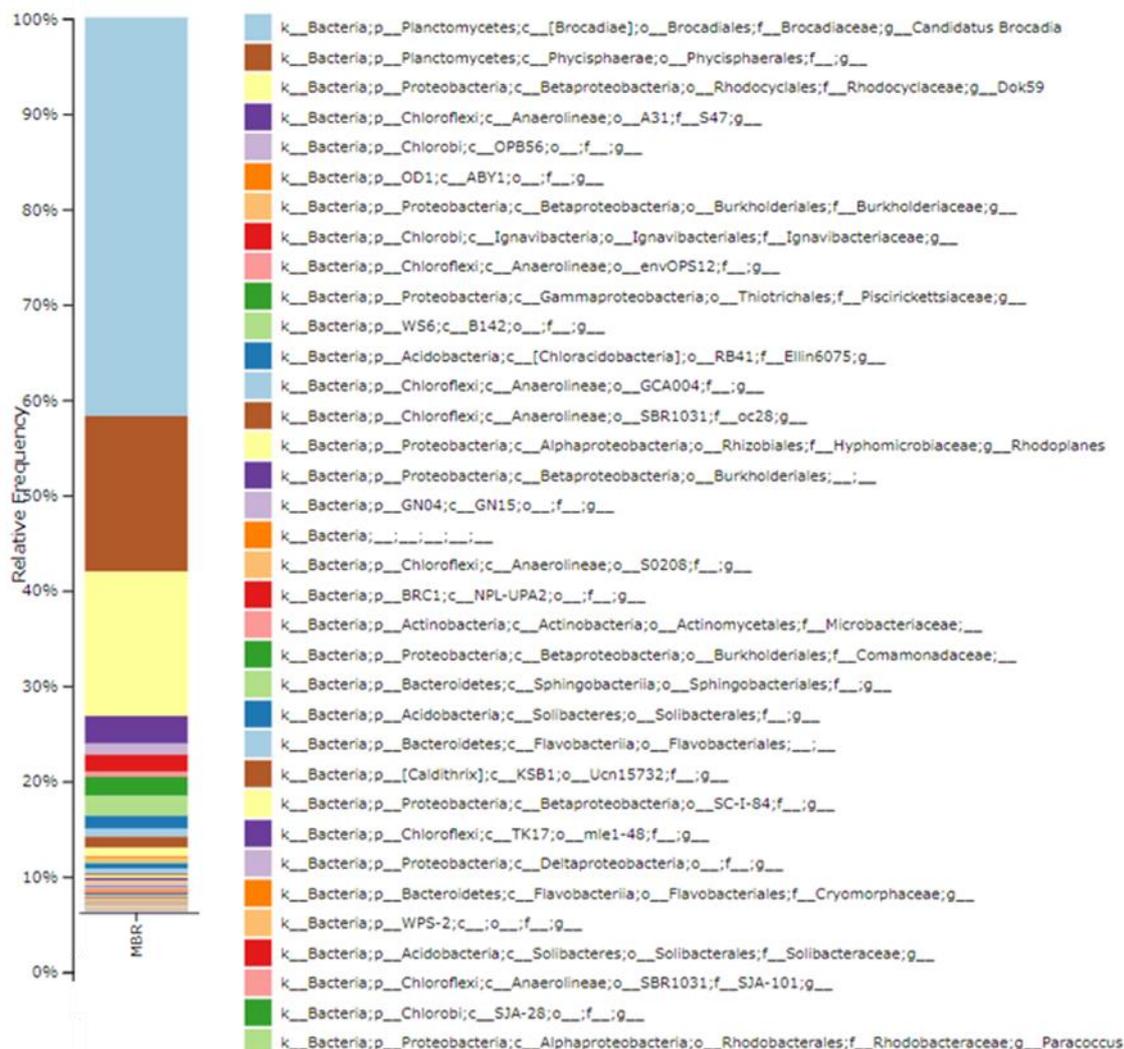


図29. アナモックスリアクターの菌叢解析の結果

16SrRNA V3-V4領域の配列から同定された属と菌叢の内これらが占める割合を示す。

3-3. アナモックス菌の総脂質の分析

アナモックス菌がラダラン脂質を生産していることを確認するため、当研究室で培養したアナモックス菌から、総脂質を抽出し、メタノリシスによって脂肪酸のメチルエステル化を行った。得られた脂肪酸メチルエステルを GC-MS により分析したところ、[3]-ラダランと[5]-ラダランにそれぞれ特徴的な $m/z=131, 161$ のピーク (43) が検出され (図 30)、当研究室で得られたアナモックス菌の総脂質にラダラン脂質が含まれていることが確認できた。

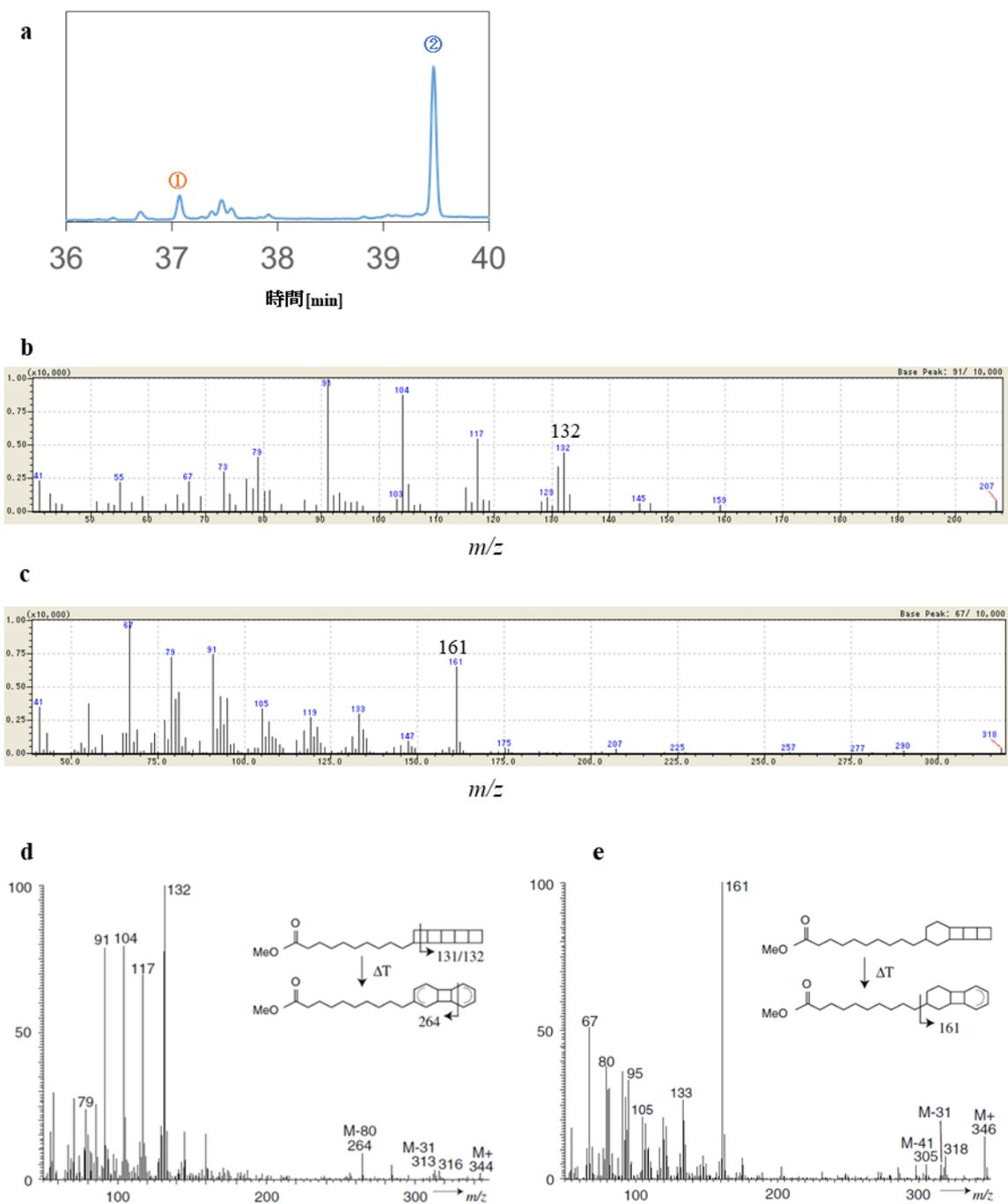


図.30 アナモックス菌総脂質に含まれるラダラン脂質の分析
 (a) アナモックス菌の総脂質のガスクロマトグラム。(b) リテンションタイム37.0 min付近のピーク1のMSスペクトル。(c) リテンションタイム39.5 min付近のピーク2のMSスペクトル。(d)[5]-ラダランを有する脂肪酸メチルエステルのMSスペクトル。(e) [3]-ラダランを有する脂肪酸メチルエステルのMSスペクトル(43)。

4-4. 抗 ACP 抗体 の 作 製 ・ 精 製

大腸菌に異種発現させ、精製することで得られた AmxACP1-3 をそれぞれ用いて、ウサギを免疫し、血清を得た。血清から、AmxACP1-3 をそれぞれ固定化した担体を用いて、抗 ACP 抗体を精製し、精製後の試料の SDS-PAGE を行ったところ、抗 AmxACP1, 2, 3 抗体がそれぞれ得られていることが確認できた (図 31)。

