

博士論文

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

学習院大学大学院 自然科学研究科

生命科学専攻 博士後期課程

石田 航基

Contents

Abstract.....	1
1. Introduction.....	3
2. Materials and Methods.....	16
2-1. Materials	16
2-1-1. 発現用大腸菌、遺伝子関連.....	16
2-1-2. 培養に用いる培地.....	18
2-1-3. タンパク質精製に用いる buffer	18
2-1-4. ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に用い る buffer および試薬.....	19
2-2. Methods	21
2-2-1. Qt-AlbEF 野生型の発現検討	21
2-2-2. Qt-AlbEF の野生型と変異体の発現と精製	21
2-2-3. タンパク質の結晶化と X 線回折実験	22
2-2-4. 構造決定と精密化.....	22
2-2-5. SDS-PAGE と CBB 染色	25
3. Results and Discussion	26
3-1. AlbE および AlbF のホモログ探索.....	26
3-2. Qt-AlbEF の発現検討と精製	31
3-3. Qt-AlbEF の結晶化と構造決定	35
3-4. Qt-AlbEF 野生型の結晶構造	37
3-5. Qt-AlbEF 変異体の結晶構造	45
3-6. Qt-AlbEF と他の M16 亜鉛プロテアーゼとの構造比較.....	50
3-7. サブチロシン生合成に関わる AlbEF の特徴.....	66
3-8 総括.....	69
4. References.....	71

Abstract

【序論】

Subtilosin A (サブチロシン A) は *Bacillus subtilis* 168 株によって産生されるサクチペプチドと呼ばれるグループに分類されるバクテリオシンの一種である。サブチロシンは主にグラム陽性細菌に対して抗菌活性を示す。サブチロシンは、サクチペプチドの特徴であるシステイン残基と対応するアミノ酸残基の α 炭素間に形成されるチオエーテル架橋に加えて、他のサクチペプチドでは見られない、N 末端と C 末端の間でのペプチド結合形成によって全体として大環状化しているという特徴を有する。この大環状化にはサブチロシン生合成遺伝子クラスターに含まれるプロテアーゼ AlbE および AlbF が関与していることが示唆されているが、そのプロテアーゼに関する構造的情報あるいはプロテアーゼによる大環状化の反応機構については不明である。

本研究においては、*B. subtilis* 168 株のサブチロシン生合成遺伝子クラスターのアミノ酸配列に基づく BLAST 検索によって、*Bacillus* 属だけでなく、*Staphylococcus* 属などの細菌においても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。また、サクチペプチドの中でも珍しいサブチロシンにおける N 末端と C 末端の間でのペプチド結合による大環状化機構を明らかにするために、構造解析に適したホモログタンパク質を用いて大環状化に関与するプロテアーゼの構造研究を行った。

【方法】

BLAST 検索により見出した AlbE および AlbF ホモログについて、組み換えタンパク質を得るために人工遺伝子を合成し、N 末端にヘキサヒスチジンタグを融合した形でタンパク質を発現するように作製したプラスミドを用いて大腸菌 BL21(DE3)株を形質転換した。TB 培地を用いて 37°C で発現誘導無しに 24 時間の培養を行うことで目的タンパク質を発現させた後、Ni-NTA Superflow 樹脂を用いたアフィニティー精製とゲルろ過によって高純度に精製した。この精製タンパク質試料を用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法によって結晶化を行った。

得られた結晶を用いて、放射光施設 Photon Factory のビームラインにおいて 100 K の窒素気流下で X 線回折測定を行い、白金原子を含む重原子誘導体から得られた回折データを用いた単一波長異常分散法によって初期位相を決定し、構造精密化を行った。

【結果・考察】

BLAST 検索により見出されたサブチロシン生合成遺伝子クラスターにおいて、サブチロシン前駆体、ラジカル SAM 酵素、ABC トランスポーターは高いアミノ酸配列同一性を示すことが明らかになった。また、いくつかの種においては自己免疫膜タンパク質をコードする遺伝子を欠いており、ABC トランスポーターなどが自己免疫膜タンパク質の役割を代替していることが示唆された。

タンパク質の発現検討では、発現誘導無しで 24 時間の培養を行った時に最も多くの可溶性タンパク質を得ることができた。ゲルろ過による分析の結果、AlbE ホモログおよび AlbF ホモログはヘテロ二量体 (AlbEF ホモログ複合体) を形成していることが示唆された。AlbEF ホモログ複合体の野生型および不活性型変異体の結晶構造はそれぞれ 1.98 Å ならびに 2.10 Å 分解能で決定した。活性部位に結合した金属イオンは X 線異常散乱の測定から亜鉛原子ではなく、ニッケル原子であることが示唆された。金属結合に関わるヒスチジン残基をアラニン残基に置換した不活性型変異体では、金属イオンは結合できなくなり、それにとまって活性部位周辺の構造が変化することが分かった。

結晶構造に基づく相同性検索の結果から、AlbEF ホモログ複合体は M16B 亜鉛プロテアーゼと相同性を示すことが明らかになった。他の M16B 亜鉛プロテアーゼとの比較から、AlbE ホモログについては全体的な三次構造は類似しているが二次構造のトポロジーが異なること、AlbF ホモログについては β ストランドが一部欠失していることなどが明らかになった。加えて、基質結合ポケットは他のプロテアーゼと異なり、広く浅いポケットを形成し、AlbE 側は正に AlbF 側は負に帯電していることが判明した。このこととサブチロシン前駆体における表面電荷の偏りを考え合わせて、静電的相互作用が酵素と基質との相互作用に重要な役割を果たすことが示唆された。

本研究において、サブチロシン生合成に関与するプロテアーゼとして初めて AlbEF ホモログ複合体の結晶構造を決定し、その構造情報から生体環境におけるプロテアーゼによるペプチド結合形成反応に対する新たな知見を得ることができた。

1. Introduction

自然界の生存競争において、いくつかの微生物は自身が合成した化学物質を分泌することによって近縁種や他種の成育を阻害するような戦略を採用している。これらの化学物質には人類が利用可能な物質が多くある。例えば 1920 年代にアレキサンダー・フレミングが青カビ (*Penicillium noctum*) からペニシリンを単離し、これは人類において最初に発見された抗生物質として知られている¹。乳酸菌の一種である *Lactococcus lactis* から単離されたペプチド性抗生物質のナイシンについては、フィルミクテス門の細胞膜の脂質IIやペプチドグリカンに作用し細胞膜に穴を開けたり、細菌の細胞壁合成を阻害したりすることによる静菌作用があり^{2,3}、人体への毒性がないという特性から、食品の寿命を延ばすための天然の食品保存料としての利用がアメリカの FDA や WHO によって認可されている⁴。細菌が産生する抗生物質の中でも、フィルミクテス門のみに作用するナイシンのような、同種あるいは近縁種に対して抗菌活性を示すペプチド性抗生物質はバクテリオシンと呼ばれる⁴。バクテリオシンはペニシリンを始めとする広域抗生物質とは異なり、抗菌スペクトルが狭いため、薬剤耐性菌を生じさせにくいと考えられている。

生物の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 (NRPs: Non-ribosomal peptides)⁵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)⁶の2つのグループに大きく分類される。RiPPs 生合成系は一般的に、前駆体ペプチドをコードする遺伝子、翻訳後修飾を行う仕立て酵素をコードする遺伝子、最終産物を輸送するためのトランスポーターをコードする遺伝子を典型的なセットとし、DNA 上に遺伝子クラスターとして存在することが多い。実際の RiPPs 生合成は、前駆体ペプチドがリボソームによって翻訳されることから始まる。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、主にリーダーペプチドは翻訳後修飾を行う仕立て酵素との相互作用に関与し、仕立て酵素はコアペプチドに様々な翻訳後修飾を導入する。コアペプチドに翻訳後修飾が導入された後、リーダーペプチドは RiPPs 生合成遺伝子クラスター内に含まれるプロセッシングプロテアーゼあるいは別の非特異的プロテアーゼによって除去され、最終的な RiPPs が産生される。最終産物は、RiPPs 生合成遺伝子クラスター内に含まれるトランスポーターあるいは別のトランスポーターによって細胞外へと輸送される (図 1)。

