

生理活性物質誘導化ツールとしての酵素開発

Developing Enzymatic Tools to Derivatize Bioactive Compounds

ケンタッキー大学 森 省吾
派遣期間 2018年4月1日～2019年3月31日
研究機関 Department of Pharmaceutical Sciences, University of Kentucky
Lexington, KY 40536-0596, United States
研究指導者 Prof. Sylvie Garneau-Tsodikova

Antibiotics have been saving billions of people since the discovery of penicillin. Nowadays, however, pathogens with antibiotic resistance are increasing at an alarming rate. Therefore, new drugs are in high demand. Natural products (NPs) are one of the primary sources of medications. Many NPs have complex structures, which give them their high specificity and potent activity. However, their structural complexity causes difficulties when synthesizing NPs from scratch as well as modifying their structure selectively. To overcome such challenges, combinatorial biosynthesis aimed at derivatizing NP structures by engineering biosynthetic genes and enzymes from the antibiotic producing organisms has generated a lot of attention. Herein, to understand enzymes that could be developed as tools for combinatorial biosynthesis, we studied bacterial enzymes that are involved in the production of nonribosomal peptides (NRPs), one of the largest classes of NPs. It was demonstrated that (1) noncognate MbtH-like proteins altered substrate profile of an adenylation enzyme, (2) novel tri-functional adenylation enzyme was created from bi-functional one while retaining their functions, and (3) a halogenase enzyme that possesses unusually high substrate and halide versatility was biochemically and structurally characterized. These studies shed light on how enzymes may be engineered and/or used for combinatorial biosynthesis.

研究目的

近年、世界中で薬剤耐性菌の感染例が報告されその数は増え続けており、新薬の開発が急務となっている。微生物や植物の生成する二次代謝産物である天然物は、薬やその出発物質の主要な供給源として知られている。遥か昔から天然物の混合物として生薬が医療行為に利用され、最初に発見された抗生物質であるペニシリンの登場以来、単離された天然物が感染症・自己免疫疾患・癌など様々な疾患の治療に利用されている。現在では、認可されている薬の70%以上が何らかの形で天然物に由来している。生物の体内で酵素によって生成される天然物は、複雑な構造を持つゆえに対象が限定され、副作用の少ない薬として利用できる。しかし同時に、既存の有機化学合成技術では正確に再現することや、狙った誘導体を得ることは難しい。そこで、複雑な化学反応

を効率よく触媒する、酵素を利用した技術が大きな注目を集めている。

酵素とはタンパク質の一種であり、生体内の化学反応のほとんどを触媒しており、生命維持に主要な働きをしている。非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) は、天然物を合成する酵素の分類の一つであり、ペニシリンのようなアミノ酸を元にしたペプチド骨格を持つ多様な天然物を合成する^[1]。NRPSは、種々の機能を持つドメインが複数つながったモジュールの組み合わせによって成り立っている。すなわち、個々のドメインで触媒される様々な化学反応を単一の系で運用することで、効率よく天然物を合成しているのである。基本的なモジュールは、アデニル化部位 (A ドメイン)、縮合部位 (C ドメイン)、チオエステル化及びペプチド移動部位 (T ドメイン) と呼称される必須ドメインを含む。非リボソームペ

プチド (NRP) の合成は、A ドメインがアミノ酸を選択・活性化することから始まり、そのアミノ酸が T ドメインへと送られ、C ドメインによってペプチド結合が形成される。これら一連の反応が一つのモジュールで行われ、生成物が次のモジュールへと送られることで、組み立てラインの様に目的の長さまでペプチド鎖を延ばしていく。これらの過程の前後、もしくは合間において、別種のドメインや外部の酵素によって中間体が化学修飾されることで、高度に複雑化された目的の物質が合成される。

このような一連の天然物合成過程において、ゲノムや酵素に改変を加えて新たな物質を作り出す試みがコンビナトリアル合成である。また酵素の本来持つ高い位置選択性は、有機化学的手法では困難であることの多い、特定の物質の特定の部位を効率よく修飾することが可能となる。