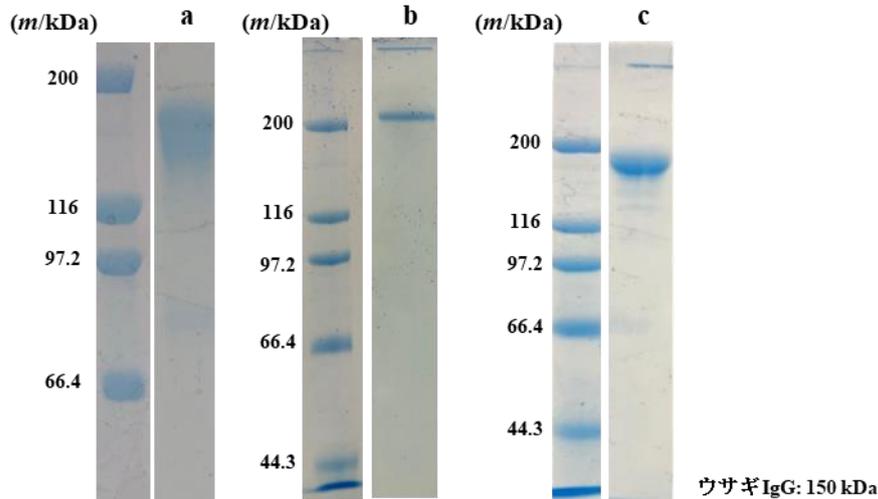


図31. 抗AmxACP抗体の精製

a, b, cはそれぞれ精製後の抗AmxACP1, 2, 3抗体のSDS-PAGEの結果を示す。すべてのサンプルは還元剤を加えずに泳動した。

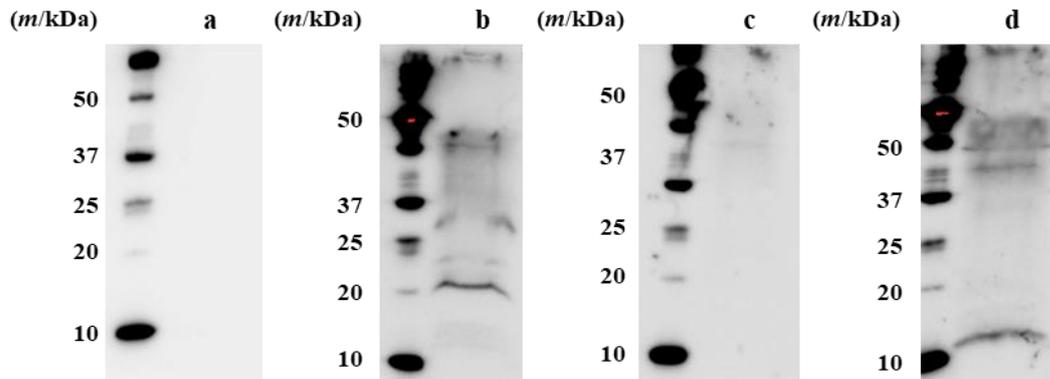


図32 アナモックス菌におけるACPの発現

(a) アナモックス菌破碎液に対して、HRP標識-抗ウサギIgG抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った結果を示す。(b) HRP標識-抗ウサギIgG抗体と抗AmxACP1抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った結果を示す。(c) HRP標識-抗ウサギIgG抗体と抗AmxACP2抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った結果を示す。(d) HRP標識-抗ウサギIgG抗体と抗AmxACP3抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った結果を示す。

3-5. AmxACP の 発 現 確 認 及 び 精 製

アナモックス菌を破碎・遠心分離し、上清に対して抗 AmxACP1, 2, 3 抗体及び HRP 標識

抗ウサギ IgG 抗体を用いて、ウェスタンブロッティングを行ったところ、AmxACP2 は検出されなかったが、AmxACP1 は及び AmxACP3 が検出された。

続いて、AmxACP1 と AmxACP3 をそれぞれ抗 AmxACP1 抗体固定化担体と抗 AmxACP3 抗体固定化担体を用いて精製した。精製後の試料に対してウェスタンブロッティングを行ったところ、AmxACP1, AmxACP3 ともに得られていることが確認できた。大腸菌から ACP を精製した場合、湿潤菌体 1 g 当たり 120-150 μg の ACP が得られると報告されているが (75)、アナモックス菌から得られた AmxACP1 と AmxACP3 は共に、湿潤菌体 1 g 当たり、10 μg 以下であり、ACP に結合している生合成中間体の同定に十分な量の ACP は得られなかった。ラダラン脂質生合成中間体の同定には至らなかったが、本研究室のアナモックス菌の総脂質にはラダラン脂質が含まれており、その破碎液上清から AmxACP1 と AmxACP3 のみが検出されたことから、ラダラン脂質生合成中間体が ACP によって運搬されるのであれば、ラダラン脂質生合成には AmxACP1 と AmxACP3 のいずれか、またはその両方が関与し、一方で AmxACP2 は関与しないことが示唆された。しかし、これを立証するためには、大規模なアナモックス菌の遺伝子クラスターを他の生物へ導入し、ラダラン脂質生産系を構築したうえで、AmxACP を欠損させ、そのラダラン脂質生産能を調べる必要がある。

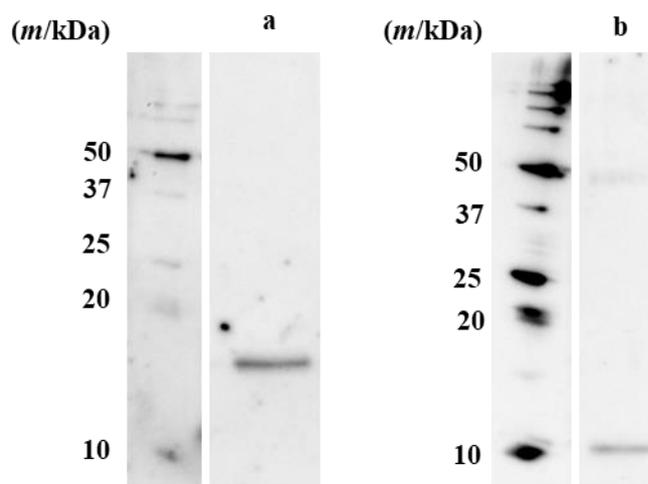


図.33 ネイティブAmxACPの精製

(a) 精製後のネイティブ AmxACP1 に対して、HRP 標識-抗ウサギ IgG 抗体と抗 AmxACP1 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った結果を示す。(b) 精製後のネイティブ AmxACP3 に対して、HRP 標識-抗ウサギ IgG 抗体と抗 AmxACP3 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った結果を示す。

3-6. 実験操作

3-6-1. アナモックス菌の培養

湖山池堆積物を付着させた担体を反応器に入れ、35°C で適量の NaNO_2 と $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を含むアナモックス培地 (5 μM KHCO_3 , 200 μM KH_2PO_4 , 33 μM MgSO_4 , 1.2 μM CaCl_2 , EDTA \cdot 2Na, 33 μM FeSO_4 , 1.5 μM ZnSO_4 , 1 μM CoCl_2 , 5 μM MnCl_2 , 1 μM CuSO_4 , 1.2 μM Na_2Mo , 800 nM

NiCl₂, 550 nM Na₂SeSO₄, 71 nM H₃BO₃) を供給し、供給した量と等量の培地を反応器から吸引することです。アノモックス菌を連続培養した。アノモックス培地の NaNO₂ と (NH₄)₂SO₄ の濃度は、ほぼすべての NO₂⁻ と NH₄⁺ がアノモックス反応に消費されるよう、アノモックス菌の増殖に応じて上昇させ、リアクター内の NH₄⁺ 濃度は 5 mg/L 以下に保った。また、アノモックス菌が反応器から流出することを防ぐために反応器の出口はメンブレンで覆った。

3-6-2. アノモックス菌の菌叢解析

GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kits (Sigma aldrich) を用いてアノモックス菌のゲノムを抽出し、株式会社生物技研に 16SrRNA の V3-V4 領域のアンプリコンシーケンス解析を依頼した。

3-6-3. アノモックス菌の総脂質の分析

アノモックス菌をフリーズドライし、乾燥菌体重量 1 mg 当たり 140 μL のメタノールに懸濁し、これを氷上でソニケートした。続いて、ジクロロメタン/メタノール (1:1) を加え、懸濁し、4°C, 800g 15 min 遠心分離した。上清を減圧乾燥することで、アノモックス菌総脂質を得た。アノモックス菌総脂質 1 mg をメタノール/ヘキサン (1:1) 1 mL に溶解させ、BF₃-HCl 200 μL, 2,2-ジメトキシプロパン 50 μL を加え、60°C, 10 min インキュベートした。ヘキサンを 500 μL 加え、激しくボルテックスし、これを 800 g, 5 min 遠心し、ヘキサン層を回収した。スパーテル 1 杯分の無水硫化ナトリウム加え、30 min 攪拌した後に、硫化ナトリウムの沈殿を除去した。上清を減圧乾燥により濃縮し、DB-1 カラム (Agilent) を用いて GC-MS により分析した。

3-6-4. 抗 ACP 抗体の作製・精製

アノモックス菌由来 ACP の発現・精製及び、これを固定化した担体は 2-7-7, 2-7-8 と同様に行った。大腸菌に異種発現させ精製した AmxACP1, AmxACP2, AmxACP3 を用いてウサギを免疫し、免疫後のウサギから抗血清を得た。ウサギの免疫及び血清の調製は北海道システムサイエンス株式会社とユーロフィンジェノミクス株式会社に依頼した。これを PBS バッファーで 10 倍希釈し、PBS バッファーで平衡化した ACP 固定化担体にアプライした。20 CV の PBS バッファーで担体を洗浄した後に、3CV の 100 mM Gly-HCl pH2.9 で抗 ACP 抗体を溶出させた。溶出後の試料は 1/20 等量の 1 M KPi pH9.0 で中和させ、濃縮と PBS バッファーを用いて希釈することを繰り返すことで PBS バッファーに置換した。

3-6-5. アノモックス菌における ACP の発現確認

アノモックス菌を菌体 1g 当たり 5 mL のプルダウンバッファー (50 mM KPi pH8.0 200 mM NaCl, 10% グリセロール, 500 μM DTT) に懸濁し、超音波破碎した。得られた無細胞抽出物を 15000 rpm 30 min 遠心分離した。遠心分離後の上清に対して、抗 ACP 抗体及び HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

3-6-6. 抗 ACP 抗体固定化担体の調製

抗 AmxACP1 抗体, 抗 AmxACP2 抗体, 及び抗 AmxACP3 抗体をそれぞれカップリングバッ

ファー (0.2M NaHCO₃, 500 mM NaCl) に希釈と濃縮を繰り返すことで置換し、BCA アッセイにより濃度を測定し、1 mg/mL とした。1 mL の抗 AmxACP1 抗体, 抗 AmxACP2 抗体, 及び抗 AmxACP3 をそれぞれ 1mM HCl で洗浄した NHS activated sepharose と混合し、4°C で一晩転倒混和した。スピンドウンし担体を回収し、上清に未反応の抗 ACP が残っていないことを SDS-PAGE により確認した。担体に 1 mL のブロッキングバッファー (500 μM エタノールアミン pH8.3, 500 mM NaCl) を加え、4°C, o/n 転倒混和し、未反応の NHS 基を不活性化した。スピンドウンし担体を回収し、1 mL の PBST で 3 回洗浄した。

3-6-7. アナモックス菌のネイティブ ACP の精製

前述の方法で調製したアナモックス菌破碎液上清 5 mL を 1 mL の抗 ACP 抗体固定化担体にアプライした。担体を 20 CV の PBST で洗浄し、3CV の 100 mM Gly-HCl pH2.9 で ACP を溶出させ 1/20 等量の 1 M KPi pH9.0 で中和させた。