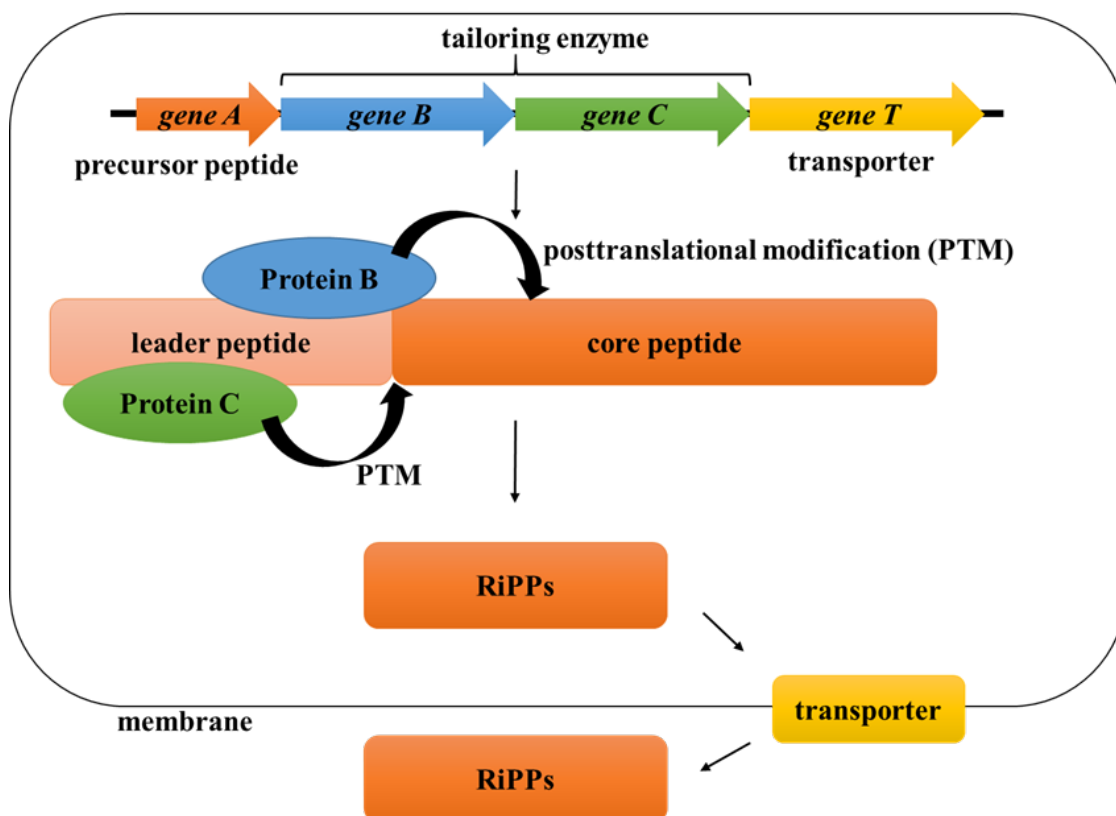


図 1. RiPPs 生合成遺伝子クラスターと成熟の概略図

各遺伝子はオレンジ色、青色、緑色、黄色の色付きの矢印で示され、*gene A* は前駆体ペプチドをコード、*gene B* および *gene C* は仕立て酵素をコード、そして *gene T* はトランスポーターをコードしていることを表している。各ペプチドあるいはタンパク質は四角あるいは楕円で示され、遺伝子の色と対応している。

このような特徴を利用し、ゲノム情報から 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仕立て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。

RiPPs はその最終的な化学構造から、ランチペプチド、ラッソペプチド、サクチペプチドなどいくつかのファミリーに分類される。ランチペプチドは、ランチオニン (Lan) やメチルランチオニン (MeLan) と呼ばれる分子内チオエーテル架橋によって形成される多環構造を持つ (図 2)。

引用文献 6 の図 2A および図 4 参照

図 2. ランチペプチドの一次構造⁶

(上) Nisin は *Lactococcus lactis* 由来のランチペプチドであり、セリンとスレオニンから脱水を受けたデヒドロアラニンとデヒドロブリチリンをそれぞれ緑色と紫色で表している。赤色で示されたセリンあるいはスレオニンと青色で示されたシステインの間にランチオニンあるいはメチルランチオニン架橋が生じている。(下) Duramycin は *Streptomyces griseoluteus* 由来のランチペプチドであり、赤色と青色のアミノ酸間でランチオニン (Ala-S-Ala) あるいはメチルランチオニン (Abu-S-Ala) 架橋が示されている。オレンジ色で示されているのは、Duramycin などが有する追加の翻訳後修飾である β ヒドロキシ化アスパラギン酸とリシノアラニン架橋である。

ラッソペプチドは、N 末端アミンと下流の 7-9 位における Asp/Glu 残基の側鎖との間のイソペプチド結合によって形成された環内に、C 末端テール領域が貫通されることによって形成される特徴的な投げ縄構造を持つ (図 3)。サクチペプチドは、Cys 残基と様々なアミノ酸の α 炭素との間にチオエーテル架橋を有する環状構造を持つ (図 4)。このような多種多様な化学構造の形成反応は、翻訳後修飾酵素によって触媒される。

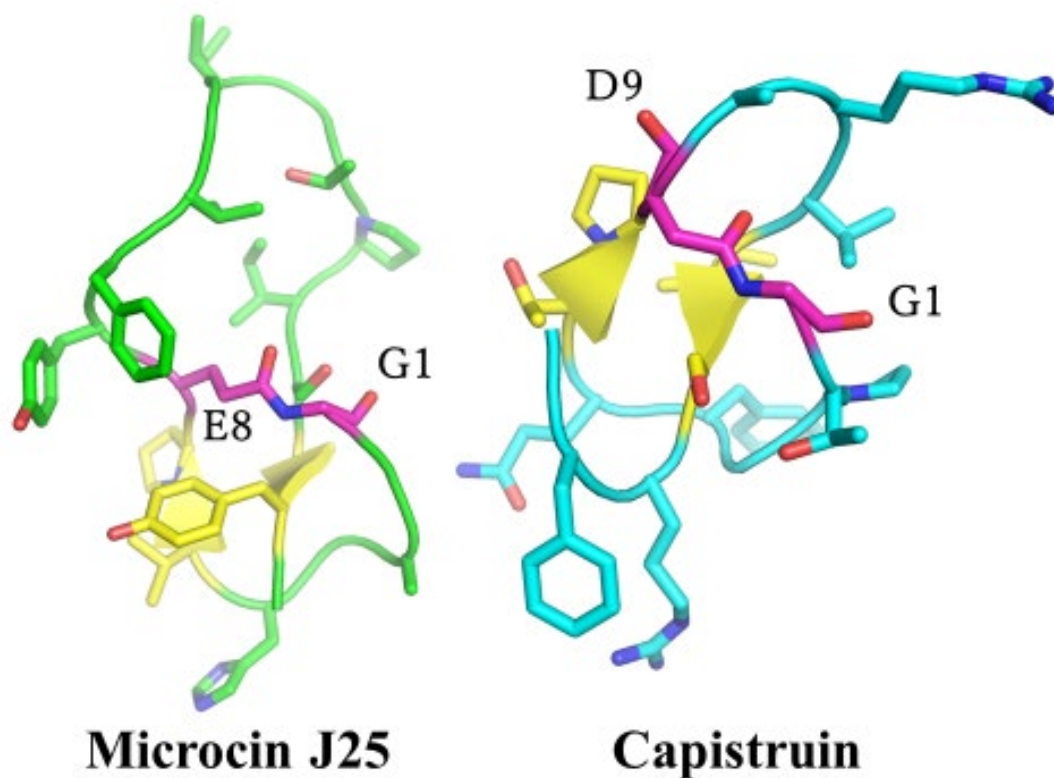


図3. ラッソペプチドである Microcin J25 (左) および Capistrucin (右) の NMR 構造⁶
 紫色で N 末端グリシンのアミノ基とその下流 8 あるいは 9 アミノ酸の位置にあるグルタミン酸あるいはアスパラギン酸の側鎖とのイソペプチド結合を示している。β ストランドは黄色で示されている。