本研究では、主に NRPS に着目し、上記のような従来の手法では困難とされる天然物の誘導体化へとつながる酵素の機能・構造・利用法研究を行う。

研究経過

(1) MbtH 様タンパク質を利用した A ドメインの活性変化。NRPS の A ドメインは、上記のとおりアミノ酸を選択する機能を持つため、最終生成物の構造決定に大きく寄与する。A ドメインの中には、その活性に MbtH 様タンパク質 (MLP) と呼ばれる小さなタンパク質への結合が必要なものが存在する。MLP の正確な機能は解明されていないが、A ドメインの発現・溶解度・安定性・選択性に影響することが報告されている。ケンタッキー大学の Garneau-Tsodikova 研究室では、特に選択性への影響に着目した。すなわち、相互作用する MLP を別種のものに代えることで、A ドメインの基質選択性を変化させられるか、という研究である。

様々な組み合わせによる A ドメインの活性変化を精査した結果、Thiocoraline の合成に関与する NRPS 酵素である TioK の A ドメインは、自然界では TioT と呼ばれる MLP と結合するが、別種の MLP と結合させることで基質選択性が低下することが判明した (Fig. 1)。また様々な MLP と組み合わせた TioK の酵素反応速度を測定した結果、どの組み合わせでも、酵素と基質の親和性を示す K_m の値はほとんど変化せず、代わりに酵素の最大反応速度を示す V_{max} (k_{cat}) が大きく変化することが判明した。これは、

以前に別の研究室から発表された、別種の MLP への結合は k_{cat} よりも K_m に影響するという報告とは正反対の結果となった^[2, 3]。A ドメインと MLP の相互作用やアミノ酸配列の解析なども経て、MLP の A ドメインへの影響を単純化することは、少なくとも現段階では難しいだろうという結論を得た。この成果は、*ChemBioChem* 誌上にて発表された (誌上発表 1)。

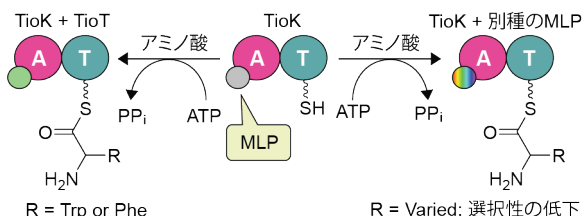


Fig. 1: Representation of altered substrate profile of TioK A domain by noncognate MLPs. Large circles indicate A and T domains of TioK, and small circles indicate MLPs.

(2) メチル化部位を二か所に内包する Interrupted-A ドメインの生成。NRPS のドメインは、原則的に一ドメイン一作用を持つが、A ドメインの中にはその構造内に他種のドメインを内包するものも存在し、それらは Interrupted-A ドメインと呼称され一ドメイン複数作用を有する。Garneau-Tsodikova 研究室では、特にメチル化部位 (M ドメイン) を内包した Interrupted-A ドメインの研究を通して、天然物のメチル化 (CH_3 の置換) を目標としている。天然物、特に NRP のメチル化は非常に重要な誘導体化であり、それにより多くの場合、目的物質の生物活性や生物学的利用能 (吸収効率) が向上する。

これまで、Interrupted-A ドメインに関する多くの基礎研究が行われ、2018 年度には、通常 A ドメインから人工的に Interrupted-A ドメインを作成することに成功している (Fig. 2A)^[4]。この人工 Interrupted-A ドメインでは、アミノ酸の骨格部分に位置する窒素原子をメチル化のターゲットとした。一方、自然界では側鎖 (セリンやチロシンのアルコール部位、またはシステインのチオール部位) へのメチル化もしばしばみられる。そこで、人工 Interrupted-A ドメインの発展型として、二つの M ドメインを内包した Di-interrupted-A ドメインの開発を行った。

Interrupted-A ドメインに含まれる別種のドメインは、通常 A ドメイン上の特定の部位に内包される。しかしこの研究では、二つの M ドメインを導入する

関係上、A ドメインの二か所を対象とする必要があった。そこで、通常とは異なる部位に M ドメインを内包する、特殊なタイプの Interrupted-A ドメインを出発点とし、更に別種の M ドメインを通常の部位に導入することで、二つの M ドメインを内包する Di-interrupted-A ドメインを作成した。この試みは成功し、それぞれの元のドメインの機能をよく保存したまま、三種類の機能を持つ単一のドメインが人工的に作成された (Fig. 2B)。特筆すべき点として、この人工 Di-interrupted-A ドメインは、自然界に存在しない全く新しいタイプの NRPS 酵素であった。この成果は、*Organic and Biomolecular Chemistry* 誌上にて発表された (誌上発表 2)。

