

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750370

研究課題名(和文) 合成分子プローブを基盤としたテラーメイドアデニレーションドメインの創出

研究課題名(英文) Accurate detection of adenylation domain functions in nonribosomal peptide synthetases by an enzyme-linked immunosorbent assay system using active site-directed probes for adenylation domains

研究代表者

石川 文洋 (Ishikawa, Fumihiro)

京都大学・学内共同利用施設等・助教

研究者番号：50631553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：微生物が産生するペプチド性天然化合物の多くは、非リボソーム性ペプチド合成酵素(NRPS)によって合成される。そのため、NRPSの'gatekeeper'としての役割を担っているアデニレーション(A)ドメインを改変し、非天然化合物を創出する試みが多数報告されているが成功例は非常に少ない。本研究では、Aドメインを標的にする化学プローブ群を創出し、プローブ分子のビオチン官能基を利用した、ELISA法の開発を行った。プローブ分子へのAドメインの特異的な結合を指標に、リガンド部位のアミノ酸に基質特異性(酵素活性)を有するAドメインの迅速、簡便、かつ高感度な検出に成功した。

研究成果の概要(英文)：A significant gap exists between protein engineering and enzymes used for the biosynthesis of natural products, largely because there is a paucity of strategies that rapidly detect active-site phenotypes of the enzymes with desired activities. Herein, we developed an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system for the adenylation (A) domains in nonribosomal peptide synthetases (NRPSs) using a combination of active site-directed probes coupled to a 5'-O-N-(aminoacyl)sulfamoyladenine scaffold with a biotin functionality that immobilizes probe molecules onto a streptavidin-coated solid support. When coupled with a chromogenic substrate, the antibody-based ELISA technique can visualize probe-protein binding interactions, which provides accurate readouts of the A-domain functions in NRPS enzymes.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：非リボソーム性ペプチド 非リボソーム性ペプチド合成酵素 アデニレーションドメイン 化学プローブ ELISA 酵素機能改変

1. 研究開始当初の背景

微生物が産生する二次代謝産物は、その生物活性の多様性から重要な研究ツールとなり創薬シーズとなってきた。そのような天然有機化合物の多くは非リボソーム性ペプチド合成酵素 (NRPS) およびポリケチド合成酵素 (PKS) と呼ばれる酵素群によって合成される。そのため、これら酵素システムを人為的に改変し、非天然有機化合物を創出する試みが報告されているが、タンパク質工学的手法が成熟しつつある今日においても容易なことではない。一因として、設計した基質特異性を有する酵素ドメインを創出することが困難であることが挙げられる。

2. 研究の目的

微生物の有する多モジュール型酵素 NRPS により合成される非リボソーム性ペプチドは、構造上極めて多様性に富んだ化合物群である。また、有用な生理活性を有することから、将来にわたる医薬品の探索・供給源として有望視されている。NRPS モジュールに必ず存在する A ドメインは非常に厳密な基質特異性を有し、天然の 20 種のアミノ酸、非天然アミノ酸およびアリアル酸などの生体内プールから特異的に 1 つをアミノアシル (AA)-AMP に活性化する (Fig. 1a, step 1)。次に、下流の担体タンパク質 (CP) 上の 4'-ホスホパンテテイン末端のチオール基にその基質を受け渡すことによって、アミノ酸ビルディングブロックを含むペプチド性天然有機化合物の合成が進行していく (Fig. 1a, step 2)。すなわち、A ドメインは非リボソーム性ペプチド合成における 'gatekeeper' の役割を担っている。そのため、A ドメインはタンパク質工学の魅力的な標的となってきた。これまでに、ドメインスワッピング法を利用し基質特異性の異なる A ドメインを NRPS モジュールに導入する (*J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 33, 66-74)、NRPS Code にランダム変異を導入し A ドメインライブラリーを構築する (*Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 5799-5808; *Chem. Biol.* **2011**, 18, 601-607)、2 つの手法が報告されている。しかしながら、CP を介したタンパク質間相互作用を破壊してしまうため、設計した化合物ができないあるいは収量の大幅な低下という結果になることがほとんどである (*J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 33, 66-74; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 17462-14767)。一方、A ドメインの活性部位に存在する基質特異性を決定する重要なアミノ酸残基 (8-10 残基) に対してランダム変異を導入しているため、タンパク質間相互作用を破壊することはない。しかしながら、A ドメインライブラリーから設計した基質特異性を有する A ドメインを取得することは容易なことではない (*Chem. Biol.* **2011**, 18, 601-607)。これは設計した基質特異性を有する A ドメインを選別するための明確な指標を欠いていることが挙