引用文献 7 の図 1B 参照

図 4. サクチペプチドの一次構造⁷

各々のサクチペプチドの一次構造。リーダーペプチド領域は灰色で示され、コアペプチド部分はシアン色で色づけられている。チオエーテル架橋は赤色で、ジスルフィド結合は紫色で示されている。N 末端と C 末端が結合しているものは青の破線で表示されている。

Subtilisin A (サブチロシン A) は枯草菌 *Bacillus subtilis* 168 株から産生される、サクチペプチドに属するバクテリオシンである。サブチロシンはグラム陽性細菌に対して抗菌活性を示し、Cys4、Cys7、Cys13 の側鎖チオール基と Phe31、Thr28、Phe22 の α 炭素との間で3対の分子内チオエーテル架橋が形成され、さらに N 末端 Asn1 と C 末端 Gly35 の間のペプチド結合によって全体として大環状化 (以下、N/C 大環状化) した構造をとることが報告されている^{8,9} (図 5)。サブチロシンの生合成は前駆体ペプチドをコードする遺伝子 *sbo* から前駆体ペプチドが生合成され、その前駆体ペプチドに対して [4Fe-4S] クラスタを含むラジカル *S*-アデノシルメチオニン酵素 AlbA がリーダーペプチド依存的に分子内チオエーテル架橋形成を触媒する¹⁰。次に AlbE あるいは AlbF と呼ばれるタンパク質がリーダーペプチドの切断反応およびコアペプチド領域の大環状化反応を触媒すると予想されている。最終的に産生されたサブチロシンは ABC トランスポーター AlbC によって細胞外へと分泌される¹¹⁻¹³ (図 6)。

Subtilisin A

引用文献 14 の図 1A 参照



図 5. Subtilisin の一次構造 (上)¹⁴ と NMR 構造 (下)

N 末端のアスパラギンと C 末端のグリシンはペプチド結合によって繋がっている。Cys4、Cys7、Cys13 の側鎖と Phe22、Thr28、Phe31 の α 炭素原子の間でチオエーテル結合が生じている。NMR 構造は Pymol によって表示した。Thr28 から Gly35 までは α ヘリックスを形成している。

引用文献 10 の図 3 参照

図 6. サブチロシンの成熟過程の概略図¹⁰

黒色の矢印は前駆体ペプチドをコードする *sbo* 遺伝子、赤色は Radical SAM 酵素をコードする *alba* 遺伝子、青色は膜タンパク質をコードする *albB*、*albC*、*albD* 遺伝子、緑色は M16B 亜鉛メタロプロテアーゼをコードする *albE* 遺伝子ならびに *albF* 遺伝子を表している。*sbo* 遺伝子から転写・翻訳された前駆体ペプチド Sbo には、リーダーペプチド依存的な Alba の触媒反応により分子内チオエーテル架橋が形成される。続いて AlbE あるいは AlbF によってリーダーペプチドのプロセッシングと大環状化が進行し、最終的に成熟した Subtilosin は AlbC によって細胞外へと輸送される。

サブチロシンにみられる N 末端と C 末端の間で形成されるペプチド結合による大環状化は、サクチペプチドの中でも特徴的であり、現在までに他のサクチペプチド (thuricin CD, thurincin H, sporulation killing factor, thermocellin, streptosactin) では報告されていない^{7,15,16} (図 7)。また、遺伝子クラスター内にプロテアーゼをコードする遺伝子は存在するものの AlbE あるいは AlbF に相同的なタンパク質を有する遺伝子クラスターは他にはない。枯草菌を用いた遺伝学的実験において、AlbE 欠損株ではサブチロシンの産生能の減少、AlbF 欠損株ではサブチロシンの産生能の消失が報告されており¹¹、このサブチロシンに特有な N/C 大環状化は AlbE あるいは AlbF によって触媒されていると考えられているが、その詳細までは明らかになっていない。

AlbE および AlbF はそのアミノ酸配列から M16B 亜鉛メタロプロテアーゼファミリーに属すると考えられ、ペプチダーゼデータベースである MEROPS¹⁷ では AlbF は M16B ファミリーに分類されている。M16 ファミリーのメタロプロテアーゼは、共通した亜鉛イオン結合モチーフ (HxxEH) を有しており、クラムシェルと呼ばれる構造によって形成される巨大な触媒チャンバーに基質を包含する^{18,19}。M16 ファミリーは 3 つのサブファミリーに分類されており²⁰ (図 8)、M16A および M16C サブファミリーは配列相同性が低いものの非常に類似した構造を有する一本鎖から成るメタロプロテアーゼである。一方で M16B サブファミリーは活性の無いサブユニットと保存された亜鉛イオン結合モチーフを有するサブユニットのヘテロ二量体を形成し機能することが知られている²⁰。M16B サブファミリーもまた、M16A あるいは M16C サブファミリーとの配列相同性は高くないが、その立体構造は非常に類似している。

引用文献 7 の図 1A 参照

図 7. サクチペプチドの遺伝子クラスターの構成の概略図⁷

各々の遺伝子クラスターの概略図。シアンで前駆体ペプチド、赤で Radical SAM 酵素、青でプロテアーゼ、黄色でトランスポーター、マゼンタでチオレドキシン、灰色でその他のタンパク質を表示している。

引用文献 21 の図 1A 参照

図 8. M16 メタロプロテアーゼサブファミリーの模式図²¹

M16A および M16C メタロプロテアーゼは共に 4 つのドメインから構成され、D2 と D3 の間に長さの異なるリンカーを有する。M16B メタロプロテアーゼはそれぞれ 2 つのドメインから構成される 2 本鎖のタンパク質複合体として機能する。Zn²⁺ は保存された亜鉛結合モチーフの位置を示している。

上記のことから、サブチロシン前駆体からのリーダーペプチドの除去ならびにコアペプチドの大環状化には、AlbE あるいは AlbF がヘテロ二量体を形成し関与すると予想されるが、プロテアーゼによるペプチド結合反応は生体環境下では珍しく、またペプチド結合の切断とペプチド結合反応を連続して行う機構は不明である。AlbE あるいは AlbF のアミノ酸配列から構造既知のタンパク質を検索すると、AlbE については *Enterococcus faecalis* 由来のペプチダーゼ M16C ドメイン含有タンパク質 (PDB code 3D3Y) が 16.9% のアミノ酸配列同一性を示す。一方で AlbF については *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *acidocaldarius* DSM 446 由来のペプチダーゼ M16 ドメインタンパク質 (PDB code 4XEA) が 18.2% のアミノ酸配列同一性を示す (図 9)。このようにアミノ酸配列の同一性が高いタンパク質の立体構造報告例がないため、既知のタンパク質構造から AlbE および AlbF の前駆体ペプチドに対する機能を推定することは困難である。

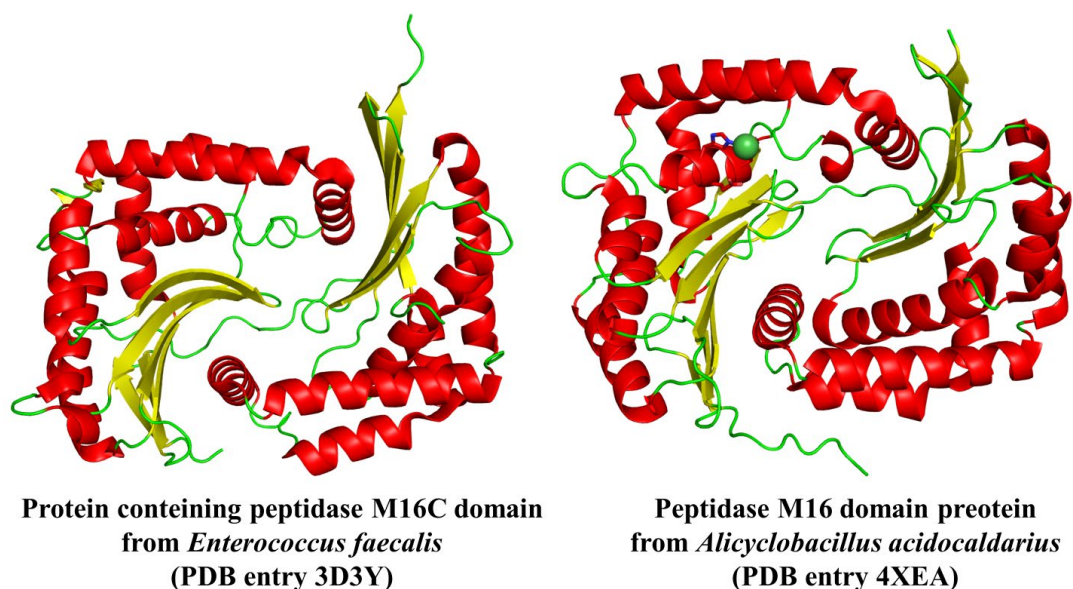


図 9. *B. subtilis* 由来の AlbE および AlbF に相同的なタンパク質の結晶構造
タンパク質はリボンモデルで表示されており、 α ヘリックスは赤色、 β シートは黄色、そして二次構造を持たないループ領域は緑色で示されている。(左) *E. faecalis* 由来のメタロプロテアーゼ (PDB code 3D3Y)。(右) *A. acidocaldarius* 由来のメタロプロテアーゼ (PDB code 4XEA)。