4章 アナモックス菌由来 ACP と相互作用する酵素の同定に向けた近接依存性標識

4-1 緒言

アナモックス菌に特有のラダラン脂質は四員環が連なった梯子状疎水基を有する (1, 2, 42)。この疎水基は他の天然物には見られず、有機合成が困難であることから、その生合成メカニズムが注目されている。ラダラン脂質生合成経路の大部分は未解明であるが、これには一般的なバクテリアの脂肪酸生合成系であるII型脂肪酸生合成系 (FASII) が関与すると推定されている (47)。FASIIではアシルキャリアプロテイン (ACP) に共有結合している新生鎖が、FASIIの酵素群により、縮合、還元、脱水、還元、の4段階の反応から成る伸長サイクルを繰り返すことで、炭素鎖長が2ずつ伸長し、最終産物として炭素鎖長16のパルミチン酸が生産される (48)。ACPは10 kDaほどの4ヘリックスバンドルタンパク質であり、分子表面に保存されたSer残基を有している (48)。翻訳された直後のアポ型のACPは保存されたSer残基に4'-ホスホパンテテイン (ppn) が共有結合することで、ppnを介したアシル基とのチオエステル結合が可能なホロ型となり、アシル基を様々な酵素へと運搬する (48)。アナモックス菌のFAS II 遺伝子クラスターには3種のACP (AmxACP1, 2, 3) がコードされている。3章で述べたとおり、これらの内、AmxACP1とAmxACP3はラダラン脂質を生産しているアナモックス菌において、発現していることが確認されている。AmxACP1は典型的な脂肪酸生合成に関与する大腸菌由来ACPとの相同性が高い (query coverage 92%, identity 54%) ことから、典型的な脂肪酸生合成に関与すると推定されるが、AmxACP3は大腸菌由来ACPとの相同性が低い (query cover: 38%, identity 47%)。AmxACP3は結晶構造解析により、アシル基とのチオエステル結合を加水分解から防ぐと推定されているdual phenylalanine motifを有するなど、他の生物のACPとは異なる特徴をもつことが明らかとなっている (62)。ラダラン脂質生合成において梯子状疎水基の構築を担う酵素は、FAS II の酵素群がACPと特異的に相互作用するように、アナモックス菌のACP と特異的に相互作用すると推定される。そこで、本研究では、これらの酵素を単離・同定することを目指す。*Pseudomonas aeruginosa* のカタラーゼKatAはACPと結合することでその酵素活性が抑制されるが、この酵素とACPが相互作用することはプルダウンアッセイによって明らかとなった (76)。異種発現させたAmxACPを固定化した担体を用いてアナモックス菌破碎液に対してプルダウンアッセイを行うことは可能であるが、ラダラン脂質生合成に関与する酵素はアシルACPを基質とすると推定されるため、これらの酵素はACPと一時的にしか結合せず、プルダウンアッセイを行う際に、洗浄の過程で除去されてしまうことが懸念される。実際、*P. aeruginosa*において典型的な脂肪酸生合成に関与するAcpPと相互作用する酵素がプルダウンアッセイにより同定された際には、アシル基の伸長反応を担う酵素の内、 β -ケトアシルACP合成酵素やエノイルACPレダクターゼなどの酵素が同定されなかった (76)。そこで本研究では、弱いもしくは一時的なタンパク質間相互作用の解析が可能な近接依存性標識法 (proximity labeling,

PL) を用いる (77-81)。この手法には基質特異性を失ったビオチンリガーゼ変異体やアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APEX) が用いられる (77-81)。PLに用いられるビオチンリガーゼ変異体はビオチンとATPから反応性の高いビオチニルAMPを生成し、近傍に位置するタンパク質を非選択的にビオチン化する (78, 81)。一方で、APEXは過酸化水素を分解する際にアスコルビン酸の代わりにビオチンフェノールを電子供与体として用いることができ、この反応によって生じる活性種はAPEX近傍のタンパク質を非選択的にビオチンフェノール化する (79)。ビオチンリガーゼ変異体もしくはAPEXにACPを融合させた場合、これらの酵素の近傍にACPと相互作用するタンパク質が位置しやすくなり、選択的にビオチン化される。このため、任意のタンパク質を融合させたAPEXもしくはビオチンリガーゼ変異体を細胞内で発現させることで、融合させたタンパク質と相互作用するタンパク質をビオチン化できる。これらは、ストレプトアビジンなどのビオチンと特異的に結合するタンパク質を固定化した担体を用いて精製できる (77)。本手法では、担体の洗浄の際に、ACP-酵素間の相互作用が維持される必要が無いことから、プルダウンアッセイでは同定できない酵素も同定できると期待される (77-81)。従来、ビオチンリガーゼ変異体を用いた近接依存性標識には、大腸菌由来ビオチンリガーゼ (BirA) のArg118をSerに置換したBioIDが用いられてきた (77, 78, 80, 81)。野生型のビオチンリガーゼはATP依存的にビオチンを活性化し、基質のタンパク質のリジン残基をビオチン化するが、反応中間生成物であるビオチニルAMPとの相互作用に関わるArg118に変異を導入すると本来の基質であるタンパク質をビオチン化する前にビオチニルAMPを放出する(78, 80, 81) BioIDは野生型BirAと比べて反応速度が遅く、標識に18時間以上の長い時間を要する欠点を有する (80, 81)。この問題を解決するため、TurboID (80), MiniTurbo (80), AirID (81) などの、より効率的にPLを行うことのできる酵素がいくつか開発されている。TurboIDはBirAにランダム変異導入及びスクリーニングを行うことなどにより反応速度が向上した変異体であり、標識を10 min程度で行える (80)。MiniTurboはTurboIDのN末端ドメインを欠損させており、TurboIDと比べて、反応速度は劣るが、サイズが小さく、融合させたタンパク質への影響が小さいと期待される (80)。しかし、これらのBirA変異体はBioIDと比較して、宿主細胞への毒性が高い、非選択的な標識が多いなどの欠点も有する (81)。AirIDは様々な種由来のBirAをもとにそれらの祖先的なBirAの配列を予測することで得られた人工ビオチンリガーゼであり、BioIDと比較して反応速度が速く、TurboIDよりも非選択的な標識や細胞毒性が低い (81)。また、APEXによる標識はTurboIDによる標識よりもさらに早く、標識に1 minしか要さないが、過酸化水素を必要とし、これは細胞毒性が非常に高い (77, 80)。近接依存性標識は従来細胞内で行われてきたが (77-81)、アナモックス菌の遺伝子組み換えは行えないため、本研究では大腸菌に異種発現させ、精製したACP融合MiniTurbo, AirID, APEXをそれぞれ用いて、アナモックス菌破碎液に対してPLを行った。

4-2 ACP 融合 MiniTurbo によるアナモックス菌破碎液上清に対する標識

前述のとおり、AmxACP と ACPS 及び AmxMT1 は相互作用する。ACP 固定化担体を用いて AmxACP と ACPS 及び AmxMT1 の相互作用をプルダウンアッセイにより確認した際、担体に結合している ACP の C 末端にはプロテアーゼ認識配列の一部が残っていた。このことから、AmxACP の C 末端は ACP-パートナータンパク質間の相互作用を阻害しないと考えられる。そこで、C 末端に MiniTurbo (MTur) を融合させた AmxACP1 (ACP1-MTur) を大腸菌に発現させた。その破碎液上清に対してストレプトタクチン HRP を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ ACP1-MTur は大腸菌細胞内で自己ビオチン化していた (図 34a)。ACP がビオチン化された場合、ビオチンが ACP とそのパートナータンパク質間の相互作用を阻害することが懸念されるため、ACP1-MTur の精製は行わなかった。ACP の N 末端と C 末端はいずれもアシル基が結合する保存された Ser 残基とは離れているため (図 34b)、MTur を ACP の C 末端に融合させた場合でも ACP とパートナータンパク質間の相互作用に影響は無いと考え、MTur, AmxACP1 と AmxACP3 の C 末端にそれぞれ MTur を融合させた MTur-ACP1, MTur-ACP3 を大腸菌に発現させ、精製した (図 34c-e)。これらを用いてアナモックス菌に対して近接依存性標識を行ったところ、MTurACP1 と MTurACP3 を用いた場合にのみ見られるバンドが検出されたが (図 34f)、これらは切断された ACP 融合 MTur の断片であり、ACP と相互作用するタンパク質は標識されていなかった。このことから、ACP の構造に基づいた推定に反して、MTur は ACP とそのパートナータンパク質の相互作用を阻害していると考えられる。これは ACP の N 末端に MTur を付加する、リンカーの長さを変えるなどして、改善されると期待される。しかし、MTur は発現量が低く、Ni 精製後の収量は培地 4.2 L から 1 mg 以下と非常に少なく、また、精製後の試料には夾雑タンパク質が多く含まれていた。これはタンパク質濃度を算出する際に影響し、また、標識の条件検討を行うことが困難であることから、PL に使用する酵素は安定した発現が見込める APEX に変更した。

4-3 ACP 融合 APEX による ACPS を発現させた大腸菌破碎液上清及びアナモックス菌破碎液上清に対する標識

APEX, C末端にAPEXを融合させたAmxACP1とAmxACP3 (ACP1-APEX, ACP3-APEX) を大腸菌に発現させ、精製した (図34a)。APEXは補因子としてヘムを必要とするため、得られた試料ヘムが結合していることを紫外可視吸収スペクトルの測定により確認した。APEX, ACP1-APEX, ACP3-APEX とともに、ヘムの吸収極大である407 nm 付近に吸収が見られた (図 34b) (20)。これらを用いて、アナモックス菌破碎液上清と、ポジティブコントロールとしてACPとの相互作用が明らかなACPSを発現させた大腸菌破碎液上清に対してそれぞれPLを行った。いずれの場合においてもAPEXとACP融合APEXに有意な差は見られなかった (図34c)。ACPSとAPEXを融合させたACPが相互作用をするか確認するため、ACP-APEXを用いてACPSを発現させた大腸菌破碎液に対してプルダウンアッセイを行ったところ、ACP-APEXとACPSは相互作用しないことが確認された (図34d)。これがACPに融合させた