げられる。

我々は L-Phe に基質特異性を有する A ドメインを含む NRPS モジュール GrsA (A_{Phe}-CP-E (E: 異性化酵素)) に特異的に結合する分子プローブ (L-Phe-AMS-biotin **1**, $K_i = 34.0 \pm 2.8$ nM; L-Phe-AMS **6**, $K_i = 1.20 \pm 0.14$ nM) の開発を行ってきた (Fig. 1b) (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24, 865-869)。そこで、および分子プローブを組み合わせれば、設計した基質特異性を有する A ドメインを分子プローブに対する結合を指標にスクリーニングすることが可能になると期待して以下の研究を計画した。

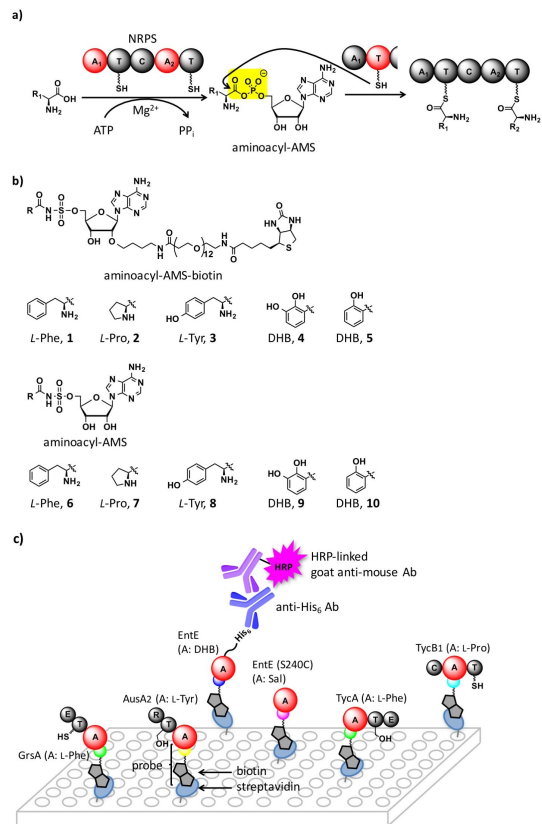


Fig 1. (a) A ドメインの触媒反応機構。(b) 分子プローブ aminoacyl-AMS-biotin および aminoacyl-AMS の構造。(c) NRPS A ドメインに対する酵素免疫吸着法 (ELISA)。NRPS は担体タンパク質 (CP または T と表記)、アデニレーション (A) ドメイン、縮合酵素 (C) ドメインを基本構成単位として有している。

3. 研究の方法

分子プローブを利用することの最大の利点は、設計した基質特異性を有する A ドメインを選別できることである。さらに、天然の 20 種のアミノ酸に限らず天然に存在しない基質特異性を有する A ドメインを創出できる可能性がある。そのためには aminoacyl-AMS-biotin scaffold の汎用性を示すことが最初のステップである。本若手研究 (B) では、種々のアミノ酸やアリアル酸を導入した aminoacyl-AMS-biotin プローブの合成お

よび機能評価を行うとともに、A ドメイン変異体をスクリーニングするための酵素免疫吸着法 (ELISA) を確立する (Fig. 1c)。さらに、A ドメイン変異体を作製し、本 ELISA platform の可能性を検討する。

A ドメインに対する分子プローブ aminoacyl-AMS-biotin の設計および合成

分子プローブ aminoacyl-AMS-biotin の設計は、A ドメインの触媒反応における高反応性中間体である AA-AMP のリン酸エステル結合を安定なスルファモイル基で置換することに基づく (生物学的等価体) (ChemBioChem 2003, 4, 903-906)。プローブの 96 穴プレートへの固定化およびストレプトアビジンと NRPS モジュールとの立体的な反応を最小限にする目的で 56 のスペーサーを有する PEG₁₂-biotin をアデノシンの 2' 位ヒドロキシル基に導入する (Fig. 1b)。また、aminoacyl-AMS-biotin スカフォードの汎用性を示す目的でリガンド部位のアミノ酸を L-Pro 2、L-Tyr 3、DHB 4 (2,3-ジヒドロキシ安息香酸)、Sal 5 (サリシル酸) に置換した分子プローブの合成を行う。

