

人工アデニル化酵素を活用したペプチド結合形成酵素の機能およびキャリアータンパク質認識機構の解明

石川 文洋
近畿大学 薬学部

研究の目的

微生物が産生する非リボソームペプチドは、多様な化学構造および有用な生物活性を有する。また、その化学構造の複雑さから、遺伝子組換え微生物による物質生産法や酵素的に多様な類縁体を創製する手法の確立が待たれている。ペプチド系天然物の多くは、非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) により生合成される。NRPS によるペプチド合成には、20 種類の天然型アミノ酸以外に非天然型アミノ酸も使える利点があり、創薬への期待が高い。しかし NRPS は、アミノ酸を選別するアデニル化酵素に加えてアミノ酸を縮合する縮合酵素の基質特異性の高さから、様々な種類のペプチドを含む化合物ライブラリーの構築には適していないとされている。一因として、縮合酵素の酵素化学的性質の理解が乏しいことが挙げられる。我々は、エンテロバクチン生合成に関与する 2,3-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB) 選択的アデニル化酵素 (EntE) をモデルとして、厳密な基質特異性を緩和し、多様な安息香酸誘導体を許容するアデニル化酵素 (EntE 変異体) の創製に成功した (図 1)¹⁾。EntE 変異体は、16 種類に及ぶ多様な置換様式をもつ一置換安息香酸誘導体を基質として許容することが判明した²⁾。そこで本研究では、鉄キレート剤エンテロバクチン生合成系をモデルとして独自に開発した拡張型反応場をもつアデニル化酵素 (EntE 変異体) を活用することで、縮合酵素の基質認識の厳密性と寛容性を明らかにすることを目的とする。それら情報を基に合理的に生合成システムを活用あるいはリデザインすることにより、非天然型ペプチド系化合物の創製など応用研究に結びつけることが期待される。

方法

1) 拡張型反応場を有するアデニル化酵素の機能解析

X線結晶構造解析により、EntE 変異体は野生型 EntE の基質結合部位と比較して、嵩高い置換基を許容する空間を有していることがわかった (図 1)。特に安息香酸の 3 位近傍にはさらに嵩高い置換基を許容しうる大きな空間が広がっていることが判明した (図 1)¹⁾³⁾。これら結果に基づき、二置換安息香酸誘導体および 3 位近傍の空間を埋める基質を設計および合成を行う。また、マラカイトグリーン法により酵素活性測定を行う。続いて、酵素活性を有する基質に関して酵素反応速度論解析を行う。さらに、様々な安息香酸誘導体を基質として EntE 変異体からのキャリアータンパク質 EntB への基質の受け渡しを MALDI-TOFMS を用いて確認する。

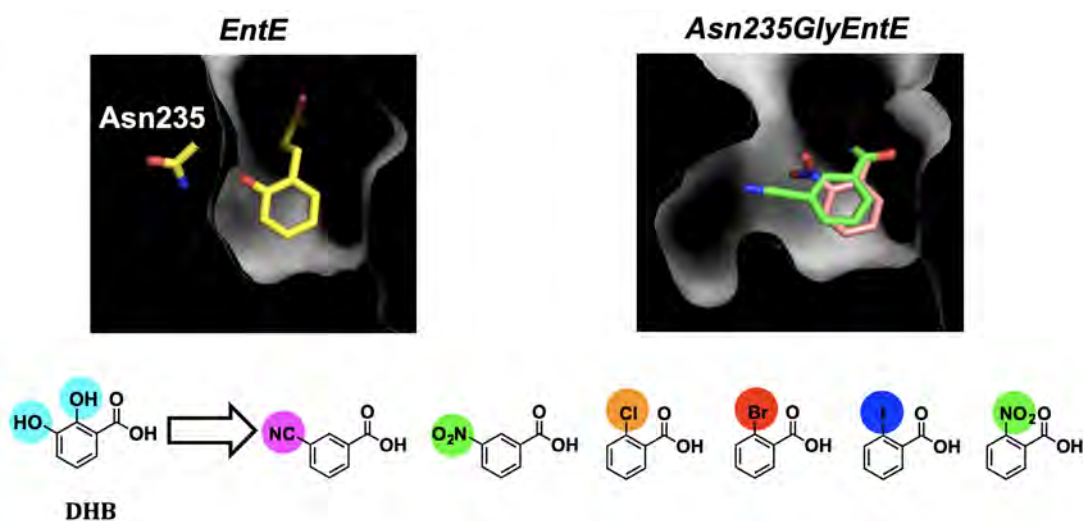


図 1. アデニル化酵素 EntE 変異体の活性部位構造

2) 縮合酵素の基質特異性の解析

野生型 EntE、EntE 変異体、EntB および EntF を大腸菌組換えタンパク質として調製し、アデニル化酵素の基質として DHB を用いることで、試験管内エンテロバクチン生合成系を構築する。また、DHB を様々な安息香酸誘導体へ置換することで非天然型エンテロバクチン誘導体および生合成中間体の生成を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) および LC-MS を用いて評価する。