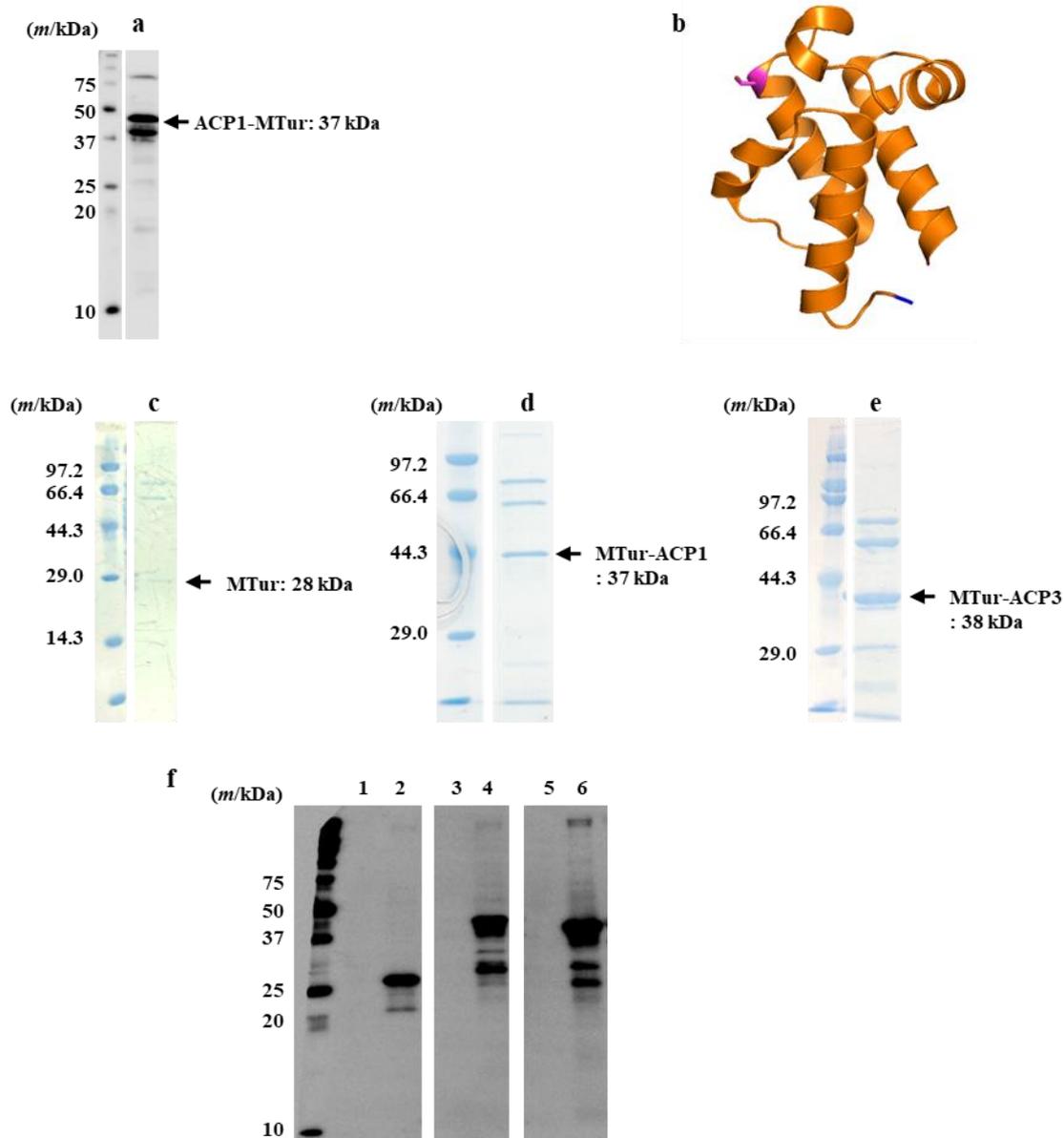


図.34 アナモックス菌由来ACP融合MTurの発現・精製及びアナモックス菌破碎液上清に対するPL

(a) ACP1-Mturを発現させた大腸菌破碎液上清に対して、HRP標識-ストレプトタクチンを用いてウェスタンブロッティングを行った結果を示す。(b) AmxACP3のN末端, C末端, 及びアシル基が結合するSer41の位置。AmxACP3の結晶構造をorangeで、そのN末端とC末端それぞれred, blueで示す。(c), (d), (e) はそれぞれ精製後のMTur, MTur-ACP1, MTur-ACP3のSDS-PAGEの結果を示す。(f) MTur, MTur-ACP1, 及びMTur-ACP3 を用いてアナモックス菌破碎液上清に対してPLを行い、反応の前後の試料に対してHRP標識-ストレプトタクチンを用いてウェスタンブロッティングを行った結果を示す。1と2はMTurを用いてアナモックス菌破碎液上清に対してPLを行った際の反応前と反応後を示す。3と4はMTur-ACP1を用いてアナモックス菌破碎液上清に対してPLを行った際の反応前と反応後を示す。5と6はMTur-ACP3を用いてアナモックス菌破碎液上清に対してPLを行った際の反応前と反応後を示す。

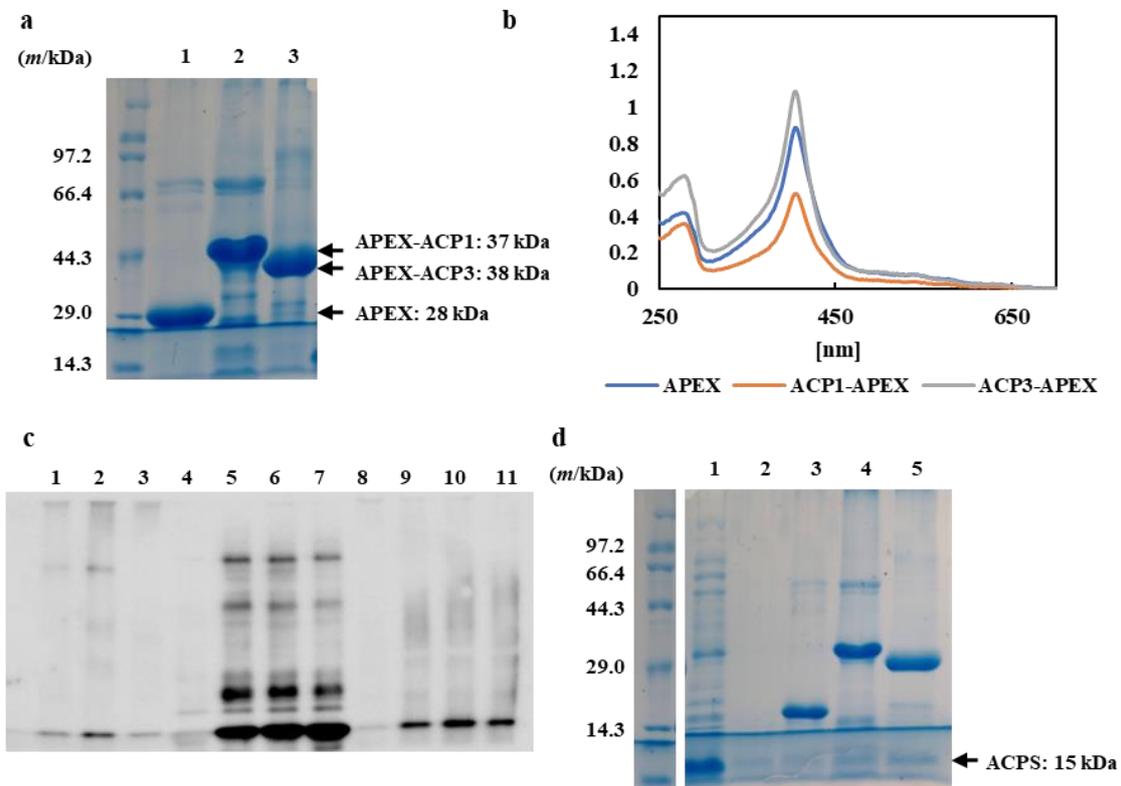


図.35 アナモックス菌由来ACP融合APEXの発現・精製、ACPSを発現させた大腸菌破砕液上清、及びアナモックス菌破砕液上清に対するPL

(a) 1-3はそれぞれ精製後のAPEX, ACP1-APEX, APEX-ACP3のSDS-PAGEの結果を示す。
 (b) 精製後のMTur, MTur-ACP1, MTur-ACP3の紫外可視吸収スペクトルを示す。ACP1-Mturを発現させた大腸菌破砕液上清に対して、HRP標識-ストレプトタクチンを用いてウェスタンブロッティングを行った結果を示す。
 (c) APEX, APEX-ACP1, 及びAPEX-ACP3を用いてPLを行った際の試料に対して、HRP標識-ストレプトタクチンを用いてウェスタンブロッティングを行った結果を示す。1-3はAPEX, ACP1-APEX, APEX-ACP3を用いて、バッファーに対してPLを行った結果を示す。5-7はそれぞれAPEX, ACP1-APEX, APEX-ACP3を用いてACPSを発現させた大腸菌破砕液上清に対してPLを行った結果を示す。4はこの際にAPEX, ACP1-APEX, APEX-ACP3のいずれも使用していないネィティブコントロールを示す。9-11はそれぞれAPEX, ACP1-APEX, APEX-ACP3を用いてアナモックス菌破砕液上清に対してPLを行った結果を示す。8はこの際にAPEX, ACP1-APEX, APEX-ACP3のいずれも使用していないネィティブコントロールを示す。
 (d) ACP融合APEXを用いたACPSに対するブルダウンアッセイ。1はACPSを発現させた大腸菌破砕液上清、2はAPEX, ACP1-APEX, ACP3-APEXのいずれも用いずにブルダウンアッセイを行った結果を示す。3-5はそれぞれAPEX, ACP1-APEX, APEX-ACP3を用いてブルダウンアッセイを行った結果を示す。

APEXが立体障害によってACP-ACPS間の相互作用を阻害すること起因するのであれば、リンカーの長さの検討等により、ACPのパートナータンパク質を標識することが可能となることが期待される。しかし、APEXは非特異的な標識が非常に多く、ACPと特異的に相互作用するタンパク質が標識される条件であってもこれを検出しづらいと考えられる。そこで、安定して可溶性発現し、非特異的な標識が少ないAirIDを用いて、標識の条件検討を

行った。

4-4. ACP 融合 AirID による ACPS を発現させた大腸菌破碎液に対する近接依存性標識

MTur は発現量が少なく、APEX は非特異的に相互作用するタンパク質の標識が非常に多かったため、PL に使用する酵素を非特異的標識が少なく、大腸菌において安定して可溶性発現する AirID に変更した。AirID, C 末端に 5 残基のリンカーと AirID, 10 残基のリンカーと AirID をそれぞれ付加した AmxACP1 (ACP1-5-AirID, ACP1-10-AirID) をそれぞれ大腸菌に発現させ、精製した (図 35a)。これらを用いて ACPS を発現させた大腸菌破碎液上清に対して PL を行ったところ、ACP1-5-AirID と ACP1-10-AirID は AirID と比べて酵素反応の速度が向上した、もしくは自己標識される頻度が増大したが、いずれも ACPS を標識することはできなかった (図 35b)。また、N 末端に AirID と 5 残基のリンカーを融合した AmxACP1 (AirID-ACP1) を同様に大腸菌に発現させ、精製し (図 35a)、これを用いて ACPS を発現させた大腸菌破碎液に対して PL を行ったところ、ACPS は標識されなかったが、精製の際に除去しきれなかった GST が標識された (図 35b)。この結果からの ACP の N 末端 AirID を融合させた場合、これは少なくとも近傍のタンパク質をビオチン化できることが明らかとなった。また、非特異的に AmxACP1 または AirID に結合した GST が標識されたにもかかわらず、AmxACP1 と特異的に相互作用する ACPS が標識されないことから、何らかの理由により、ACPS が PL におけるポジティブコントロールとして適していないことが懸念された。

