

(様式2)

学位論文の概要及び要旨

氏名 上垣 哲心 印

題目 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

学位論文の概要及び要旨

亜硝酸を用いてアンモニアを嫌氣的に酸化するアナモックス菌は、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ラダラン脂質を生産する。この梯子状疎水基は他の天然物に見られず、その有機合成が困難であることから生合成メカニズムが大きな注目を集めている。ラダラン脂質の生産にはII型脂肪酸生合成 (FASII) や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依存性酵素が関与し、その生合成中間体はアシルキャリアプロテイン (ACP) に結合しているとの仮説が提案されているが、これを直接指示する実験的なデータは未だ得られていない。FASIIにおいてACPと脂肪酸合成酵素が複合体を形成し、炭化水素鎖が形成されるように、ラダラン脂質生合成においてもACPは梯子状疎水基を構築する酵素と複合体を形成すると推定される。本研究ではまず、ACPを用いたプルダウンアッセイを行い、アナモックス菌のACPがSAM MTaseに結合することを確認した。続いて、SAM MTaseのX線結晶構造解析や、最新のタンパク質構造予測プログラムAlphaFold2を用いたACP-SAM MTase複合体の構造予測などの構造生物学的な解析を進めた。また、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やACPに結合している生合成中間体をアナモックス菌から単離・同定することも目指し、アナモックス菌破砕液に対する近接依存性標識、さらには抗ACP抗体の作製など生化学的な実験と解析も行った。

アナモックス菌 *Kuenenia stuttgartiensis* がもつ複数のSAM MTaseのひとつMTase1は他のSAM MTaseから進化系統樹的に早期に分岐しており、他の生物には見られないラダラン脂質生合成に関与するよう進化したと推定されている。また、アナモックス菌は3種類のACP (ACP1, ACP2, ACP3) を有することも知られている。アナモックス菌 *Brocadia fulgida* 由来MTase1を発現させた大腸菌破砕液に対して3種のACPを固定化した担体を用いたプルダウンアッセイを行った。その結果、MTase1が3種のACPとそれぞれ相互作用することが明らかになり、仮設通りACPとMTase1が複合体を形成することが示唆された。続いてMTase1のX線結晶構造解析を行い、この酵素は細長い基質ポケットを有しており、その内部には一般的なSAM MTaseと同様に、酸-塩基触媒と推定されるHis-Glu dyadが存在することを明らかにした。さらに、タンパク質のアミノ酸配列から立体構造を高い信頼性で予測可能なプログラムAlphaFold2

を用いて、MTase1と3種のACPとの複合体の構造モデルをそれぞれ構築した。ラダラン脂質生合成においてもFASIIによる脂肪酸生合成と同様にACPの表面に保存されたSer残基が4'-ホスホパンテテインを介して、生合成中間産物と結合すると推定される。3種のACP-MTase1複合体モデルの内、ACP3-MTase1複合体モデルにおいてのみ、ACPに保存されたSer残基がMTase1の基質ポケット入り口付近に位置していた。これらの結果から、MTase1は一般的なFASIIによる脂肪酸生合成には関与しないが、生合成中間産物と結合したACPと特異的に相互作用し、これを基質として酵素反応を行っていることが実験データに基づいて初めて示唆された。

大腸菌において、ACPに結合しているアシル基の大部分はFASIIの生合成中間体である中鎖アシルACPであることから、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、抗ACP抗体を固定化した担体を用いてACPを精製し、これに結合している生合成中間体及びその運搬を担うACPの同定を目指した。まず、アナモックス菌を培養し、その総脂質にラダラン脂質が含まれていることをGC-MSにより確認した。続いて、抗ACP抗体を作製・精製し、これらを用いて、アナモックス菌破碎液上清に対してウェスタンブロッティングを行ったところ、ACP1とACP3が発現していることが確認できた。抗ACP抗体を固定化した担体を用いて、アナモックス菌からACP1とACP3をそれぞれ精製したが、中間体の同定に十分な量のACPは得られなかった。しかし、ラダラン脂質を生産しているアナモックス菌において、ACP1とACP3の発現が確認できたことから、これらの内いずれか、またはその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。

アナモックス菌破碎液からACPと相互作用する酵素を単離・同定するため、ACPと基質特異性を持たず、近接したタンパク質をビオチン化するAirIDとの融合タンパク質を用いて、ACPと相互作用するタンパク質を選択的にビオチン標識する近接依存性標識 (PL) が有効と期待される。そこで、ACPを融合させたAirIDを調製した。今後、この手法を用いてアナモックス菌のACPと特異的に相互作用し、ラダラン脂質の梯子状疎水基の構築に関与すると期待される酵素の同定を進める。