

## 論文審査の要旨及び担当者

### 論文題名

環状型ペプチド性抗生物質の大環状化に関与するメタロプロテアーゼの構造的な研究

### 論文審査の要旨

#### 1. 論文の要旨

微生物が産生するペプチド性の抗生物質は、非リボソーム翻訳系ペプチドとリボソーム翻訳系翻訳後修飾ペプチド (RiPPs: Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides) に分類される。RiPPs 生合成系は一般的に、前駆体ペプチド、翻訳後修飾を担う酵素群、最終産物を輸送するためのトランスポーターのそれぞれをコードする遺伝子で構成される生合成遺伝子クラスターとして存在し、前駆体ペプチドがリボソームによって翻訳されることで生合成が開始される。前駆体ペプチドはリーダーペプチドとコアペプチドからなり、リーダーペプチドは翻訳後修飾を担う酵素との相互作用に関与し、コアペプチドに様々な翻訳後修飾が導入された後に除去されることで、最終的な RiPPs が産生される。このような特徴から、ゲノム情報を利用して RiPPs 生合成遺伝子クラスターの存在、化学構造、翻訳後修飾を予想することが可能であるため、RiPPs 生合成系は、新規抗生物質の発見や開発あるいは関連する生合成酵素の高機能化や基質特異性の改変といった点で注目を集めている。

Subtilosin A (サブチロシン) は *Bacillus subtilis* 168 株から産生されるサクチペプチドに分類されるバクテリオシンであり、3 対の分子内チオエーテル架橋と、コアペプチドの N 末端・C 末端間でのペプチド結合形成による大環状化という構造的な特徴を持つことが報告されている。サブチロシンの生合成は、まず *sbo* 遺伝子から前駆体ペプチドが生合成されることで始まり、リーダーペプチド依存的に AlbA タンパク質によってコアペプチド領域に分子内チオエーテル架橋形成が形成された後、AlbE あるいは AlbF タンパク質によるリーダーペプチドの切断およびコアペプチドの大環状化を経て、最終的に ABC トランスポーター AlbC によって細胞外へと分泌されることで完了すると考えられている。

AlbE および AlbF タンパク質はそのアミノ酸配列から M16B メタロプロテアーゼファミリーに属すると予想されている。サブチロシン以外に大環状化バクテリオシンはいくつか報告されているが、これらの大環状化に関与するのは膜タンパク質やセリンプロテアーゼであり、生合成遺伝子クラスター内には M16B メタロプロテアーゼと推定されるタンパク質をコードする遺伝子は報告されていない。したがって、サブチロシン生合成系にみられるメタロプロテアーゼを利用した大環状化の反応機構については、リーダーペプチド切断と大環状化の反応順序も含めて未解明である。

本論文提出者は、これまでに立体構造が報告されていない AlbE、AlbF タンパク質に関する

構造生物学的研究を行うことを目的として、*B. subtilis* 168 株由来の AlbE、AlbF タンパク質の相同タンパク質である中度好熱菌 *Quasibacillus thermotolerans* 由来の AlbE および AlbF ホモログを用いた X 線結晶構造解析を行った。そして構造解析の結果から、これら 2 つのタンパク質がヘテロ二量体を形成し基質サブチロシン前駆体を結合するチャンバーを構築すること、基質結合チャンバーは基質との相互作用に適したサイズを持つこと、静電的相補性によって結合する基質の向きが規定されること、サブチロシン前駆体のリーダーペプチドが結合しうるチャンネルが存在することを明らかにした。また、これらの構造基盤から AlbEF タンパク質複合体によるサブチロシン前駆体のリーダーペプチド切断および大環状化の反応機構を提案した。

本論文は、第一章「序論」、第二章「材料および実験方法」、第三章「結果・考察」により構成されている。

第三章 第一節では、構造解析のターゲット選択について述べられている。*B. subtilis* 168 株由来の AlbE、AlbF タンパク質を大腸菌において発現させた場合、可溶性画分への回収量が非常に少なかったため、他の生物種由来の AlbE および AlbF ホモログへと標的を変更することとした。本論文提出者は、*B. subtilis* 168 株のサブチロシン生合成遺伝子クラスターを基にしたデータベース検索を行い、複数の生物種においてサブチロシン生合成遺伝子クラスターが保存されていることを見出した。そしてその中から、生育温度が比較的高い中度好熱菌に分類される *Q. thermotolerans* 由来の AlbE および AlbF ホモログ (Qt-AlbE および Qt-AlbF タンパク質) を研究対象として用いることとした。