サクチペプチド以外においても N/C 大環状化バクテリオシンはいくつか報告されているが、それらの生合成遺伝子クラスター内に M16B 亜鉛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おらず、AS-48^{22,23}、Circularin A^{24,25}、そして Uberolysin²⁶ では機能未知の膜タンパク質である As-48b、CirC、そして UblB がそれぞれ N/C 大環状化を触媒していると考えられている。また、シアノバクテリアである *Prochloron didemni* および真菌である *Amanita phalloides* から産生される patellamide²⁷ と α アマニチン²⁷ に関しては、その N/C 大環状化にセリンプロテアーゼが関与していることが報告されており、patellamide 生合成系におけるセリンプロテアーゼ PatG タンパク質の結晶構造やその環化反応機構が報告されている²⁸⁻³⁰。PatD や PatA タンパク質によって翻訳後修飾が導入され、リーダーペプチドが切断された patellamide 前駆体に対して、一般的なセリンプロテアーゼと同様に PatG タンパク質の触媒セリン残基の側鎖酸素原子が patellamide 前駆体の C 末端領域に存在する AYD 配列の N 末端側のカルボニル炭素を求核攻撃する。続いて形成されたアシル酵素中間体に対して水分子ではなく、脱プロトン化した N 末端がアシル酵素中間体のカルボニル炭素を求核攻撃することで C 末端側 5 残基が除去されることにともない、N 末端と C 末端のペプチド結合が形成され则认为られている (図 10)。すなわち、PatG によって patellamide 前駆体ペプチド C 末端とそのペプチド分子内の N 末端とがペプチド結合を形成する。一方で、サブチロシン A においてはリーダーペプチドの切断は N 末端側のみであり、このリーダーペプチドが無くなることで露出した N 末端と、C 末端が直接ペプチド結合によって大環状化することから、patellamide 生合成系で推定された反応機構ではサブチロシン A の N/C 大環状化を説明できない。

引用文献 31 の図 6 参照

図 10. PatG プロテアーゼによる大環状アミド結合形成反応の模式図³¹

本研究では、これまでに立体構造が報告されていない AlbE、AlbF タンパク質の構造生物学的研究を行うことを目的として、当初は *B. subtilis* 168 株由来の AlbE、AlbF タンパク質の構造解析を目指した。しかしながら、可溶性画分への発現が十分でなかったことから、他の生物種由来の AlbE および AlbF ホモログを用いて構造解析を試みることとした。そこで、サブチロシン生合成遺伝子クラスターを基にした BLAST 検索を行い、20~65°C で生育可能な中度好熱菌に分類される *Quasibacillus thermotolerans*³² 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 *Q. thermotolerans* 由来の AlbE および AlbF ホモログを用いた X 線結晶構造解析により、AlbE および AlbF のヘテロ二量体形成を明らかにするとともに、他の M16A、M16B、M16C 亜鉛メタロプロテアーゼとは異なる立体構造的特徴に焦点をあてて議論する。

2. Materials and Methods

2-1. Materials

2-1-1. 発現用大腸菌、遺伝子関連

・発現用大腸菌

BL21(DE3)

・遺伝子

Qt-albE

Qt-albF

いずれの遺伝子も大腸菌の使用コドンに最適化した配列にてユーロフィンジェノミクス株式会社にて人工遺伝子の合成を依頼した。

> *Qt-albE* 塩基配列

```
ATGGACATCAAAATTAATGGCATCAAGAAATACACCATACACGTGTTAGCCAAAGTTAGCGCATCTGGTAT
GGAGTTTACCCAGGAGAAAGACTTCGAACATCAGCTGCTTTTGACTGATATGCTGGAAACGGTAATTCGT
AAAAGTGTGGAAGTGAATCCCGTACTGCATTTTCATCTGCGCAAAAGCATCATTATGAACCACTCTTACTT
CATTCTGGGACTCAACTATATTCCACCTGCGTTTGCCACGAAGAACGTCAAATCAATTCACGAGATTACC
AAGCGATACAGGATGTTAACGATCTCCAATTGCTCGATGAATTTGAGAAAAGCAAAGAGAAACTTATCAA
CAAGATCCAGCAATACAAACATAGCGATTTCGCATAGCGGGAGTATTTCGCCTGAAAGATCGCTTATTCGCT
GACAAAAAGTATGGCTCAGATCGTCTGGGGAACTTTGAAAAGATGAACAAGATTACCGATAATATCATCT
ATGCAGCTCCGGATATGGTCAATAAAATCTGTGAAGGCGATGGTCTGTTCTACCACATTAATGATGGAGCG
ATACATATCAGCAACATCAAAGATTTCAACTACTATATCCCGGCAGTGATTAATGAAGGCGTCGAAGACAT
CCGAACGGATTTCTCCAAAGAATACAGCATTCTGACTTGCGCGTATACGTTTGAGCACGTTACAGACCTG
GAACGTGAAATCCTGATCCCGATGTTTGATGGGTATATTGGCAAATATGGTCATTCTGTCCTCTTTAAACC
CTTCGTCTGGTTGATGAAAACTTATACCACATCAGTTTCGCATTATGACCAGGAGAGCAATCTGCTGTTTCA
TACCGTGTATGCTCCAAAAATCAGTTGTCGACGATTCTAACCAAAATTCAGCATACAATTGAATCGATTG
AATTTGACTCCGTGAGTTTTTCACTGTCTAAGGTGATGTTTGAAAACGAATCACGCTTTTCGTTTCGAAGAT
ATCAACGGTCTGCTTAGTCACGTGATCAAACAACATGGTGAGTATAAAAAATCCGGAATCGTTTCTGAAAG
CGATTCAGAACACTGACATTGCCGACTTCTATCGCTTGAAAGCCAATATGCGGTGGGTGGCACCTCCAT
TGTAGAAGGTGGCTAA
```

> *Qt-albF* 塩基配列

ATGCTGAACAAATCGTTTGTGAAGAAGCTGGATGAATCTCTGAACCGCAAACAAGTCGGATCGACCAAC
GTGACACGGTACAAAATCGAAGATTCGTATCTGGTGTTAGCGGCAGTTCGCGTCGGTATCGGAGGCCTGA
CCTATCATAATGGTGCCGCGCATTTTCCTGGAACATTTGAAATTTGGCGTTATGGCGAGAATATTTACAAC
TATTCTTTCAACGTGGGGCCATTCTGAATGCGTACACAACCTTTGGAATTCACCGATTATGTGTTCTCAGC
AAAGAAGAGAGCATCAACGAAAACCTGAACTGTTGCTGACCTTTCTGTACCATCATCAGTACGATGAG
AAAACCATTTCACTGGAACGCAACATCATTATCAATGAGATTAATGGTGCTGGTACAGCGCGGCTCAATG
GCCAGGAAAGCATTGAGAAAGAACGCCACTGTATTCTGGGTTCCGCTGAGAGTATCAGCCGTATGGGCC
GCAAGGAATTTGAACTTATTTCCCAGAAATATTATACTCCGGAAAATACGTCTATCTATGTAATCGGTGGTA
ATCAGGACATCGATCTGTTTCACATTCTACGGCAGTAATGACCACGCAATATGGCAAACCGACTCACAA
AGTGAATGTGAATGAAGTTGAAATGAACAAAGACATGATTCTGCTGCCAGTTGAACATGGGGATTACCTG
AAGAACCGCATGATTTGCCACCTGATTGCCGACATGATCAAACACTTGGCCCAGCAGTTAGAATACGATG
TCTCGGTTGGCCTCTTTATCTCCACCAACCAACATTCTTGCTACCTTAAAGTCAAGAAAAGCGATCAGAA
ACGCTTCTCATCACTGATTACAGCAGCTGAGCATGGACGAGCACTTCATTGAAACGTACATCAAAGACTAT
CAATGGCGTTTCATGAACGAATTAGTGATTAATTTTAACCAGTTACATAATATCTATGACTATATGACCGAA
TATCGCCTTGGGGAGTATAACCGTTGCGGAACTGTTTGGCAGTCTCGATAGTGTGATAAACTGGATATTTT
AGCAGTACGTAACGAGCTGATTAACCAACTTACGGTGGGCGAATAA