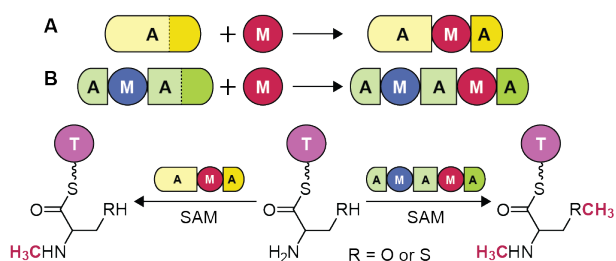


Fig. 2: A. Engineered interrupted A domain created in the past study.^[4] B. Engineered di-interrupted A domain created in this study. The bottom scheme represents methylation reactions by these enzymes.

(3) 広範な基質選択性を有するハロゲン化酵素の発見と利用法の研究。ハロゲン化 (フッ素 (F)、塩素 (Cl)、臭素 (Br)、ヨウ素 (I) の置換) もメチル化と同様、非常に重要な誘導体化の一つである。ハロゲン化によって、化合物の生物活性や生物学的利用能が変化するのに加えて、ハロゲン化された小分子は有機化学合成の中間体として利用できる。有機化学的なハロゲン化の制御は簡単ではなく、また多くの場合、環境破壊をもたらす物質を触媒として使用しなくてはならない。そこで、特定の反応のみを効率よく触媒する酵素によるハロゲン化が注目されている。Garneau-Tsodikova 研究室では、同大学の Tsodikov 研究室との共同研究によって、NRP である *pyoluteorin* の生合成経路にみられるハロゲン化酵素の研究を進めていた。本研究では、その中でも PltM と呼ばれる酵素を対象として基礎的な研究と共に利用法の開発も同時に行った。

PltM は、*pyoluteorin* の生合成経路に含まれる三つのハロゲン化酵素のうちの一つである。直接的に

pyoluteorin の生合成に関わる他の二つのハロゲン化酵素と異なり、PltM は生合成を開始するためのシグナル分子の合成にかかわるとされる^[5]。その基質はフロログルシノール (PG) であり、一つないしは二つの塩素を水素と置換する。しかし、より深い理解を得るための研究を続けるうち、PltM には基質の選択に関して高い柔軟性があることが分かった。これ以前に報告されているハロゲン化酵素は、最大二つまでのハロゲンしか基質として認識することができないが、PltM は塩素、臭素、ヨウ素の三つのハロゲンを基質として利用することができた (Fig. 3A)。また、PG だけではなく、似た構造のフェノール類やアニリン類の物質も基質となることが判明した。これには、フェノール基を含む一部の天然物も含まれる。そして、どの基質を利用したとしても、酵素特有の高い位置選択性が維持されることが示された。同時に、タンパク質の固定化技術を利用することで、より高い収量と再利用法の可能性も提示された。

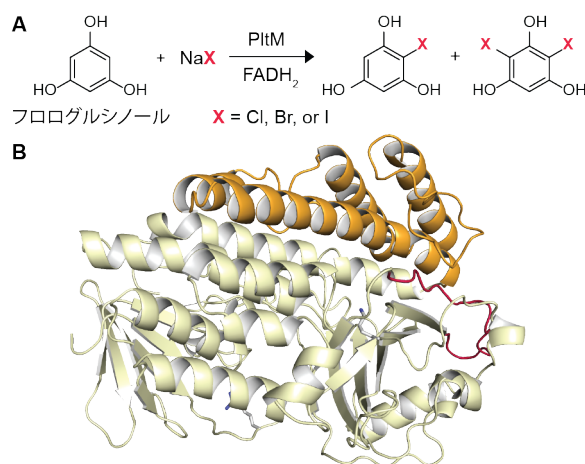


Fig. 3: A. PG halogenation by PltM. B. Crystal structure of PltM with the conserved halogenase fold in light color and the unique region in dark color.

