

8 合成プローブを用いた天然物生合成酵素の精密解析	工藤 史貴
----------------------------------	--------------

【目的】 微生物が生産する生理活性天然物として多種多様なマクロラクタム抗生物質が知られている。これら抗生物質の生合成酵素遺伝子を基質特異性の異なるものと入れ換えることで、対応する部分構造が変化した新たな抗生物質の生産が期待できる。しかしながら生合成酵素の基質認識機構やタンパク質間相互作用に関する知見は不十分であり、合理的な遺伝子組換えにはさらなる酵素化学的な情報の蓄積が重要である。本研究では、合成分子プローブを用いて、アシルキャリアープロテイン (ACP) が介在するマクロラクタム生合成酵素の基質認識機構を解明することを目的とした。本研究ではまず、β-アミノ酸を選択して活性化し ACP へとロードするアデニル化酵素と ACP との相互作用の解明を目指した。また、ACP 上のアミノアシル基を別の ACP へと転移させるアシル基転移酵素と ACP との相互作用の解明を目指した。

【方法】 アデニル化酵素に関してはプローブと反応させるための活性部位情報が不足していたので、まずはいくつかの基質特異性の異なる酵素の結晶構造解析を行った。並行して、ACP 側を修飾するためのパンテテインミミックを分子プローブとして合成した。さらに CoA 合成酵素とホスホパンテテイン基転移酵素を用いて、分子プローブで修飾された ACP を調製した。この修飾 ACP と変異導入したアデニル化酵素をクロスリンクして複合体化を検討することにした。さらに複合体の結晶化を検討し、結晶構造解析によりタンパク質間相互作用を明らかにする。アシル基転移酵素に関しては、基本的な考え方はアデニル化酵素の場合と同様であるが、β-アミノ酸をスターター部位に有するマクロラクタム抗生物質の生合成酵素に特有と考えられる基質のミミックとなる分子プローブを合成してクロスリンクを検討することにした。

【結果】 Incednine 生合成において (S)-3-アミノブタン酸を認識する酵素 IdnL1 と cremimycin 生合成において 3-アミノノナン酸を認識する CmiS6 の結晶構造解析に成功し、基質認識に関わる活性部位情報を得ることができた。また、分子プローブとして用いるパンテテインミミックを合成した。現在、修飾 ACP を調製し、アデニル化酵素とのクロスリンク反応を検討している。アシル基転移酵素に関しては、これまでクロスリンク反応に用いてきたビスマレイミドエタンはシステイン変異導入した部位との選択的な反応はせずに、期待とは異なる位置と反応してしまうことがわかった。そこでアデニル化酵素の場合と同様に、パンテテインミミックを分子プローブとして利用したクロスリンク反応を検討することにした。現在までに、2-クロロアセトアミドなどの分子プローブを用いたときにクロスリンク反応が進行することを見出した。

β-アミノ酸をスターター部位に有するマクロラクタム系抗生物質の共通的な生合成経路

