

リボソーム翻訳後修飾ペプチドにみられる D-アミノ酸の形成機構の解明

角 田 毅*

Formation Mechanism of D-Amino Acid in Ribosomally Synthesized and Post-translationally Modified Peptides

Takeshi TSUNODA*

Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs) are one of the important groups of natural products because of their diverse chemical structures and biological activities. RiPPs are classified based on their chemical structures and type A linaridins are a small group of linear RiPPs possessing some threonine-derived dehydrobutyrines (Dhb) also multiple D-amino acid residues like salinipeptins, and grisemycin. Since there are few examples of the presence of multiple D-amino acid residues in RiPPs and the enzymes capable of catalyzing such a reaction, we were interested in the biosynthesis of linaridins. In this report, we demonstrated that two proteins GrmH and GrmL, in the biosynthesis of grisemycin, make a heterodimer and catalyze multiple dehydration/epimerization reactions and hydrolysis to remove a leader peptide.

1. 背景

Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs) はその名の通りリボソームによって翻訳されその後翻訳後修飾を受けることにより生合成されるペプチド系天然物の一群である¹。RiPPs は興味深い化学構造や生物活性を有し、基本骨格であるペプチドが遺伝子としてコードされていることから簡単な遺伝子操作で多様な類縁体を創造できる可能性が高い。このような背景のもと中分子創薬への機運も相まって生合成研究が非常に盛んに行われている。

RiPPs はその化学構造から多様なサブグループへと分類でき、その中には linaridins という RiPPs の一群が存在する。Linaridins は linear arid peptide (直鎖で脱水したペプチド) がその名の由来であり、化学構造の特徴としては脱水アミノ酸が多く存在していることが挙げられる²。これまでに、salinipeptin, grisemycin, cypemycin, legonaridin, cacaoidin などが linaridins として報告されており、それらは type A から C まで分類される。なかでも、salinipeptin, grisemycin, cypemycin などが属する type A は脱水アミノ酸に加えて複数の D-アミノ酸を有することがこれまでに当研究室や他のグループから報告されている (Figure 1)^{3,4}。

Type A linaridin の生合成については当研究室により以下の順で行われることが示唆されている (Figure 2)⁴。まず、LinA (前駆体ペプチド) がリボソームによって生成し、続いて、LinA が LinH と LinL (もしくはどちらか一方) により脱水、異性化をうける。さらに、LinA の N 末端に存在する基質認識に重要なリーダーペプチドが在来ペプチダーゼ (もしくは未知の酵素) によって除去され、最後に LinA が LinM, LinD によってメチル化と脱炭酸をそれぞれ受ける。また、LinM と LinD をコードする遺伝子の破壊株からは全ての脱水、異性化反応が完了した生成物が単離されているため、LinH と LinL (もしくはどちらか一方) が複数の脱水反応と異性化反応を触媒していることが強く示唆されている。しかし、LinH と LinL は既知の異性化酵素と同性を示しておらず、どのように複数の異性化反応を触媒しているのかに興味もたれる。このような背景のもと本研究課題では異性化の触媒機構を明らかにすることとした。

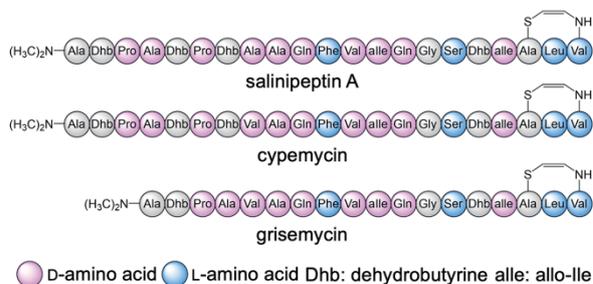


Figure 1 Type A linaridin の化学構造の模式図。

2. 結果と考察⁵

LinH と LinL の破壊株では生合成中間体の蓄積が見られなかったため、まず、LinH と LinL が実際に脱水と異性化反応を触媒するかどうかを検証することとした (以降の実験は *grisemycin* の生合成遺伝子を使用したためこれまで *lin* と表記したものを *grm* と表記する)。まず、*in vitro* 実験を行うために大腸菌からの組換えタンパク質の取得を試みた。その結果、GrmA の組換えタンパク質は取得できたものの、GrmH と GrmL はいずれも組換え酵素の取得にいたらなかった。そこで大腸菌を用いた *in vivo* での実験を行うこととした。*grmA* 単独での発現や *grmA/grmH*, *grmA/grmL*, *grmA/grmH/grmL* の共発現系を構築し、それぞれの条件下での GrmA を精製した。続いて、GrmA を加水分解し、 N^{α} -(5-Fluoro-2,4-dinitrophenyl)-L-leucinamide (L-FDLA) を用いて誘導体化を行い、GrmA 構成アミノ酸の立体配置を決定した。その結果、いずれの条件においても L 体のアミノ酸のみが検出され、異性化反応は起こっていないことが分かった。また、各条件下における GrmA の LC-MS 分析を行ったところ、*grmA* 単独発現での GrmA と保持時間、分子量の差はともに見られず、脱水反応がおこっていないことが分かった。