4-5. ACP 融合 AirID による AmxMT1 を発現させた大腸菌破碎液、及びアナモックス菌破碎液に対する近接依存性標識

AirID-ACP1 と AmxACP3 の C 末端に AirID を融合させた AirID-ACP3 を発現・精製し、GST を完全に除去した後に (図 35c)、これらを用いて、AmxMT1 に対して PL を行ったところ、ネガティブコントロールであるアナモックス菌破碎液を加えていない条件と比較して有意な差は見られなかった。これまでに検討した条件では、ACP の N 末端、C 末端は共にアシル基が結合する Ser 残基から離れているにもかかわらず、ACP と相互作用する ACPS や AmxMT1、及びアナモックス菌破碎液中のタンパク質のいずれも標識することはできなかった。ACPS が PL のポジティブコントロールとして適切であるかどうかは疑問が残るが、AmxACP1 の C 末端に AirID を融合させた場合、そのリンカーの長さに関わらず ACPS を標識できなかった。このことから、ACP と AirID が非特異的に結合することにより、ACP とそのパートナータンパク質の結合が阻害され、リンカーの長さを変えた場合においてもこれは解消されなかったと推定した。ACP と AirID は共に分子表面に電荷を有する残基が多く存在していることから、静電的相互作用を阻害するために過剰量の LiCl 存在下で AmxMT1 を発現させた大腸菌破碎液に対して PL を行った。この試料に対して HRP 標識-ストレプトタクチン、マウス抗 His タグ抗体、及び HRP 標識抗マウス IgG 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、AirID-ACP1 または AirID-ACP3 を用いた条件のみ AmxMT1 が標識されたことが確認できた。しかし、同様の条件でアナモックス菌破碎液上清に対して PL を行ったところ、ACP と相互作用するタンパク質は標識されなかった。

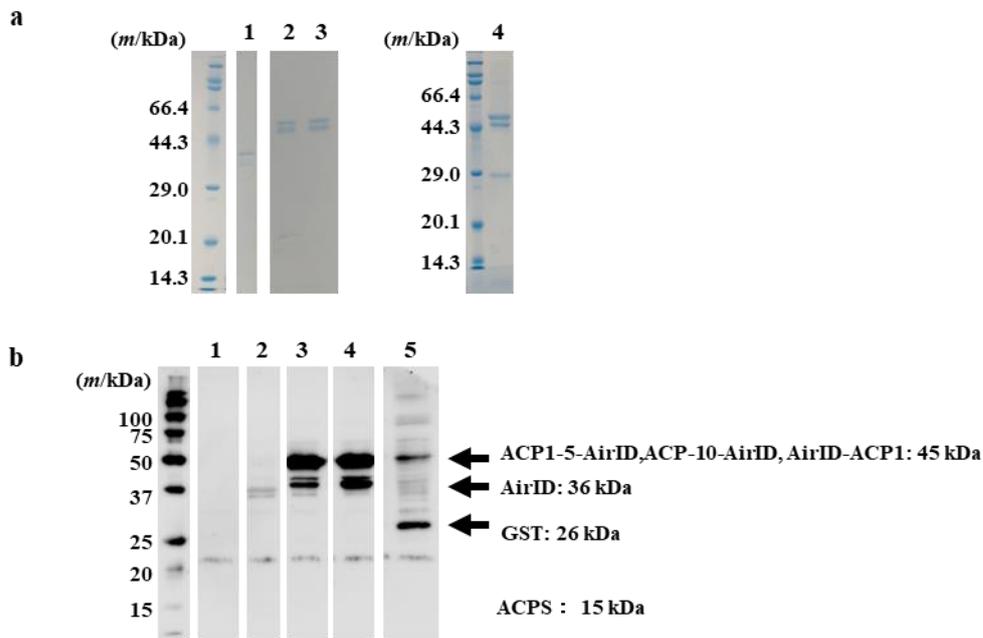
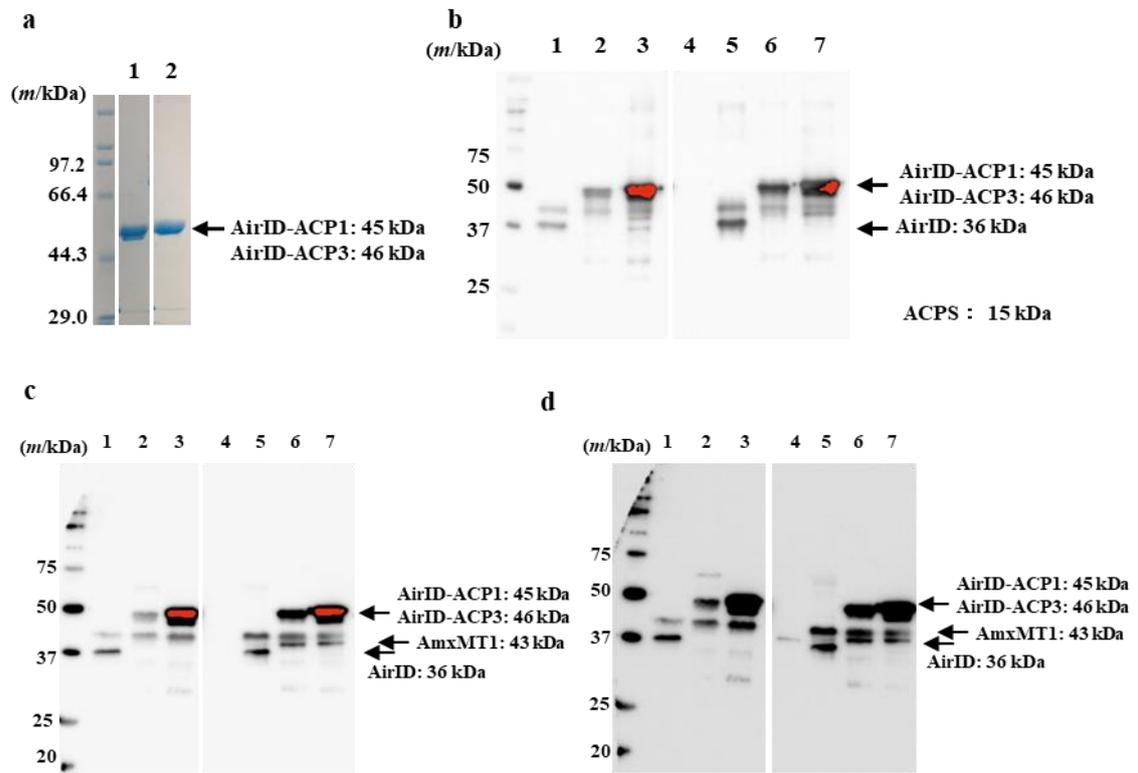


図.36 アナモックス菌由来ACP融合AirIDの発現・精製、及びこれらを用いたPL
 (a) 1-4はそれぞれ精製後のAirID, ACP1-5-AirID, ACP1-10-AirID, AirID-ACP1のSDS-PAGEの結果を示す。(b) AirID, ACP1-5-AirID, ACP1-10-AirID, AirID-ACP1を用いたACPSを発現させた大腸菌破碎液上清に対するPL。1はAirID, ACP1-5-AirID, ACP1-10-AirID, AirID-ACP1のいずれも加えていないバッファー、2-5はそれぞれAirID, ACP1-5-AirID, ACP1-10-AirID, AirID-ACP1を用いて標識を行ったアナモックス菌破碎液上清に対する、HRP標識-ストレプトタクチンを用いたウェスタンブロッティングの結果を示す。



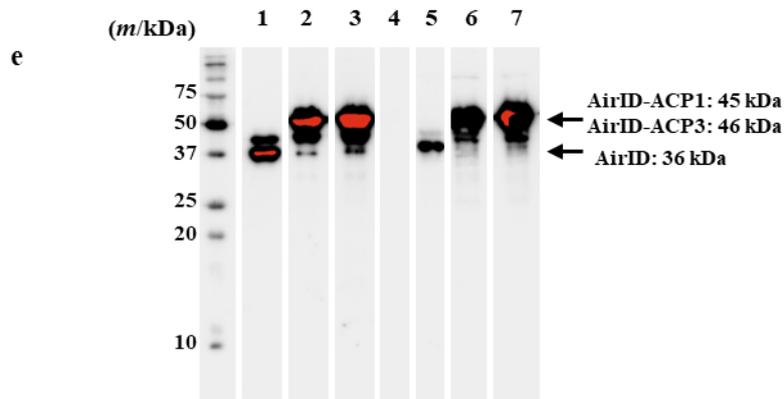


図37. アナモックス菌由来ACP融合AirIDを用いたAmxMT1を発現させた大腸菌破碎液上清、及びアナモックス菌破碎液上清に対する近接依存性標識
 (a) 1, 2はそれぞれ高純度に精製したAirID-ACP1とAirID-ACP3のSDS-PAGEの結果を示す。
 (b) AirID, AirID-ACP1, 及びAirID-ACP3を用いたACPSを発現させた大腸菌破碎液上清に対するPL。1-3はそれぞれAirID, AirID-ACP1, AirID-ACP3を加えて標識したバッファー、4はAirID, AirID-ACP1, AirID-ACP3のいずれも使用していないACPSを発現させた大腸菌破碎液上清、5-7はそれぞれAirID, AirID-ACP1, AirID-ACP3を用いて標識を行ったACPSを発現させた大腸菌破碎液上清に対するHRP標識-ストレプトタクチンを用いたウェスタンブロッティングの結果を示す。
 (c) AirID, AirID-ACP1, 及びAirID-ACP3を用いたAmxMT1を発現させた大腸菌破碎液上清に対するPL。1-3はそれぞれAirID, AirID-ACP1, AirID-ACP3を加えて標識したバッファー、4はAirID, AirID-ACP1, AirID-ACP3のいずれも使用していないAmxMT1を発現させた大腸菌破碎液上清、5-7はそれぞれAirID, AirID-ACP1, AirID-ACP3を用いて標識を行ったAmxMT1を発現させた大腸菌破碎液上清に対するHRP標識-ストレプトタクチンを用いたウェスタンブロッティングの結果を示す。
 (d) AirID, AirID-ACP1, 及びAirID-ACP3を用いたAmxMT1を発現させた大腸菌破碎液上清に対するPL。1-3はそれぞれAirID, AirID-ACP1, AirID-ACP3を加えて標識したバッファー、4はAirID, AirID-ACP1, AirID-ACP3のいずれも使用していないAmxMT1を発現させた大腸菌破碎液上清、5-7はそれぞれAirID, AirID-ACP1, AirID-ACP3を用いて標識を行ったAmxMT1を発現させた大腸菌破碎液上清に対するHRP標識-ストレプトタクチン、マウス抗His タグ抗体、及びHRP標識-抗マウスIgG抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果を示す。