分子プローブの機能解析

抗生物質グラミジジン S の生合成に関与する NRPS (GrsA: A_{Phe}-CP-E)、抗生物質チロシジンの生合成に関与する NRPS (TycA: A_{Phe}-CP-E, TycB1: C-A_{Pro}-CP)、タンパク質分解酵素カルpain 阻害剤アウレウシミンの生合成に関与する NRPS (AusA2: A_{Tyr}-CP-R (還元酵素))、鉄キレーター (シデロフォア) エンテロバクチンの生合成に関与する NRPS (EntE: A_{DHB}) の NRPS モジュールあるいは A ドメインを大腸菌組換えタンパク質 (C 末端ヒスチジン tag) として調製する。分子プローブの機能評価は、大腸菌組換えタンパク質として調製した NRPS モジュールあるいは A ドメインに対する阻害定数 K_i を算出することにより行う。 K_i は、ヒドロキシルアミン-MesG アッセイ系を利用し、A ドメインの触媒反応により放出される PP_i を分光光度計 (355 nm) で間接的に定量する (Anal. Biochem. 2010, 404, 56-63)。

分子プローブを固定化した ELISA platform の開発

テラーメイドな A ドメインの創出に向け、設計した基質特異性を有する A ドメインをスクリーニングするシステムを構築することが鍵となる。そこで、迅速、簡便、高感度な ELISA platform の開発を行う (Fig. 1c)。分子プローブのビオチン官能基を利用し、ストレプトアビジンを担持したプレートに分子プローブを固定化する。続いて、NRPS タンパク質と結合反応を行う。分子プローブ/タンパク質相互作用は、一次抗体として抗 His-tag 抗体、二次抗体として西洋わさび由来のペルオキシダーゼ (HRP) を縮合した抗マ

ウス抗体を用いて検出を行う。

A ドメイン変異体の構築

DHB-AMS-biotin 4 に特異的に結合する EntE (A_{DHB}) を用いて変異体の構築を行う。EntE の NRPS code (活性部位を構成しているアミノ酸残基で、基質特異性を決定している 8-10 アミノ酸残基) に、部位特異的な変異導入を行うことにより 9 種類の EntE 変異体の作製を行った。

ELISA platform による活性部位の微細な構造変化の検出

DHB-AMS-biotin 4 および Sal-AMS-biotin 5 を固定化する。続いて、作製した 9 種類の EntE 変異体との結合実験を行う。常法に従い、分子プローブ/タンパク質相互作用の解析を行う。さらに、酵素動力学的パラメーターを算出し、分子プローブへの結合活性と酵素機能 (基質特異性) の関係を明らかにする。

4. 研究成果

A ドメインに対する分子プローブ aminoacyl-AMS-biotin の設計および合成

L-Pro、L-Tyr、DHB および Sal をリガンド部に有する L-Pro-AMS-biotin 2、L-Tyr-AMS-biotin 3、DHB-AMS-biotin 4 および Sal-AMS-biotin 5 の合成は、入手可能なアデノシンから 9 段階で合成を行った。

分子プローブの機能解析

合成した分子プローブ L-Pro-AMS-biotin 2、L-Tyr-AMS-biotin 3、DHB-AMS-biotin 4 は、それぞれ NRPS A ドメインに対して高い阻害能を有していることがわかった (2: $K_i = 6.4 \pm 0.88 \mu\text{M}$ (TycB1: C-A_{Pro}-CP)、3: $K_i = 220 \pm 37 \text{ nM}$ (AusA2: A_{Tyr}-CP-R)、4: $K_i = 13.6 \pm 2.1 \text{ nM}$ (EntE: A_{DHB}))。また、Peg₁₂-biotin 修飾を持たない L-Pro-AMS 7、L-Tyr-AMS 8、Sal-AMS 9 の TycB1、AusA2、EntE に対する阻害定数 (K_i) はそれぞれ $431 \pm 42 \text{ nM}$ 、 $471 \pm 69 \text{ nM}$ 、 $10.7 \pm 2.4 \text{ nM}$ であった。これら結果から、アデノシン骨格の 2' 位水酸基への化学修飾は、分子プローブの A ドメインに対する阻害能に影響を与えないことが明らかとなった (TycB1- L-Pro-AMS-biotin 2 を除く)。