第三章 第二節では、組換えタンパク質の発現条件検討および精製方法について述べられている。本論文提出者は、大腸菌内での Qt-AlbE および Qt-AlbF タンパク質の共発現系を構築した。さらに、発現条件を検討した結果、発現誘導剤を添加しない場合に可溶性画分へ Qt-AlbE および Qt-AlbF タンパク質を回収することができることを明らかにした。タンパク質の精製は Ni アフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過の二段階で行った。共発現させた Qt-AlbE および Qt-AlbF タンパク質のうち片方 (Qt-AlbE) にのみ His タグを付加しているにもかかわらず Ni アフィニティー精製で共溶出されたこと、ゲル濾過においても共溶出されたことから、両者は複合体を形成していることが示唆された。さらにゲル濾過の溶出体積から Qt-AlbE および Qt-AlbF タンパク質はヘテロ二量体 (Qt-AlbEF) を形成していると結論付けた。

第三章 第三節では、Qt-AlbEF タンパク質の結晶化および構造決定について述べられている。本論文提出者は、Qt-AlbEF タンパク質について結晶化条件のスクリーニングを行い、条件を最適化することで、再現性良く結晶を得た。つづいて放射光施設での X 線回折実験により最高で 1.98 Å 分解能の回折強度データを収集した。既知の類似構造を用いる分子置換法では初期位相は決定できず、白金誘導体結晶を用いた単波長異常分散法により初期位相を決定することに成功した。このことは、Qt-AlbEF タンパク質の立体構造が既知の類似タンパク質の構造とは異なることを示唆している。

第三章 第四節では、野生型 Qt-AlbEF タンパク質の結晶構造について述べている。Qt-AlbEF タンパク質は非活性サブユニット (Qt-AlbE) と活性サブユニット (Qt-AlbF) で構成されるヘテロ二量体であることが結晶構造解析からも裏付けられた。本論文提出者は、Qt-AlbEF タ

ンパク質の全体構造がアミノ酸配列から予想されたように M16B メタロプロテアーゼと同様のクラムシェル構造をとり、本研究において決定した結晶構造は基質結合チャンバーが開いたオープン型構造であることを明らかにした。また、照射した X 線の波長に依存した異常散乱シグナルと実験条件から総合的に判断して、Qt-AlbF タンパク質の亜鉛結合モチーフに配位された金属イオンはニッケルイオンであると推定した。

第三章 第五節では、不活性型変異体の結晶構造と野生型構造との相違について述べている。本論文提出者は、Qt-AlbF タンパク質に含まれる亜鉛結合モチーフにアラニン変異を導入し不活性型変異体タンパク質を取得した。野生型タンパク質と同様の手法で変異体タンパク質を調製した上で、その結晶構造を決定し、変異導入および金属イオンが結合していないことを電子密度から確認した。また、変異体タンパク質は、全体として野生型タンパク質と同じ立体構造をとっているものの、両者間で局所的な構造の差異が認められ、この構造変化は Qt-AlbEF タンパク質におけるオープン型とクローズ型の間の構造変化にも関連することが示唆された。