・プライマー

> AlbF_H54/H58A 部位特定の変異導入 F プライマー

CATAATGGTGCCGCGGCGTTCCTGGAAGCGTTGAAATTTTGGCGTTATGG

> AlbF_H54/H58A 部位特定の変異導入 R プライマー

CCATAACGCCAAAATTTCAACGCTTCCAGGAACGCCGCGGCACCATATG

・プラスミド:

> pETDuet-1-*Qt-albEF*

pETDuet-1-vector の制限酵素サイト 1 に *Qt-albE*、制限酵素サイト 2 に *Qt-albF* 遺伝子がインサートされている。

> pETDuet-1-*Qt-albEF* (F_H54A_H58A)

Qt-AlbF の亜鉛結合モチーフの His54 および His58 が Ala によって置換された変異体。

・合成ペプチド

> Sbo N13 ペプチド (1307.55 Da)

EKGIMVANKGCSA

> Sbo C11 ペプチド (1040.20 Da)

MGITGTFGISG

2-1-2. 培養に用いる培地

・ TB 培地 (1 L 当たり)

Bacto Tryptone, 12 g

Bacto Yeast Extract, 24 g

K₂HPO₄, 9.4 g

KH₂PO₄, 2.2 g

H₂O で 1000 mL にメスアップ

上記の試薬を混合し、121°C、20 分間オートクレーブ。

・ 自動誘導剤(1 L 当たり)

Glycerol, 5 g

Glucose, 0.5 g

Lactose, 2 g

2-1-3. タンパク質精製に用いる buffer

・ His Wash Buffer (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM Imidazole-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT)

5 M NaCl, 20 mL

1 M Tris-HCl (pH 8.0), 50 mL

1 M Imidazole-HCl (pH 8.0), 20 mL

MilliQ 水で 1000 mL にメスアップ

上記の試薬を混合し、使用する際に 1 mM DTT となるように調製。

- ・ His Elution Buffer (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM Imidazole-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT)

5 M NaCl, 20 mL

1 M Tris-HCl (pH 8.0), 50 mL

1 M Imidazole-HCl (pH 8.0), 200 mL

MilliQ 水で 1000 mL にメスアップ

上記の試薬を混合し、使用する際に 1 mM DTT となるように調製。

- ・ ゲル濾過 buffer (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0))

5 M NaCl, 20 mL

1 M Tris-HCl (pH 8.0), 50 mL

MilliQ 水で 1000 mL にメスアップ

2-1-4. ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に用いる buffer および試薬

- ・ SDS-PAGE 用 Running buffer

Tris, 9 g

Glycine, 43.2 g

MilliQ 水で 3 L にメスアップ

最後に SDS を 3 g を加える。

- ・ Lower Gel buffer

Tris, 18.15 g

MilliQ 水で 100 mL にメスアップ

最終的な pH が 8.8 になるように 6 N HCl で調整。最後に 0.4 g の SDS を加える。

- ・ Upper Gel buffer

Tris, 6.06 g

MilliQ 水で 100 mL にメスアップ

最終的な pH が 6.8 になるように 6 N HCl で調整。最後に 0.4 g の SDS を加える。

・ 15% 分離ゲル

滅菌 MilliQ 水, 2 mL

Lower Gel buffer, 2 mL

30 w/v% アクリルアミド/ビス混合液, 4 mL

上記の試薬を混ぜ合わせた後に 10 w/v% APS, 50 μ L と TEMED, 12.5 μ L を加えてガラス板に流し込み、2-プロパノールを重層し、固化させる。

・ 18.75% 分離ゲル

滅菌 MilliQ 水, 1 mL

Lower Gel buffer, 2 mL

30 w/v% アクリルアミド/ビス混合液, 5 mL

上記の試薬を混ぜ合わせた後に 10 w/v% APS, 50 μ L と TEMED, 12.5 μ L を加えてガラス板に流し込み、2-プロパノールを重層し、固化させる。

・ 濃縮ゲル

滅菌 MilliQ 水, 1.8 mL

Upper Gel buffer, 0.75 mL

30 w/v% アクリルアミド/ビス混合液, 0.48 mL

上記の試薬を混ぜ合わせた後に 10 w/v% APS, 12.5 μ L と TEMED, 5 μ L を加えてガラス板に流し込み、コームを挿し、固化させる。

・ 固定液

100% メタノール, 25 mL

100% 酢酸, 5 mL

MilliQ 水で 50 mL にメスアップ

2-2. Methods

2-2-1. Qt-AlbEF 野生型の発現検討

Qt-AlbEF (野生型) タンパク質発現用のプラスミド pETDuet-1-*Qt-albEF* (50 ng/ μ L) 0.2 μ L を 50 μ L の大腸菌 BL21(DE3)に導入し、50 μ g/mL のアンピシリンを含む LB プレートに植菌し、37°Cで一晩、培養を行った。形質転換によって得られたシングルコロニーを 50 μ g/mL のアンピシリンを含む 1.5 mL の LB に植菌し、37°Cで一晩、振盪培養を行った。培養液のうち、1 mL を回収し 50 μ g/mL のアンピシリンを含む 10 mL の TB 培地に植え継ぎ、37°Cで発現誘導を行わないサンプルをネガティブコントロールとして、37°Cと 27°Cにおいて自動誘導剤による発現誘導の有無と終濃度3%のエタノールの添加の有無によって条件を振り分け、24 時間の振盪培養を行った。培養後の大腸菌を回収し、菌体を His Wash Buffer 5 mL で懸濁した。その後、超音波破碎機 Q55 (QSonica) を用いて氷上で菌体の超音波破碎を行った。得られた超音波破碎液を 18000 g、10 分、4°Cで遠心分離し、沈殿と上清を得た。得られた上清については再び、18000 g、10 分、4°Cで遠心分離を行い、超音波破碎上清を得た。超音波破碎後の上清は Ni-NTA Superflow (QIAGEN) を用いてアフィニティークロマトグラフィーを行った。アフィニティー精製の際に、カラムに結合しなかった素通り液とカラム吸着し溶出された溶出液を得た。得られた上清、沈殿、素通り液、溶出液を用いて SDS-PAGE を行った。

2-2-2. Qt-AlbEF の野生型と変異体の発現と精製

Qt-AlbEF (野生型) あるいは Qt-AlbEF(F_H54A_H58A) タンパク質発現用のプラスミド pETDuet-1-*Qt-albEF* (50 ng/ μ L) あるいは pETDuet-1-*Qt-albEF* (F_H54A_H58A) (50 ng/ μ L) 0.2 μ L をそれぞれ 50 μ L の大腸菌 BL21(DE3)に導入し、50 μ g/mL のアンピシリンを含む LB プレートに植菌し、37°Cで一晩、培養を行った。形質転換によって得られたシングルコロニーを 50 μ g/mL のアンピシリンを含む 1.5 mL の LB に植菌し、37°Cで一晩、振盪培養を行った。培養液のうち、1 mL を回収し 50 μ g/mL のアンピシリンを含む 1 L の TB 培地に植え継ぎ、37°Cで IPTG による発現誘導無しの条件で 24 時間の振盪培養を行った。培養後の大腸菌を回収し、菌体を His Wash Buffer に懸濁した。その後、超音波破碎機 SONIFIER 250D (BRANSON) を用いて氷上で菌体の超音波破碎を行った。得られた超音波破碎液を 18000 g、10 分、4°Cで遠心分離し、得られた上清については再び、18000 g、10 分、4°Cで遠心分離を行い、得られた上清は Ni-NTA Superflow によるアフィニティークロマトグラフィーを行った。Ni アフィニティー精製後のタンパク質溶液を 30000 MWCO の Vivaspın (sartorius) を用い、限外濾過によって 1 mL 以下になるまで濃縮し、Superdex 200 10/300 GL カラム (GE Healthcare) を接続した AKTA explorer 10S (GE Healthcare) を用いて、流速 0.5 mL/min でフラクションサイズ 0.5 mL としてゲル濾過を行った。