分子プローブを固定化した ELISA platform の開発

ストレプトアビジン/ビオチンの強固な相互作用を利用することで、分子プローブ 1-4 を 96 穴プレートへ固定化した。次に、GrsA (A_{Phe}-CP-E)、TycA (A_{Phe}-CP-E)、TycB1 (C-A_{Pro}-CP)、AusA2 (A_{Tyr}-CP-R)、EntE (A_{DHB}) との結合反応を行った。大腸菌組換えタンパク質の tag 分子を利用し、一次抗体として抗 tag 抗体を、二次抗体として HRP 縮合抗マウス抗体を組み合わせることで、分子プローブ/タンパク質相互作用の特異的検出を行った。

その結果、分子プローブ 1-4 は、リガンド部アミノ酸に基質特異性を有する A ドメインを特異的に検出できることが明らかとなった。すなわち、L-Phe-AMS-biotin 1 は GrsA および TycA を、L-Pro-AMS-biotin 2 は TycB1 を、L-Tyr-AMS-biotin 3 は AusA2 を、DHB-AMS-biotin 4 は EntE のみを特異的に検出可能であった。さらに、本 ELISA 法は、A ドメインを過剰発現させた *E. coli* 抽出液を用いた夾雑系においても特異的に標的を検出できることを確認した。

A ドメイン変異体の構築

EntE の NRPS Code (活性部位を構成しているアミノ酸残基で、基質特異性を決定している 8-10 アミノ酸残基) に、部位特異的変異導入を行うことにより 9 種類の EntE 変異体の作製を行った。すべての EntE 変異体は大腸菌組換えタンパク質 (C 末端ヒスチジン tag) として調製した。

ELISA platform による活性部位の微細な構造変化の検出

DHB-AMS-biotin 4 および Sal-AMS-biotin 5 をプレートに固定化した。続いて、作製した 9 種類の EntE 変異体との結合実験を行い、常法に従い、分子プローブ/タンパク質相互作用の解析を行った。9 種類の EntE 変異体のうち 4 種類は DHB-AMS-biotin 4 ではなく、Sal-AMS-biotin 5 に特異的に結合することが明らかとなった。この結果から、4 種類の EntE 変異体は、本来の基質である DHB ではなく、Sal に基質特異性を有する A ドメインへと酵素機能が改変されていることが予想された。そこで、4 種類の EntE 変異体について速度論的解析を行った。その結果、野生型 EntE と比較して 26-58 倍 Sal に対して基質特異性が高くなっていることが確認できた。分子プローブへの結合と酵素機能 (基質特異性) は良い相関を示すことから、分子プローブを駆使した本 ELISA 法は、A ドメイン変異体ライブラリーから設計した酵素機能を有する A ドメインを取得するための有用な基盤技術となることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

- (1) Fumihiko Ishikawa and Hideaki Kakeya Affinity purification method for the identification of nonribosomal peptide biosynthetic enzymes using a synthetic probe for adenylation domains. *Methods Mol. Biol.* **2016**, 1401, 63-76. 査読有
- (2) Fumihiko Ishikawa and Hideaki Kakeya A competitive enzyme-linked

immunosorbent assay system for adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *ChemBioChem* **2016**, 17, 474-478. 査読有

(3) 石川 文洋

合成小分子化合物群を用いたペプチド性天然化合物合成酵素の選択的ラベル化技術の開発と応用
日本化学会生体機能関連化学部会,
NEWS LETTER, Vol. 30, No. 3, 2-5 (2015. 12)

- (4) Fumihiko Ishikawa, Kengo Miyamoto, Sho Konno, Shota Kasai, and Hideaki Kakeya Accurate detection of adenylation domain functions in nonribosomal peptide synthetases by an enzyme-linked immunosorbent assay system using active site-directed probes for adenylation domains. *ACS Chem. Biol.* **2015**, 10, 2816-2826. 査読有