4-6 実験操作

4-6-1 MiniTurbo 及び ACP 融合 MiniTurbo の発現・精製

タンパク質をコードする遺伝子は全て大腸菌での発現に適したコドン使用頻度となるように人工合成した。MTur をコードする遺伝子を pET28b に挿入することで MTur 発現ベクターを構築した。また、MTur-ACP1 の C 末端には HRVC3 認識配列と 6×His を付加した。AmxACP1 発現ベクターの AmxACP1 をコードする領域の上流と下流にそれぞれ AmxACP1 をコードする遺伝子をと MTur-ACP1 発現ベクターを構築した。MTur, ACP1-MTur, 及び MTur-ACP1 発現ベクターをそれぞれ導入した大腸菌 BL21(DE3) 培養液 1 mL を 25 µg/mL のカナマイシン, 500 µM IPTG, 0.025% グルコースを含む LB 培地 700 mL に加え、18°C, 150 rpm で振盪培養した。24 h 後に培養液を 4°C, 6000 rpm で 10 分間遠心分離し、ペレットを -80°C

で保存した。これらをそれぞれ菌体 1 g 当たり 5 mL の PL A バッファー (50 mM KPi pH8.0, 200 mM NaCl, 10 %グリセロール, 500 μ M DTT) に懸濁し、PMSF, Sm2 スクレアーゼ, リゾチーム, TritonX 100 をそれぞれ終濃度 2 mM, 6 μ g/mL, 0.5 mg/mL, 0.5%となるように加え、4 $^{\circ}$ C, 30 min 転倒混和した。続いて、無細胞抽出液を 10000 rpm, 30 min 遠心分離し、上清を再度、4 $^{\circ}$ C, 18000rpm, 20 min 遠心分離した。上清を A バッファーで平衡化した Ni-NTA agarose を充填したカラムへアプライし、20 CV の MTurA バッファーで洗浄を行った。MTur と MTur-ACP1 は、PL B バッファー (200 mM NaCl, 10 % グリセロール, 250 mM イミダゾール, 500 μ M DTT, 50 mM KPi pH8.0) で溶出し、Amicon Urutla 30 k を用いて体積が 1 mL となるまで濃縮した。得られたタンパク質の濃度を 280 nm の吸光度から算出し、HRV3C プロテアーゼを 1/10 等量加え、4 $^{\circ}$ C, o/n 転倒混和した。PL C バッファー (50 mM KPi pH8.0, 200 mM NaCl, 10% グリセロール 500 μ M DTT) で 12.5 倍希釈し、再度 Ni-NTA agarose へアプライし、フロースルーを回収した。1CV の PL C バッファーで担体を洗浄し、これをフロースルーと混合し、Amicon Urutla 30k を用いてタンパク質濃度が 1 mg/mL となるまで濃縮し、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

4-6-2 アナモックス菌由来 ACP 融合 MTur を用いたアナモックス菌破碎液上清に対する PL 2-7-5 と同様に調製したアナモックス菌破碎液上清と総タンパク質濃度が 1 mg/mL の MTur 及び MTur-ACP をそれぞれ 1:1 で混合し、ビオチン, ATP, MgCl₂ をそれぞれ終濃度 500 μ M, 2 mM, 10 mM となるように加え、35 $^{\circ}$ C, 2 h インキュベートした。

4-6-3 APEX 及びアナモックス菌由来 ACP 融合 APEX の発現・精製

タンパク質をコードする遺伝子は全て大腸菌での発現に適したコドン使用頻度となるように人工合成した。大豆由来 APEX をコードする遺伝子を pET28b と AmxACP1 発現ベクターの AmxACP1 をコードする領域の下流にそれぞれ挿入することで APEX 発現ベクターと ACP1-APEX 発現ベクターを構築した。また、APEX の C 末端には HRV3C 認識配列と 6 \times His を付加した。APEX 発現ベクターと ACP1-APEX 発現ベクターをそれぞれ導入した大腸菌 BL21(DE3) 培養液 1 mL を 25 μ g/mL のカナマイシン, 500 μ M 5-アミノレブリン酸を含む TB 培地 100 mL に加え、37 $^{\circ}$ C, 150 rpm で振盪培養し、OD₆₀₀ が 0.5 に達したとき IPTG を終濃度 500 μ M となるように加え、25 $^{\circ}$ C, 150 rpm で振盪培養した。24 h 後に培養液を 4 $^{\circ}$ C, 6000 rpm で 10 分間遠心分離し、ペレットを -80 $^{\circ}$ C で保存した。これらを菌体 1 g 当たり 5 mL の ACP A バッファー (50 mM KPi pH8.0, 200 mM NaCl, 500 μ M DTT) に懸濁し、PMSF, Sm2 スクレアーゼ, リゾチーム, TritonX 100 をそれぞれ終濃度 2 mM, 6 μ g/mL, 0.5 mg/mL, 0.5%となるように加え、4 $^{\circ}$ C, 30 min 転倒混和した。続いて、無細胞抽出液を 10000 rpm, 30 min 遠心分離し、上清を再度、4 $^{\circ}$ C, 18000rpm, 20 min 遠心分離した。上清を ACP A バッファーで平衡化した Ni-NTA agarose を充填したカラムへアプライし、20 CV の ACP A バッファーで洗浄を行った。APEX と ACP-APEX は、ACP B バッファー (200 mM NaCl, 250 mM イミダゾール, 500 μ M DTT, 50 mM KPi pH8.0) で溶出した。得られたタンパク質の濃度を 280 nm の吸光度から

算出し、HRV3C プロテアーゼを 1/10 等量加え、4°C, o/n 転倒混和した。ACP C バッファー (50 mM KPi pH8.0, 200 mM NaCl, 500 μ M DTT) で 12.5 倍希釈し、再度 Ni-NTA agarose へアプライし、フロースルーを回収した。1CV の ACP C バッファーで担体を洗浄し、これをフロースルーと混合し、Amicon Urutla 30 k を用いて濃縮した。得られたタンパク質の濃度を APEX におけるヘムの 407 nm のモル有効係数 $107 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ から算出し 20 μ M となるように ACP C バッファーで希釈し、-80°C で保存した。

4-6-4 アナモックス菌由来 ACP 融合 APEX を用いた ACPS を発現させた大腸菌破碎液上清及びアナモックス菌破碎液上清に対する PL

2-7-5 と同様に調製したアナモックス菌破碎液上清または ACPS を発現させた大腸菌破碎液上清にビオチンフェノール, APEX または ACP1-APEX, H_2O_2 をそれぞれ終濃度 100 μ M, 1 μ M, 100 μ M となるように加え、4°C, 10 min インキュベートした。

4-6-5 AirID 及びアナモックス菌由来 ACP 融合 AirID の発現・精製

タンパク質をコードする遺伝子は全て大腸菌での発現に適したコドン使用頻度となるように人工合成した。AirID をコードする遺伝子を pET28b に挿入することで AirID 発現ベクターを構築した。N 末端に 5 残基のリンカー (SGGGG) または 10 残基のリンカー (SGGGSGGGG) を付加した AmxACP1 をコードする遺伝子を AirID 発現ベクターの AirID をコードする領域の上流にそれぞれ挿入することで AirID-5-ACP1 発現ベクターと AirID-10-ACP1 発現ベクターを構築した。また、pCold1 の GST をコードする領域の下流に HRV3C 認識配列, AirID, N 末端に SGGGG を付加した AmxACP1 または AmxACP3 を挿入することで AirID-ACP1 発現ベクターと AirID-ACP3 発現ベクターを構築した。

AirID, AirID-5-ACP1, AirID-10-ACP1 発現ベクターをそれぞれ導入した大腸菌 BL21(DE3) 培養液 1 mL を 25 μ g/mL のカナマイシン, 500 μ M IPTG, 0.025% グルコースを含む LB 培地 100 mL に加え、18°C, 150 rpm で振盪培養した。24 h 後に培養液を 4°C, 6000 rpm で 10 分間遠心分離し、ペレットを -80°C で保存した。AirID-ACP1 発現ベクターと AirID-ACP3 発現ベクターをそれぞれ導入した大腸菌 BL21(DE3) 培養液 1 mL を 25 μ g/mL のカナマイシンを含む LB 培地 100 mL に加え 37°C, 150 rpm で振盪培養し、OD₆₀₀ が 0.5 に達したとき IPTG を終濃度 500 μ M となるように加え、氷床で急速に冷却し、15°C, 150 rpm で振盪培養した。24 h 後に培養液を 4°C, 6000 rpm で 10 分間遠心分離し、ペレットを -80°C で保存した。

AirID 及び ACP 融合 AirID は全て同じ条件で精製した。菌体 1 g 当たり 5 mL の ACP A バッファー (50 mM KPi pH8.0, 200 mM NaCl, 500 μ M DTT) に懸濁し、PMSF, Sm2 ヌクレアーゼ, リゾチーム, TritonX 100 をそれぞれ終濃度 2 mM, 6 μ g/mL, 0.5 mg/mL, 0.5% となるように加え、4°C, 30 min 転倒混和した。続いて、無細胞抽出液を 10000 rpm, 30 min 遠心分離し、上清を再度、4°C, 18000rpm, 20 min 遠心分離した。上清を ACP A バッファーで平衡化した Ni-NTA agarose を充填したカラムへアプライし、20 CV の ACP A バッファーで洗浄を行った。APEX と ACP-APEX は、ACP B バッファー (200 mM NaCl, 250 mM イミダゾール, 500 μ M DTT, 50 mM KPi pH8.0) で溶出した。得られたタンパク質の濃度を 280 nm の吸光度から算