一方、PltM は補酵素としてフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) が必要とされる。FAD を利用するハロゲン化酵素は多くあるが、そのメカニズムに関して統一した見解は示されていない。本研究では、PltM の X 線結晶構造解析から、FAD と完全に結合した状態と一部結合した状態の PltM の結晶構造が得られた。これにより、FAD の結合に際して酵素の構造がどのように変化しているのかが判明し、メカニズムへの理解が深まることとなった。また、PG の結合した状態の活性部位を解析することで、PltM が低い基質選択性を有するのは、他のハロゲン化酵素

に比べて活性部位が緩和された構造を持つからだという可能性が提示された。これらの成果は、*Nature Communications* 誌上にて発表された（誌上発表3）。

考察

(1) A ドメインは最終生成物の構造決定に大きな役割を持つことから、改変酵素の対象として長い間研究され多くの成果が上げられている。しかしほとんどの場合、A ドメインの改変は最終生成物の収量の著しい低下につながる。というのも、NRPS ではドメインやモジュール同士の相互作用が非常に重要であるため、A ドメインの改変は進化の過程で最適化された相互作用を崩すことになるからである。本研究で提示された手法は、A ドメインそのものに改変を加える必要がないことから、NRPS 内の相互作用、ひいては最終生成物の収量に与える影響が最小限で済むと考えられる。A ドメインと MLP の相互作用に関しては、より深い理解が必要不可欠であるが、将来的には天然物の誘導体化ツールとして有用なものになる可能性を秘めている。

(2) Interrupted-A ドメインに関しては、まだ研究が始められて間もない分野であるが、NRP のメチル化に関しては、すでに大きな可能性が提示されている。これまでの研究から、Interrupted-A ドメインは、A ドメインが進化の過程で外部の酵素を取り入れたものだと考えられている。これは A ドメインの柔軟性を如実に表しており、実際に以前の研究⁴や本研究でそれが証明されている。今後の最も大きな課題となりうるのは、人工的な Interrupted-A ドメインと他の NRPS ドメインとの相互作用への影響である。Garneau-Tsodikova 研究室では、より深い理解のため生化学的・構造生物学的な研究を進め、将来的には *in vivo* での応用を目指している。

(3) 本研究の対象となった PltM は、ハロゲン化酵素として全く新しい特徴を有していた。すなわち、三種類のハロゲンを基質として利用できる点である。また安定度・溶解度・低選択性・酵素反応速度など、他のハロゲン化酵素と比べて優位な点も多く、将来的には工業的な利用も可能であると考えられる。今後は、酵素改変や反応条件の最適化などにより、更に安定度・低選択性・反応速度を向上させることを

目指して研究していくことになる。

いずれの研究でも、それぞれの種類の酵素において初めて観測される事象が報告できたという点で革新的であった。そして各々の酵素の基礎的な理解を深め、応用例やその可能性を提示したという点では、将来的な天然物の誘導体化へ向けて確実な一歩を進めることができた。今後も酵素の基礎的な理解や、改変酵素によるコンビナトリアル生合成を通じて、新たな医薬品開発の一助になれることを期待している。

参考文献

1. Fischbach, M. A.; Walsh, C. T. (2006). *Chem. Rev.* 106(8), 3468-3496.
2. Miller, B. R.; Drake, E. J.; Shi, C.; Aldrich, C. C.; Gulick, A. M. (2016), *J. Biol. Chem.* 291, 22559–22571.
3. Schomer, R. A.; Thomas, M. G. (2017). *Biochemistry* 56, 5380–5390.
4. Lundy, T. A.; Mori, S.; Garneau-Tsodikova, S. (2018). *ACS Synth. Biol.* 7(2), 399-404.
5. Yan, Q.; Philmus, B.; Chang, J. H.; Loper, J. E. (2017). *eLife* e22835.

研究の発表

誌上発表

1. Mori, S.; Green, K. D.; Choi, R.; Buchko, G. W.; Fried, M. G.; Garneau-Tsodikova, S. (2018). *ChemBioChem* 19(20), 2186-2194.
2. Lundy, T. A.; Mori, S.; Garneau-Tsodikova, S. (2019). *Org. Biomol. Chem.* 17, 1169-1175.
3. Mori, S.†; Pang, A. H.†; Thamban Chandrika, N.; Garneau-Tsodikova, S.; Tsodikov, O. V. (2019). *Nat. Commun.* 10, 1255. †Equal contribution.

ポスター発表

1. Mori, S.; Pang, A. H.; Thamban Chandrika, N.; Garneau-Tsodikova, S.; Tsodikov, O. V. American Chemical Society National Meeting & Expo. Orlando, FL, USA, Mar 31-Apr 4, 2019. (Poster)