第三章 第六節では、Qt-AlbEF タンパク質と他の M16B メタロプロテアーゼとの構造比較について述べている。本論文提出者は、Qt-AlbEF タンパク質における基質結合チャンバーが他の M16B メタロプロテアーゼよりも浅いことを見出した。また、これらのタンパク質は共通して N 末端側のドメイン 1、C 末端側のドメイン 2 で構成されており、非活性サブユニットのドメイン 1 におけるβシートを構成するβストランドのトポロジーが Qt-AlbE タンパク質とその他のタンパク質で異なっていること、活性サブユニットのドメイン 2 におけるβシートでは Qt-AlbF タンパク質はその他のタンパク質よりも構成するβストランドが少なくなっていることを明らかにし、これらの構造的特徴が Qt-AlbEF タンパク質の浅い基質結合チャンバーをもたらしていると推定した。この他、Qt-AlbEF タンパク質の基質結合チャンバー表面は、Qt-AlbE タンパク質に由来する正に帯電した領域と、Qt-AlbF タンパク質に由来する負に帯電した領域を合わせもつことを見出し、サブチロシン前駆体表面においても正・負に帯電した領域が存在することから、静電的相補性によって酵素-基質複合体が形成されることが示唆された。さらに、既知のクローズ型の M16B メタロプロテアーゼ構造から、酵素活性部位から分子表面に向かうチャンネルを見出し、このチャンネル形成に重要と考えられるアミノ酸残基の保存性から、Qt-AlbEF タンパク質においても同様のチャンネルが存在し、Qt-AlbEF タンパク質によって切断されたサブチロシン前駆体のリーダーペプチドがこのチャンネルを通して排出されることを予想した。

第三章 第七節および第八節では、サブチロシン生合成に関わる AlbEF タンパク質の特徴について述べた上で、本論文全体を総括している。Qt-AlbEF タンパク質と構造類似性の高いタンパク質には機能が未知のものがあり、それらはいずれも RiPPs 生合成遺伝子クラスターに属していなかったことから、本論文提出者は決定した Qt-AlbEF タンパク質の結晶構造が、サブチロシン生合成に関与するメタロプロテアーゼとして最初の報告であるとした。また、上述の Qt-AlbEF タンパク質に見られる構造的特徴をもたらすアミノ酸残基は他の AlbEF ホモログにおいても保存されていることから、Qt-AlbEF タンパク質の立体構造から提案したリーダーペプチド切断および大環状化機構は AlbEF 共通のものであると結論付けた。

本論文提出者は、大環状化ペプチド性抗生物質であるサブチロシンの生合成酵素で、サブチ

ロシンのリーダーペプチド切断反応と大環状化反応を触媒する AlbE および AlbF タンパク質について構造生物学的研究を行った。その結果、M16B メタロプロテアーゼファミリーに属する AlbEF ヘテロ二量体作り上げる基質結合チャンバーの構造的特性やサブチロシン前駆体のリーダーペプチド領域の結合が予想されるチャンネルの存在から、AlbEF タンパク質によるリーダーペプチド切断および大環状化反応機構を提案するに至った。これまでに大環状化酵素としてはたらくメタロプロテアーゼの立体構造の報告はなく、今回の研究で明らかとなった酵素基質結合様式は新たな環状ペプチド性抗生物質の創製にも繋がる重要な成果である。

## 2. 審査の方法、内容の評価、結論

本論文は、令和3年12月に提出され、上記3名の論文審査担当者がそれぞれ査読した。さらに、令和4年3月11日午後3時から学習院大学理学部南7号館4階会議室で公聴会を開催し、当該論文の内容およびこれに関するペプチド性抗生物質、タンパク質のX線結晶構造解析、酵素の構造機能相関等の学識について、質疑応答形式による審査を行なった。また、公聴会後に論文審査担当者3名から生命科学全般にわたる学力について口頭試験を実施し、学位申請者である石田航基君の学力について詳細に審査した。

本論文は、環状ペプチド性抗生物質であるサブチロシン A 生合成に関与する AlbE および AlbF タンパク質の立体構造を決定し、基質結合ならびに触媒反応機構に関わる構造基盤を明らかにした。これらの結果は、生理的条件下でのプロテアーゼによるペプチド結合形成という特徴的な反応に関する知見が得られた点で重要であり、新たな環状ペプチド性抗生物質の創製などの応用研究にも貢献しうる成果である。

以上を総合し、本論文は博士の学位論文として十分な内容があり、3名の論文審査担当者は一致して、本学位申請者に博士（理学）の学位を授与するにふさわしいと認めた。

論文審査主査	菱田 卓	教授
	岡田 哲二	教授
	柳 茂	教授