2-2-3. タンパク質の結晶化と X 線回折実験

精製されたタンパク質溶液については、30000 MWCO の Vivaspın と 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) を含む buffer を用いて脱塩および濃縮を繰り返して、最終タンパク質濃度が 10 mg/mL になるまで濃縮し結晶化に用いた。Qt-AlbEF の結晶化はシッティングドロップ蒸気拡散法で行った。結晶化条件の初期スクリーニングには The JCSG Core I~IV Suite、JCSG+ (QIAGEN) を使用した。初期スクリーニングで結晶が観察された条件から緩衝液、沈殿剤、塩の種類と各濃度の組み合わせを検討し、結晶化条件を最適化した。

得られた結晶をエチレングリコール含有の抗凍結溶液に移し、抗凍結処理を行った。これらの結晶を用い、高エネルギー加速器研究機構の放射光施設 Photon Factory (茨城県つくば市) のビームラインにおいて 100 K の低温で X 線回折実験を行った。

2-2-4. 構造決定と精密化

X 線回折測定によって得られたデータは XDS³³ を用いて指数付けと積分を行い、CCP4 の aimless^{34,35} を用いて統合処理を行った (表 1、表 2)。位相決定には重原子である白金化合物 K_2PtCl_6 を 20% 飽和濃度で含んだ沈殿剤溶液に浸漬した結晶を使用し、波長 1.05 Å の X 線で収集した回折強度データを用いて、単波長異常分散法 (SAD) で行った。得られたモデルは coot³⁶ を用いてモデルの修正を行い、Refmac5³⁷ 及び Phenix^{38,39} を用いて構造精密化を行った (表 3)。

表 1. 野生型、重原子誘導体、変異体タンパク質結晶の X 線回折強度データの統計値

Data collection	野生型	重原子誘導体	変異体
X-ray source	PF-AR NE3A	PF BL-5A	PF BL-5A
Wavelength (Å)	1.00000	1.05000	1.00000
Detector	Pilatus 2M-F	ADSC Quantum-315r	Pilatus 2M-F
Oscillation (°)	0.3	0.3	0.1
Exposure (sec)	0.5 (Transmittance 39%)	1.0 (Transmittance 100%)	0.4 (Transmittance 100%)
Data range (°)	180	180	180
Resolution range (Å)*	44.85–1.98 (2.02–1.98)	44.80–2.22 (2.27–2.22)	44.84–2.10 (2.15–2.10)
Space group	<i>P</i> 3 ₁ 21	<i>P</i> 3 ₁ 21	<i>P</i> 3 ₁ 21
Cell parameters <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	137.01, 137.01, 118.40	136.87, 136.87, 118.41	136.42, 136.42, 119.00
Total reflections*	908,036 (42,232)	707,038 (49,322)	757,417 (46,425)
Unique reflections*	88,620 (4,486)	63,556 (4,429)	74,597 (4,501)
Multiplicity*	10.2 (9.4)	11.1 (11.1)	10.2 (10.3)
Completeness (%)*	99.3 (98.6)	99.9 (99.2)	99.7 (99.5)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$ *	28.7 (2.0)	26.2 (2.3)	20.0 (2.0)
R_{merge} (%)*	4.6 (143.2)	6.7 (140.3)	5.4 (122.4)
CC(1/2)*	1.000 (0.674)	1.000 (0.848)	1.000 (0.848)
Crystal mosaicity (°)	0.123	0.086	0.053
Wilson <i>B</i> -factor (Å ²)	44.2	44.2	50.0

* 括弧内は最外殻の値

表 2. 各 X 線波長で測定した野生型タンパク質結晶の X 線回折強度データの統計値

Data collection	albef6_1.25	albef6_1.30	albef6_1.00	albef6_1.51
X-ray source	PF-AR NW-12A			
Wavelength (Å)	1.25000	1.30000	1.00000	1.51000
Detector	Pilatus3 S2M			
Oscillation (°)	0.2	0.2	0.2	0.2
Exposure (sec)	0.3 (34%)	0.3 (30%)	0.3 (47%)	0.3 (29%)
Data range (°)	360	360	360	360
Resolution range (Å)*	44.73–2.10 (2.14–2.10)	44.73–2.12 (2.17–2.12)	44.71–2.04 (2.08–2.04)	44.75–2.21 (2.26–2.21)
Space group	<i>P</i> 3 ₁ 21	<i>P</i> 3 ₁ 21	<i>P</i> 3 ₁ 21	<i>P</i> 3 ₁ 21
Cell parameters <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	136.36, 136.36, 118.52	136.38, 136.38, 118.54	136.38, 136.38, 118.44	136.40, 136.40, 118.59
Total reflections*	1,505,735 (89,870)	1,464,978 (92,477)	1,666,128 (89,604)	1,287,742 (86,818)
Unique reflections*	74,172 (4,383)	72,247 (4,399)	80,941 (4,568)	63,925 (4,473)
Multiplicity*	20.3 (20.5)	20.3 (21.0)	20.6 (19.6)	20.1 (19.4)
Completeness (%)*	99.6 (96.7)	99.8 (99.5)	99.8 (99.6)	99.8 (99.7)
$\langle I/\sigma(I) \rangle^*$	29.3 (2.1)	28.6 (2.0)	31.1 (2.0)	27.0 (2.1)
R_{merge} (%)*	6.3 (206.5)	6.8 (220.5)	5.9 (209.7)	7.3 (195.4)
CC(1/2)*	1.000 (0.832)	1.000 (0.832)	1.000 (0.765)	1.000 (0.863)
Crystal mosaicity (°)	0.050	0.055	0.057	0.051
Wilson <i>B</i> -factor (Å ²)	47.2	46.2	47.0	46.2

* 括弧内は最外殻の値

表 3. 構造精密化の統計値

Name	野生型	変異体	Ni 結合型
Resolution (Å)	41.93–1.98	41.92–2.10	44.71–2.04
<i>R</i>_{work}	0.230	0.218	0.228
<i>R</i>_{free}	0.269	0.252	0.269
Completeness (%)	99.2	99.7	99.8
RMS deviation from ideal geometry			
bond length (Å)	0.009	0.009	0.009
bond angle (°)	1.018	1.036	1.026
Ramachandran plot (%)			
favored	94.08	93.18	95.0
allowed	4.91	5.15	4.42
outliers	1.01	1.67	0.58
No. of atoms	6,055	6,095	5,933
protein	5,852	5,948	5,868
non-protein	203	147	65
Average <i>B</i>-factor (Å²)			
protein	59.9	77.1	68.1
non-protein	88.4	88.1	80.9

2-2-5. SDS-PAGE と CBB 染色

SDS-PAGE に供するサンプルに対して、Sample Buffer Solution (2ME+) (x4) (Wako) を加え、98°Cに設定したヒートブロックを用いて 10 分間インキュベートし、熱変性させたサンプルを濃縮ゲルにアプライした。濃縮ゲルは定電圧 100 V で 20 分間、分離ゲルは定電圧 200 V で 40 分間の電気泳動を行った。泳動終了後の分離ゲルをガラス板から外し、MilliQ 水で洗浄後、固定液を加えて 10 分間振とうさせた。固定液を除き、Quick CBB (Wako) を加えて 30 分間振とうさせた。十分にゲルが染色されたことを確認後、Quick CBB を除き、水を十分に加えて、電子レンジで加熱し、脱染色を行った。