出し、HRV3C プロテアーゼを 1/10 等量加え、4°C, o/n 転倒混和した。ACP C バッファー (50 mM KPi pH8.0, 200 mM NaCl, 500 μ M DTT) で 12.5 倍希釈し、再度 Ni -NTA agarose へアプライし、フロースルーを回収した。1CV の ACP C バッファーで担体を洗浄し、これをフロースルーと混合し、Amicon Urutla 30 k を用いて希釈・濃縮を繰り返すことで PL D バッファー (50 mM HEPES pH7.0, 200 mM NaCl, 10 %グリセロール, 500 μ M DTT) に置換した。GST を含まない高純度の AirID-ACP1 と AirID-ACP3 を調製する際は、得られたタンパク質を PL D バッファーで平衡化した GST accept (ナカライテスク) を充填したカラムにアプライし、フロースルーを回収した。得られたタンパク質は BCA アッセイにより測定し、20 μ M となるように PL D バッファーで希釈し、-80°C で保存した。

4-6-6 AirID 及びアナモックス菌由来 ACP 融合 AirID を用いた ACPS または AmxMT1 を発現させた大腸菌破碎液上清及びアナモックス菌破碎液上清に対する PL

AmxMT1 または ACPS を発現させた大腸菌をそれぞれ菌体 1g 当たり、5 mL の PL D バッファーに懸濁し、PMSF, Sm2ヌクレアーゼ, リゾチーム, TritonX 100 をそれぞれ終濃度 2 mM, 6 μ g/mL, 0.5 mg/mL, 0.5% となるように、懸濁液 50 mL 当たり 1 錠の cOmplete™ EDTA フリープロテアーゼ阻害剤カクテルを加え、4°C, 30 min 転倒混和した。続いて、無細胞抽出液を 10000 rpm, 30 min 遠心分離し、上清を再度、4°C, 18000rpm, 20 min 遠心分離し、上清を回収した。アナモックス菌を 5 mL の PL D バッファーに懸濁し、PMSF, リゾチーム, Sm2ヌクレアーゼ, TritonX 100 をそれぞれ終濃度 2 mM, 6 μ g/mL, 0.5 mg/mL, 0.5% となるように加え、懸濁液 50 mL 当たり 1 錠の cOmplete™ EDTA フリープロテアーゼ阻害剤カクテルを加え、氷上でソニケートした。続いて、無細胞抽出液を 10000 rpm, 30 min 遠心分離し、上清を再度、4°C, 18000rpm, 20 min 遠心分離し、上清を回収した。AmxMT1 または ACPS を発現させた大腸菌破碎液上清に対して PL を行う際は、反応液の組成を 250 mM ビオチン, 2 mM ATP, 60 mM クレアチンリン酸, 100 unit クレアチンリン酸キナーゼ, 10 mM MgCl₂, 4 μ M AirID またはアナモックス菌由来 ACP 融合 AirID とし、反応液の体積の半分を大腸菌破碎液上清またはアナモックス菌破碎液上清が占めるようにし、これを 35°C, 2 h, インキュベートした。

5 章 結言

アナモックス菌が生産するラダラン脂質は複数の四員環が連なった歪みの大きな梯子状疎水基を有する。この梯子状疎水基は他の天然物に見られず、その有機合成が容易ではないことから、生合成メカニズムが大きな注目を集めている。

一般的に細菌の脂肪酸はⅡ型脂肪酸生合成系 (FASⅡ) によって生産される。この経路では、アシルキャリアプロテイン (ACP) に共有結合しており、様々な脂肪酸合成酵素が逐次複合体を形成し、炭化水素鎖が伸長される。比較ゲノム解析などに基づいて、ラダラン脂質の生合成では、アシルキャリアプロテイン (ACP) に結合した疎水基を基質として、S-アデノシルメチオニン (SAM) 依存性メチル基転移酵素 (SAM MTase) などの SAM 依存性酵素によって梯子状疎水基が構築されているとの仮説が提案されている。また、アナモックス菌は3種の ACP (AmxACP1-3) を有しており、AmxACP3 は結晶構造解析により、アシル基とのチオエステル結合を加水分解から防ぐと推定されている dual phenylalanine motif を有するなど、他の生物の ACP とは異なる特徴をもつことが明らかとなっている。天然物生合成経路の解明には遺伝子破壊が広く用いられるが、アナモックス菌の純粋培養は報告例が無く、遺伝子組み換えを行うことは極めて困難であり、ラダラン脂質生合成に関与する酵素や生合成中間体を示す実験的なデータは得られていない。そこで、本研究ではアナモックス菌の遺伝子破壊を必要としない手法により、ラダラン脂質生合成経路の解明を目指した。

アナモックス菌の SAM MTase の一つ AmxMT1 は他の SAM MTase と進化系統樹において早期に分岐していることから梯子状疎水基の構築を担う候補として挙げられている。そこで、まずはアナモックス菌由来 ACP を用いて AmxMT1 に対してプルダウンアッセイを行ったところ、ACP-AmxMT1 間の相互作用が確認された。続いて、AmxMT1 の結晶構造と他の SAM MTase を比較することで、AmxMT1 が酸塩基触媒であると推定される His-Glu dyad を有しており、ポリケチド生合成においてメチル基転移を担う C-メチル基転移酵素と同様の反応を担うと推定した。また、高い精度でタンパク質構造の予測が可能な AlphaFold2 を用いて構築した AmxMT1 と ACP の複合体モデル及び、C-メチル基転移酵素の反応メカニズムから推定される基質のドッキングシミュレーションの結果から、AmxMT1 は AmxACP3 が運搬する短鎖 β -ケトアシル基をメチル化すると推定された。

また、本研究では抗 ACP 抗体を用いてアナモックス菌から ACP を精製し、これに結合している生合成中間体を同定すること、並びに ACP と相互作用する酵素すなわちラダラン脂質生合成に関与すると推定される酵素を、近接依存性標識を用いて精製し、同定することも目指した。アナモックス菌の ACP が運搬するアシル基や ACP と相互作用する酵素の同定には至らなかったが、ラダランを生産することが確認されている当研究室で得られたアナモックス菌において、AmxACP1 と AmxACP3 が発現しており、これらの内いずれか、または両方がラダラン脂質生合成に関与する可能性が示唆された。

本研究により得られた知見は、いずれもラダラン脂質合成経路する酵素や合成中間体を示すものではない。しかし、アナモックス菌由来 ACP が典型的な脂肪酸合成に関与しない SAM 依存性酵素と相互作用すること、及びラダラン脂質を生産するアナモックス菌において AmxACP1, 3 が発現していることは、現在提唱されているラダラン脂質合成の仮説を支持する初めての実験的なデータである。

参考文献

- (1) Kartal, B. *et al.* How to make a living from anaerobic ammonium oxidation. *Fems Microbiol. Rev.* **37**, 428-461, (2013).
- (2) Peeters, S. H. & van Niftrik, L. Trending topics and open questions in anaerobic ammonium oxidation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **49**, 45-52, (2019).
- (3) Vandegraaf, A. A. *et al.* ANAEROBIC OXIDATION OF AMMONIUM IS A BIOLOGICALLY MEDIATED PROCESS. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1246-1251 (1995).
- (4) Hamm RE & Thompson TG Dissolved nitrogen in the sea water of the northeast Pacific with notes on the total carbon dioxide and the dissolved oxygen. *JMar Res* **4**, 11-27, (1941)
- (5) Broda E Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Z. Allg. Mikrobiol* **17** 491-493 (1977).
- (6) Strous, M. *et al.* Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* **400**, 446-449 (1999).
- (7) van Teeseling, M. C. F. *et al.* Anammox Planctomycetes have a peptidoglycan cell wall. *Nat. Commun.* **6**, 6 (2015).
- (8) Sara, M. & Sleytr, U. B. S-layer proteins. *J. Bacteriol.* **182**, 859-868 (2000).
- (9) Fagan, R. P. & Fairweather, N. F. Biogenesis and functions of bacterial S-layers. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 211-222 (2014)
- (10) van Teeseling, M. C. F. *et al.* A New Addition to the Cell Plan of Anammox Bacteria: "Candidatus Kuenenia stuttgartiensis" Has a Protein Surface Layer as the Outermost Layer of the Cell. *J. Bacteriol.* **196**, 80-89 (2014).
- (11) Strous, M., Heijnen, J. J., Kuenen, J. G. & Jetten, M. S. M. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 589-596 (1998).
- (12) Nia, S. Q., Sun, N., Yang, H. L., Zhang, J. & Ngo, H. H. Distribution of extracellular polymeric substances in anammox granules and their important roles during anammox granulation. *Biochem. Eng. J.* **101**, 126-133 (2015).
- (13) Tischler, A. D. & Camilli, A. Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **53**, 857-869 (2004).
- (14) Guo, Y. Z. *et al.* Insight into c-di-GMP Regulation in Anammox Aggregation in Response to Alternating Feed Loadings. *Environ. Sci. Technol.* **51**, 9155-9164 (2017).
- (15) Hou, X. L., Liu, S. T. & Zhang, Z. T. Role of extracellular polymeric substance in determining

- the high aggregation ability of anammox sludge. *Water Res.* **75**, 51-62 (2015).
- (16) Ali, M. *et al.* Aggregation ability of three phylogenetically distant anammox bacterial species. *Water Res.* **143**, 10-18 (2018).
- (17) de Almeida, N. M. *et al.* Immunogold Localization of Key Metabolic Enzymes in the Anammoxosome and on the Tubule-Like Structures of *Kuenenia stuttgartiensis*. *J. Bacteriol.* **197**, 2432-2441 (2015).
- (18) Neumann, S. *et al.* Isolation and characterization of a prokaryotic cell organelle from the anammox bacterium *Kuenenia stuttgartiensis*. *Mol. Microbiol.* **94**, 794-802 (2014).
- (19) Jafferji, A., Allen, J. W. A., Ferguson, S. J. & Fulop, V. X-ray crystallographic study of cyanide binding provides insights into the structure-function relationship for cytochrome cd(1) nitrite reductase from *Paracoccus pantotrophus*. *J. Biol. Chem.* **275**, 25089-25094 (2000).
- (20) Allen, J. W. A. *et al.* Why isn't 'standard' heme good enough for c-type and d(1)-type cytochromes? *Dalton Trans.*, 3410-3418 (2005).
- (21) Nojiri, M. *et al.* Structure and function of a hexameric copper-containing nitrite reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 4315-4320 (2007).
- (22) Strous, M. *et al.* Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature* **440**, 790-794 (2006).
- (23) Kartal, B. *et al.* Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. *Nature* **479**, 127-U159 (2011).
- (24) de Almeida, N. M. *et al.* Membrane-bound electron transport systems of an anammox bacterium: A complexome analysis. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.* **1857**, 1694-1704 (2016).
- (25) van de Vossenberg, J. *et al.* The metagenome of the marine anammox bacterium 'Candidatus Scalindua profunda' illustrates the versatility of this globally important nitrogen cycle bacterium. *Environ. Microbiol.* **15**, 1275-1289 (2013).
- (26) Hira, D. *et al.* Anammox organism KSU-1 expresses a NirK-type copper-containing nitrite reductase instead of a NirS-type with cytochrome cd(1). *FEBS Lett.* **586**, 1658-1663 (2012).
- (27) Speth, D. R., in 't Zandt, M. H., Guerrero-Cruz, S., Dutilh, B. E. & Jetten, M. S. M. Genome-based microbial ecology of anammox granules in a full-scale wastewater treatment system. *Nat. Commun.* **7**, 10 (2016).
- (28) Kartal, B. & Keltjens, J. T. Anammox Biochemistry: a Tale of Heme c Proteins. *Trends Biochem.Sci.* **41**, 998-1011 (2016).
- (29) Igarashi, N., Moriyama, H., Fujiwara, T., Fukumori, Y. & Tanaka, N. The 2.8 angstrom structure of hydroxylamine oxidoreductase from a nitrifying chemoautotrophic bacterium, *Nitrosomonas europaea*. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 276-284 (1997).
- (30) Cedervall, P., Hooper, A. B. & Wilmot, C. M. Structural Studies of Hydroxylamine Oxidoreductase Reveal a Unique Heme Cofactor and a Previously Unidentified Interaction Partner.