結果

1) 二置換安息香酸誘導体および 3 位近傍の空間を埋める基質を設計および合成

安息香酸の 2 位および 3 位に多様な置換基 (ハロゲン、メチル、メトキシ、アルキン、水酸基、アミノ基、ニトロ基、シアノ基など) をもつ 31 種類の二置換安息香酸誘導体および 3 位近傍の空間を埋める基質の設計 (市販の二置換安息香酸誘導体を含む) および合成を行った。

2) アデニル化酵素の酵素活性測定

アデニル化反応の酵素活性は、マラカイトグリーン法により測定した。野生型 EntE (1 μM) および EntE 変異体 (1 μM)、基質 (1 mM)、ATP (200 μM) を加え、室温にて 30 分間酵素反応を行った。アデニル化反応により生成する PP_i を無機ピロホスファターゼにより P_i へ変換し、 P_i を定量することにより評価した。その結果、アデニル化酵素 EntE 変異体は、20 種類の非天然型安息香酸誘導体を基質として許容することが判明した。また、野生型 EntE は、これら基質に対してまったく酵素活性を示さなかった。

3) キャリアータンパク質への非天然型基質の受け渡し

20 種類の非天然型安息香酸誘導体を基質として、下流のキャリアータンパク質 (EntB) への基質の受け渡しを評価した。EntE 変異体 (1 μ M)、EntB (15 μ M)、基質 (1-4 mM)、ATP (2.5 mM) を加え、MALDI-TOFMS を用いて、基質の受け渡しの経時変化を追跡した (37 $^{\circ}$ C、0、30、60、90、120 分)。その結果、16 種類の非天然型安息香酸誘導体のキャリアータンパク質への受け渡しを確認した。

4) 縮合酵素の基質特異性の解析

野生型 EntE、EntB、EntF、DHB、L-Ser、ATP を用いて、試験管内エンテロバクチン生合成系の構築および最適化を行った。エンテロバクチンの生成は、HPLC および LC-MS 解析により行った。また、EntE 変異体を用いて、エンテロバクチンの生成を確認した。現在、EntE 変異体および非天然型安息香酸誘導体を用いて、エンテロバクチン誘導体および生合成中間体の解析を進めている。

結論

拡張型反応場をもつアデニル化酵素の機能解析により、多様な置換様式の一置換安息香酸だけでなく、二置換安息香酸誘導体を基質として許容することが判明した。また、野生型 EntE および EntE 変異体を用いて、試験管内エンテロバクチン生合成の構築を行った。これにより、EntE 変異体および非天然型安息香酸誘導体を用いて、エンテロバクチン誘導体および生合成中間体の生成を評価することで、縮合酵素の基質認識の厳密性と寛容性を明らかにできる。

最後になりますが、本研究を支援して頂いた公益財団法人野田産業科学研究所に深謝致します。

文献

- 1) Ishikawa, F., Miyanaga, A., Kitayama, H., Nakamura, S., Nakanishi, I., Kudo, F., Eguchi, T., and Tanabe, G. (2019) An engineered aryl acid adenylation domain with an enlarged substrate binding pocket. *Angew. Chem. Int. Ed.* **58**: 6906-6910.
- 2) Ishikawa, F., Nohara, M., Nakamura, S., Nakanishi, I., and Tanabe, G. (2020) Precise probing of residue roles by NRPS code swapping: mutation, enzymatic characterization, modeling, and substrate promiscuity of aryl acid adenylation domains. *Biochemistry* **5**: 351-363.
- 3) Ishikawa, F., Kitayama, H., Nakamura, S., Takashima, K., Nakanishi, I., Tanabe, G. (2021) Activity, binding, and modeling studies of a reprogrammed aryl acid adenylation domain with an enlarged substrate binding pocket. *Chem. Pharm. Bull.* **69**: 222-225.