今回用いた *grm* 遺伝子は *Streptomyces* 属放線菌由来のため、異種発現のホストを大腸菌から *Streptomyces* 属の汎用異種発現ホストである *Streptomyces lividans* に変更することにした。大腸菌を用いた際と同様の実験を行ったところ、*grmA/grmH/grmL* の3つを共発現した際に GrmA のピークが消失し、保持時間、分子量ともに異なる新規ピークを発見した。高分解能質量分析の結果、本ピークに含まれる化合物は GrmA からリーダーペプチドが除かれ、さらに規定の回数の脱水反応が起きた化合物であることが分かった。さらに、先と同様にアミノ酸の立体配置を調べたところ、規定のアミノ酸において D 体のアミノ酸が観測され、異性化反応が起きていることが分かった。また、同様の解析を *grmA/grmH*, *grmA/grmL* においても行ったが、脱水反応、異性化反応共に観測されなかった。これらの結果より GrmH と GrmL は協働し、脱水反応・異性化反応・加水分解によるリーダーペプチドの除去という3種類の異なる反応を行うことが分かった。

これまでの結果から GrmH と GrmL は複合体を形成すると予想し、GrmL にアフィニティータグを付加し *grmA/H/L* を発現させ、アフィニティー精製を行った。その結果、GrmH と GrmL は共精製され、2つのタンパク質が相互作用していることが分かった。続いて、タンパク質構造予測プログラムである colabfold を用いて GrmA-GrmH-GrmL の3者複合体構造を予測した。その結果、GrmH と GrmL は複合体を形成しており、本複合体には2つの入り口を有する1つの反応ポケットが存在した。興味深いことに GrmA は2つの入り口を貫通するように反応ポケットに格納されていた (Figure 3)。

3. 今後の展望

これらの結果より GrmH と GrmL は複合体を形成し、1つの反応ポケットで脱水反応・異性化反応・加水分解反応を触媒し、さらに脱水反応、異性化反応においては複数箇所の反応を行う、という非常に新規性の高い酵素であることが分かった。残念ながら基質特異性は他のグループにより明らかにされてしまったものの⁶、詳細な触媒機構は明らかになっていない。今後は様々な条件検討を行うことで *in vitro* での活性の検出を行い、さらに結晶構造解析を行うことで GrmH/L 複合体が1つのポケットで3つの異なる反応をどのように行うのかまた、どのように複数箇所の反応を行うのかを明らかにしていきたい。

REFERENCES

- 1) M. Montalbán-López, *et al.*, *Nat. Prod. Rep.*, **38** (2021) 130-239.
- 2) S. Ma and Q. Zhang, *Nat. Prod. Rep.*, **37** (2020) 1152-1163.
- 3) Z. Shang, *et al.*, *ACS Chem. Biol.*, **14** (2019) 415-425.
- 4) W. Xiao, *et al.*, *ChemBioChem.*, **23** (2022) e202100705.
- 5) W. Xiao and T. Tsunoda, *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **87** (2023) 1316-1322.
- 6) Y. Xue, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **145** (2023) 7040-7047.

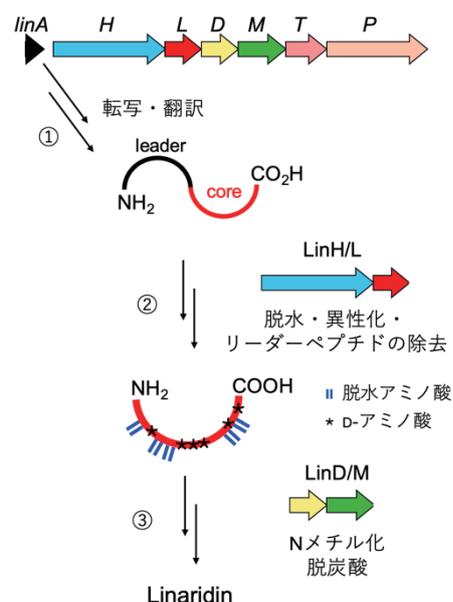


Figure 2 Linaridinの生合成の模式図。
(*lin* は linaridin 生合成遺伝子を表わす)

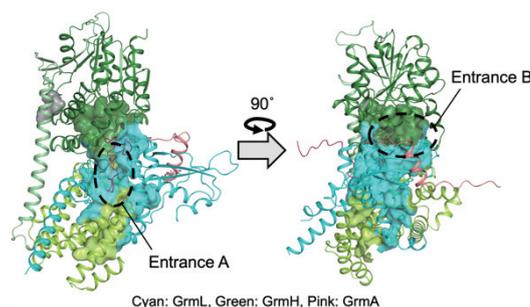


Figure 3 colabfoldによる三者複合体のモデル構造。