3. Results and Discussion

3-1. AlbE および AlbF のホモログ探索

サブチロシン生合成系において AlbE および AlbF タンパク質によるリーダーペプチド切断と大環状化の反応機構を解明するため、AlbE と AlbF の構造生物学的研究を行った。初めに遺伝学的実験の報告がある *B. subtilis* 168 株由来の AlbE・AlbF を対象とした研究に取り組んだ。様々な発現条件の検討を行ったが、どの条件においても、これらは不溶性が高く、可溶性画分としての試料調製が難しかった。そこで、これらのホモログを用いることとし、まず適切なホモログを見出すため、*B. subtilis* 168 株由来のサブチロシン生合成遺伝子クラスターのアミノ酸配列を基に BLAST 検索を行った。その結果、表 4 に示すように *Quasibacillus thermotolerans* を含む、いくつかの生物種においてサブチロシン生合成遺伝子が保存されていることが明らかになった。*Bacillus tequilensis* ならびに *Bacillus smithii* 由来のサブチロシン生合成クラスターには全てのタンパク質が保存されている一方で、*Staphylococcus felis* ならびに *Staphylococcus delphini* 由来のサブチロシン生合成遺伝子クラスターではそれぞれ AlbB と AlbG が、*Lysinibacillus contaminans* では AlbB と AlbC が欠失しており、一方、*Q. thermotolerans* では AlbB と AlbG が欠失していた。

表 4. *B. subtilis* 168 株由来サブチロシン生合成クラスターに対する各タンパク質のアミノ酸配列同一性

Identity (%)	Sbo	AlbA	AlbB	AlbC	AlbD	AlbE	AlbF	AlbG
<i>B. tequilensis</i>	93.0	97.8	98.1	97.1	90.1	85.3	86.2	86.3
<i>B. smithii</i>	69.8	69.2	35.6	65.8	48.6	34.5	35.0	29.4
<i>S. felis</i>	67.4	52.0		34.7	21.1	16.1	16.9	14.5
<i>S. delphini</i>	60.5	51.6	29.8	30.6	20.8	17.3	15.7	
<i>L. contaminans</i>	58.1	62.0			37.8	33.0	33.8	27.1
<i>Q. thermotolerans</i>	67.4	50.4		36.3	22.9	19.2	19.1	

ホモログ検索で見出されたサブチロシン生合成遺伝子クラスターを有するこれらの生物のうち、*B. smithii* は 25~60°C（至適 55°C）、pH 5.5~6.8（至適 pH 6.5）で *Q. thermotolerans* は 20~65°C（至適 50°C）、pH 6.0~9.0（至適 pH 6.5~7.0）で増殖可能な中等度好熱菌であり、その他の生物種として、*B. tequilensis* は 25~50°C、pH 5.5~8.0⁴⁰、*S. felis* は 15~45°C⁴¹、*S. delphini* は至適温度 45°C⁴²、そして *L. contaminans* は 15~45°C、pH 6.5~10.5⁴³ で生育可能な中温微生物であった。これらに基づいて本研究では、より高温まで生育可能で、幅広い pH で増殖可能であるとともに、より少ない遺伝子のセットでサブチロシン生合成遺伝子クラスターが構成されている *Q. thermotolerans* に着目した。表 4 に示す通り、*Q. thermotolerans* 由来の前駆体ペプチドと 67% のアミノ酸配列同一性を示し、サブチロシンにおけるチオエーテル架橋形成に関与する残基である Cys ならびに Phe/Thr 残基、そして N/C 大環状化に関与する N 末端の Asn と C 末端の Gly が保存されている（図 11）。

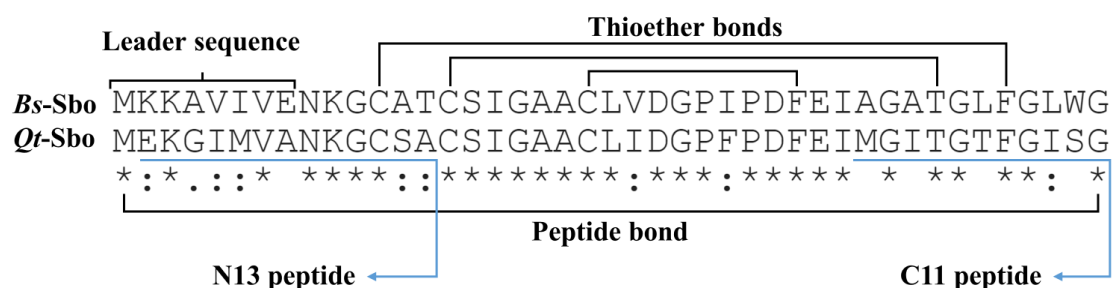


図 11. *B. subtilis*（上）と *Q. thermotolerans*（下）の Sbo のアミノ酸配列アライメント
リーダー配列領域とチオエーテル架橋形成される位置が示されている。本研究で使用した合成ペプチド N13 および C11 ペプチドに対応する領域を図中に示している。

ラジカル SAM 酵素である AlbA については 50% のアミノ酸配列同一性を示し、[4Fe-4S] クラスター結合モチーフである (CxxxCxxC) が保存されている (図 12)。

1	MFIEQMFPF	INESVRVHQL	PEGGVLEIDYLRD	NVISISDFEYLD	LNKTAYEL	CMRMDGQKT	60
1	---	MGKYVYFNGN	ARIHQPLGGV	IEVNYKDTKFKV	DEFEYLDIN	ETAYEACMS	57
		:	::*	..:*****	***:***::*****:*****	** :*** :
61	AEQILAEQ	CAVYDESP	EDHKDWYD	MLNMLQNK	QVIQLGN	RASRHTIT	120
58	PLEILKSM	CQKYNEDL	SEHLPWF	ENLVRELL	QKNVLSI	SEKKEYR	117
		:	** . *	*:.. .:*	*: :::.	* :*::::..: . :	* *****: : ***
21	ATFELTHR	CNLKCAH	CYLESSPE	ALGTVSIE	QFKKTAD	MLFDNGV	180
18	ATFEITHK	CNLECKH	CYLESSP	KVEDTSL	SLEEFK	RIASEMY	177
		****:***:***:	*	*****:..	..:***:***:	*. :..*****:*****:*****:	
81	ANEILDYV	CKFKKVA	VLNTNGT	LMRKESL	LELLKTY	KQKIIVG	240
78	AKEMLEF	SLGLFHK	IGILTNA	TLREDV	LNLLTAY	KEKIIVA	237
		::		*:***:***:*****:	*****:*****:*****:*****:	* * * * *	
41	GSFAQTCT	IKLLSDH	GIFVRV	AMSVFEK	NMWEIHD	MAQKVRD	300
38	NAFKQTCR	NIQRLA	ERGIFVR	VGMSIY	EDNMWEI	GEMASLV	297
		..* ***:..:	*:*****:*****:*****:	***. **	*****:***:*****:		
01	RDIVHPTK	DAEQHRK	FMHEYEQ	HVIDEFK	DLIPIIP	YERKRA	360
98	KNMEDLKK	FRDSMK	EFNEFEM	KVVEANQ	DIIPVPL	SRNKAN	357
		::: . .*	:. :*: *:* :*:	:*:***:*	..:*** *****:***:***:***:		
61	PCALFPKE	FLGNIFH	DSYESIF	N SPLVH	KLWQAQ	APRFSEH	420
58	PCALFPKN	FSLGNL	KTDYKKI	FSGEIVN	KLWLQ	APQSSLC	416
		*****:*****:	..:***. .:*****	***: * . *	*:****.***.*****		
21	GLNSNKYH	RKNICSW	AKNEQLE	DVVQLI			448
17	GLNANKNH	REHHCN	WTKGQS	LEPLLEYV			444
		:	**::: *..:***. .:***	::: :			

図 12. *B. subtilis* (上) と *Q. thermotolerans* (下) の AlbA のアミノ酸配列アライメント
[4Fe-4S] クラスター結合モチーフはピンク色でハイライトされている。