Biochemistry **52**, 6211-6218 (2013).

(31) Ferousi, C. *et al.* Characterization of a nitrite-reducing octaheme hydroxylamine oxidoreductase that lacks the tyrosine cross-link. *J. Biol. Chem.* **296**, 10 (2021).

(32) Kartal, B. *et al.* Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. *Nature* **479**, 127-U159 (2011).

(33) Harhangi, H. R. *et al.* Hydrazine Synthase, a Unique Phylomarker with Which To Study the Presence and Biodiversity of Anammox Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 752-758 (2012).

(34) Dietl, A. *et al.* The inner workings of the hydrazine synthase multiprotein complex. *Nature* **527**, 404-+ (2015).

(35) Chen, C. K. M., Chan, N. L. & Wang, A. H. J. The many blades of the beta-propeller proteins: conserved but versatile. *Trends Biochem.Sci.* **36**, 553-561 (2011).

(36) Xu, C. & Min, J. R. Structure and function of WD40 domain proteins. *Protein Cell* **2**, 202-214 (2011).

(37) Pettigrew, G. W., Echaliier, A. & Pauleta, S. R. Structure and mechanism in the bacterial dihaem cytochrome c peroxidases. *J. Inorg. Biochem.* **100**, 551-567 (2006).

(38) Poulos, T. L. Thirty years of heme peroxidase structural biology. *Arch. Biochem. Biophys.* **500**, 3-12 (2010).

(39) Shin, S. & Davidson, V. L. MauG, a diheme enzyme that catalyzes tryptophan tryptophylquinone biosynthesis by remote catalysis. *Arch. Biochem. Biophys.* **544**, 112-118 (2014).

(40) Wilmot, C. M. & Yukl, E. T. MauG: a di-heme enzyme required for methylamine dehydrogenase maturation. *Dalton Trans.* **42**, 3127-3135 (2013).

(41) Ferousi, C. *et al.* Characterization of a nitrite-reducing octaheme hydroxylamine oxidoreductase that lacks the tyrosine cross-link. *J. Biol. Chem.* **296**, 10 (2021).

(42) Damste, J. S. S. *et al.* Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane. *Nature* **419**, 708-712, (2002).

(43) Rattray, J. E. *et al.* Ladderane lipid distribution in four genera of anammox bacteria. *Arch. Microbiol.* **190**, 51-66, (2008).

(44) Moss, F. R. *et al.* Ladderane phospholipids form a densely packed membrane with normal hydrazine and anomalously low proton/hydroxide permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 9098-9103, (2018).

(45) Javidpour, P. *et al.* Investigation of Proposed Ladderane Biosynthetic Genes from Anammox Bacteria by Heterologous Expression in E-coli. *PLoS One* **11**, 21, (2016).

(46) Chen, Z. X. *et al.* Mechanochemical unzipping of insulating poly ladderene to semiconducting polyacetylene. *Science* **357**, 475-478 (2017).

(47) Rattray, J. E. *et al.* A comparative genomics study of genetic products potentially encoding ladderane lipid biosynthesis. *Biol. Direct* **4**, 16, (2009).

- (48) Magnuson, K., Jackowski, S., Rock, C. O. & Cronan, J. E. REGULATION OF FATTY-ACID BIOSYNTHESIS IN ESCHERICHIA-COLI. *Microbiol. Rev.* **57**, 522-542 (1993).
- (49) Choi, K. H., Heath, R. J. & Rock, C. O. beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) is a determining factor in branched-chain fatty acid biosynthesis. *J. Bacteriol.* **182**, 365-370 (2000).
- (50) Whitfield, C. & Trent, MS, Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **83**, 99-128, (2014)
- (51) Issartel, J. P., Koronakis, V. & Hughes, C. ACTIVATION OF ESCHERICHIA-COLI PROHAEMOLYSIN TO THE MATURE TOXIN BY ACYL CARRIER PROTEIN-DEPENDENT FATTY ACYLATION. *Nature* **351**, 759-761 (1991).
- (52) Geiger, O. & Lopez-Lara, I. M. Rhizobial acyl carrier proteins and their roles in the formation of bacterial cell-surface components that are required for the development of nitrogen-fixing root nodules on legume hosts. *FEMS Microbiol. Lett.* **208**, 153-162, (2002).
- (53) Padilla-Gomez, J. et al. Specialized acyl carrier protein used by serine palmitoyltransferase to synthesize sphingolipids in Rhodobacteria. *Front. Microbiol.* **13**, 20 (2022).
- (54) Broderick, J. B., Duffus, B. R., Duschene, K. S. & Shepard, E. M. Radical S-Adenosylmethionine Enzymes. *Chem. Rev.* **114**, 4229-4317 (2014).
- (55) Bennett, M. R., Shepherd, S. A., Cronin, V. A. & Micklefield, J. Recent advances in methyltransferase biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **37**, 97-106 (2017).
- (56) 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 (2017).
- (57) Awakawa, T. et al. A Methyltransferase Initiates Terpene Cyclization in Teleocidin B Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 9910-9913, (2014).
- (58) Chen, S. S. & Tantillo, D. J. Potential for Ladderane (Bio)synthesis from Oligo-Cyclopropane Precursors. *Acs Omega* **5**, 26134-26140, (2020).
- (59) Grogan, D. W. & Cronan, J. E. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 429-441 (1997).
- (60) Huang, C. C., Smith, C. V., Glickman, M. S., Jacobs, W. R. & Sacchettini, J. C. Crystal structures of mycolic acid cyclopropane synthases from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **277**, 11559-11569 (2002).
- (61) Hiratsuka, T. et al. Biosynthesis of the Structurally Unique Polycyclopropanated Polyketide-Nucleoside Hybrid Jawsamycin (FR-900848)**. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **53**, 5423-5426 (2014).
- (62) Dietl, A. & Barends, T. R. M. Dynamics in an unusual acyl carrier protein from a ladderane lipid-synthesizing organism. *Proteins* **90**, 73-82, (2022).
- (63) Milligan, J. C. et al. Molecular basis for interactions between an acyl carrier protein and a ketosynthase. *Nat. Chem. Biol.* **15**, 669-671 (2019).
- (64) Dodge, G. J. et al. Structural and dynamical rationale for fatty acid unsaturation in *Escherichia*

- coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 6775-6783 (2019).
- (65) Jumper, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583-589(2021).
- (66) Yin, R., Feng, B. Y., Varshney, A. & Pierce, B. G. Benchmarking AlphaFold for protein complex modeling reveals accuracy determinants. *Protein Sci.* **31**, 19 (2022).
- (67) Skiba, M. A. *et al.* Domain Organization and Active Site Architecture of a Polyketide Synthase C-methyltransferase. *ACS Chem. Biol.* **11**, 3319-3327, (2016).
- (68) Kishimoto, S. *et al.* Functional and Structural Analyses of trans C-Methyltransferase in Fungal Polyketide Biosynthesis. *Biochemistry* **58**, 3933-3937 (2019).
- (69) Storm, P. A., Herbst, D. A., Maier, T. & Townsend, C. A. Functional and structural analysis of programmed Cc-methylation in the biosynthesis of the fungal polyketide citrinin. *Cell Chem. Biol.* **24**, 316-325 (2017).
- (70) Horowitz, S. *et al.* Conservation and Functional Importance of Carbon-Oxygen Hydrogen Bonding in Ado Met-Dependent Methyltransferases. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 15536-15548 (2013).
- (71) Iwig, D. F., Uchida, A., Stromberg, J. A. & Booker, S. J. The activity of *Escherichia coli* cyclopropane fatty acid synthase depends on the presence of bicarbonate. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 11612-11613 (2005)
- (72) Luo, Z. P. Selenourea: a convenient phasing vehicle for macromolecular X-ray crystal structures. *Sci Rep* **6**, 6 (2016).
- (73) Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. Sect. D* **66**, 486-501 (2010).
- (74) Liebschner, D. *et al.* Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in Phenix. *Acta Crystallogr. D* **75**, 861-877 (2019).
- (75) Rock, C. O. & Jackowski, S. REGULATION OF PHOSPHOLIPID-SYNTHESIS IN ESCHERICHIA-COLI - COMPOSITION OF THE ACYL-ACYL CARRIER PROTEIN POOL INVIVO. *J. Biol. Chem.* **257**, 10759-10765 (1982).
- (76) Chen, W., Wang, B., Gruber, J. D., Zhang, Y. M. & Davies, C. Acyl Carrier Protein 3 Is Involved in Oxidative Stress Response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* **9**, 13, (2018).
- (77) Dunham, W. H., Mullin, M. & Gingras, A. C. Affinity-purification coupled to mass spectrometry: Basic principles and strategies. *Proteomics* **12**, 1576-1590 (2012).
- (78) Varnaite, R. & MacNeill, S. A. Meet the neighbors: Mapping local protein interactomes by proximity-dependent labeling with BioID. *Proteomics* **16**, 2503-2518, (2016).
- (79) Dalton, D. A., delCastillo, L. D., Kahn, M. L., Joyner, S. L. & Chatfield, J. M. Heterologous expression and characterization of soybean cytosolic ascorbate peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **328**, 1-8, (1996).
- (80) Branon, T. C. *et al.* Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nat.*

Biotechnol. **36**, 880 (2018).

(81) Kido, K. *et al.* AirID, a novel proximity biotinylation enzyme, for analysis of protein-protein interactions. *Elife* **9**, 24, (2020).