- (5) Fumihiko Ishikawa, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, and Hideaki Kakeya A multiple-labeling strategy for nonribosomal peptide synthetases using active-site-directed proteomic probes for adenylation domains. *ChemBioChem* **2015**, 16, 2590-2594. 査読有

- (6) Shota Kasai, Sho Konno, Fumihiko Ishikawa, and Hideaki Kakeya Functional profiling of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases by competitive activity-based protein profiling. *Chem. Commun.* **2015**, 51, 15764-15767. 査読有 (Highlighted as a back cover: *Chem. Commun.* **2015**, 51, 15868-15868.)

- (7) Fumihiko Ishikawa, Sho Konno, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, and Hideaki Kakeya Profiling nonribosomal peptide synthetase activities using chemical proteomic probes for adenylation domains. *ACS Chem. Biol.* **2015**, 10, 1989-1997. 査読有

- (8) Fumihiko Ishikawa and Hideaki Kakeya Recent advances in adenylation domain enzymology in nonribosomal peptide biosynthesis. *Curr. Org. Chem.* **2015**, 19, 1204-1221. 査読有

[学会発表](計 9 件)

(1) 石川 文洋

合成小分子化合物群を用いたペプチド

性天然化合物合成酵素の選択的ラベル化技術の開発と応用, 生理化学研究ユニット 第 5 回シンポジウム, 2015 年 12 月, 京都

- (2) Fumihiro Ishikawa, Kengo Miyamoto, Sho Konno, Shota Kasai, and Hideaki Kakeya
Accurate detection and manipulation of adenylation domain functions in nonribosomal peptide synthetases by an enzyme-linked immunosorbent assay system using active site-directed probes for adenylation domains, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (PACIFICHEM 2015), 2015 年 12 月, Hawaii
- (3) Sho Konno, Fumihiro Ishikawa, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, and Hideaki Kakeya
Profiling of nonribosomal peptide synthetase activities using active site-directed proteomic probes for adenylation domains, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (PACIFICHEM 2015), 2015 年 12 月, Hawaii
- (4) 笠井 昭太, 石川 文洋, 掛谷 秀昭
非リボソーム性ペプチド合成酵素の翻訳後修飾を標的とした化学プローブの開発, 第 65 回日本薬学会近畿支部総会, 2015 年 10 月, 大阪
- (5) 石川 文洋, 今野 翔, 笠井 昭太, 鈴木 健裕, 堂前 直, 掛谷 秀昭
合成小分子化合物群によるアデニレシヨンドメインの選択的標識化およびプロファイリングへの展開, 第 9 回バイオ関連化学シンポジウム, 2015 年 9 月, 熊本
- (6) 今野 翔, 笠井 昭太, 石川 文洋, 掛谷 秀昭
活性部位指向型プローブを利用したアデニレシヨンドメインの機能的プロファイリング, 第 9 回バイオ関連化学シンポジウム, 2015 年 9 月, 熊本
- (7) 今野 翔, 石川 文洋, 鈴木 健裕, 堂前 直, 掛谷 秀昭
アデニレシヨンドメインに対する活性部位指向型プローブを用いた非リボソーム性ペプチド合成酵素活性のプロファイリング, 第 15 回日本蛋白質科学会年会, 2015 年 6 月, 徳島
- (8) 笠井 昭太, 石川 文洋, 掛谷 秀昭
非リボソーム性ペプチド合成酵素の担

体タンパク質を標的とした低分子プローブの開発, 日本ケミカルバイオロジー学会・第 10 回年会, 2015 年 6 月, 仙台

- (9) 今野 翔, 石川 文洋, 鈴木 健裕, 堂前 直, 掛谷 秀昭
アデニレシヨンドメインに対する活性部位指向型プローブを利用した非リボソーム性ペプチド合成酵素活性のプロファイリング, 日本ケミカルバイオロジー学会・第 10 回年会, 2015 年 6 月, 仙台

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp//sc-molecules/>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
石川 文洋 (ISHIKAWA FUMIHIRO)
京都大学・生理化学研究ユニット・助教
研究者番号: 50631553