3-2. Qt-AlbEF の発現検討と精製

Q. thermotolerans 由来の AlbEF ホモログ（以下、Qt-AlbEF）をコードする遺伝子配列を大腸菌の使用コドンに最適化した上で、ユーロフィンジェノミクス株式会社に DNA 合成を依頼した。*Qt-albE* および *Qt-albF* は、共発現系ベクターである pETDuet-1 ベクターのマルチクローニングサイト 1 とマルチクローニングサイト 2 にそれぞれ挿入した。Qt-AlbE は N 末端にヘキサヒスチジンタグが付加された状態で発現され、Qt-AlbF はインタクトな状態で発現される。発現条件検討の結果、37°Cにおいて発現誘導無しで 24 時間の培養を行った時の大腸菌の超音波破碎上清に目的タンパク質が多く発現していることが分かった（図 15）。

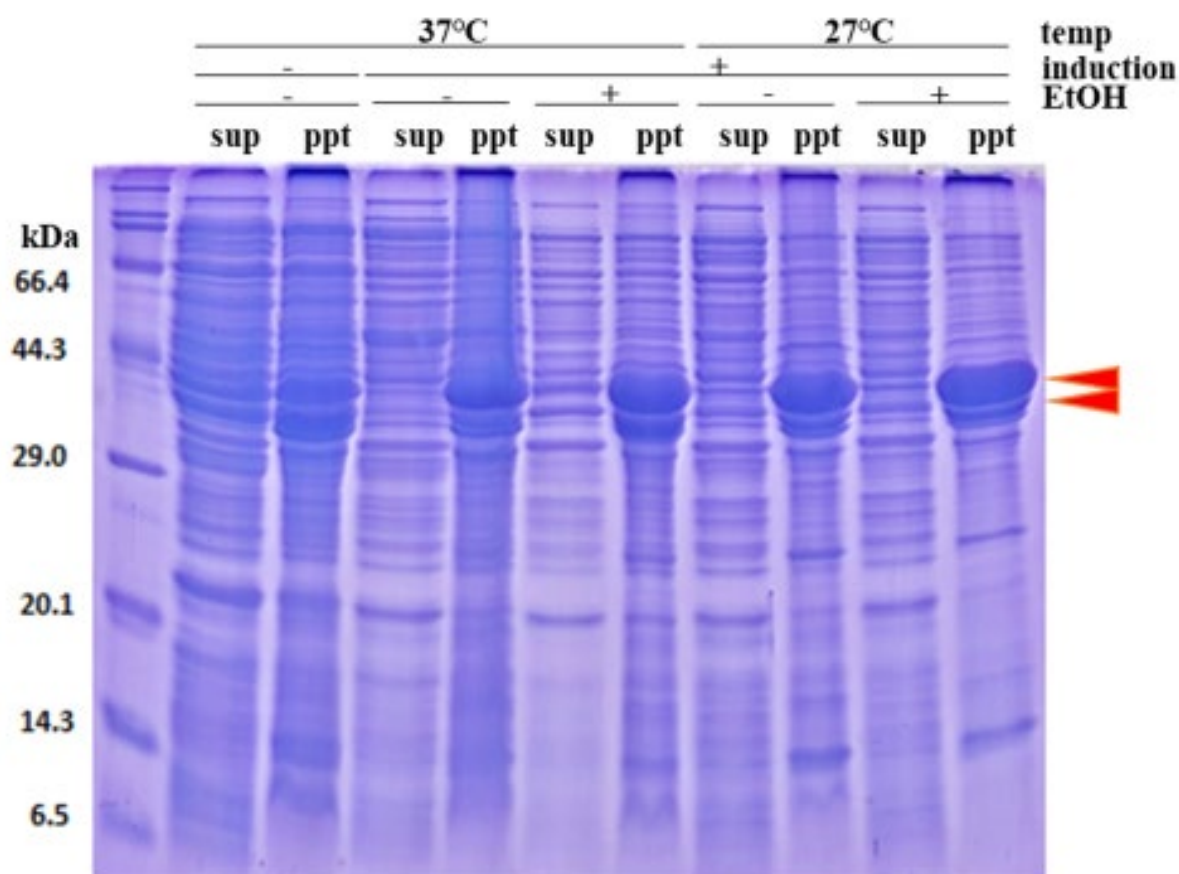


図 15. 大腸菌超音波破碎後の上清（sup）と沈殿（ppt）の SDS-PAGE

temp、induction、EtOH はそれぞれ発現時の培養温度、自動誘導剤による発現誘導の有無、終濃度 3%のエタノールの添加の有無を示している。最も左側のレーンは分子量既知の分子量マーカーで左側に分子量を示している。右側の矢印は目的タンパク質（Qt-AlbE および Qt-AlbF）と考えられる位置を示している。

次に、各発現条件で培養した大腸菌の超音波破碎上清を用いて、アフィニティークロマトグラフィーを行った。アフィニティー精製後の溶出液を SDS-PAGE で比較検討した結果、37°Cで発現誘導を行わなかった条件でもっと多くの目的タンパク質を可溶性画分に得ることが出来た。また SDS-PAGE から、ヘキサヒスチジンタグが付加された Qt-AlbE とインタクトな Qt-AlbF が共溶出されていることが分かった (図 16)。

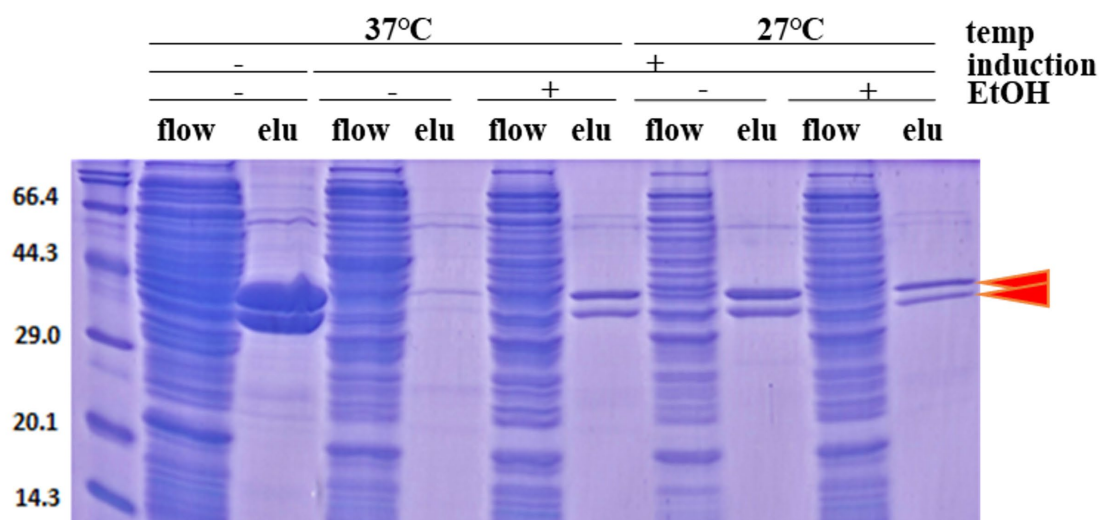


図 16. 大腸菌超音波破碎後上清の Ni カラムによるアフィニティー精製後の素通り液 (flow) と溶出液 (elu) の SDS-PAGE

temp、induction、EtOH はそれぞれ発現時の培養温度、自動誘導剤による発現誘導の有無、終濃度 3%のエタノールの添加の有無を示している。最も左側のレーンは分子量既知の分子量マーカーで左側に分子量を示している。右側の矢印は目的タンパク質 (Qt-AlbE および Qt-AlbF) と考えられる位置を示している。

これらの結果から、T7 promoter・lac operator による転写抑制を免れた緩やかなタンパク質発現を通じて、目的タンパク質の強制発現による封入体形成の可能性を減らし、目的タンパク質を可溶性タンパク質として多く得ることができたと考えられる。また Qt-AlbE および Qt-AlbF の間には特異的な相互作用が存在することが示唆された。

ゲルろ過は分子ふるい効果によって、タンパク質分子を分子サイズによって分画する精製方法である。アフィニティー精製後のタンパク質溶液をゲルろ過に供した結果、溶出体積のピークは 13.64 mL であった (図 17)。分子量既知の標準タンパク質の溶出体積との比較から、溶出体積 13.64 mL のタンパク質の分子量は 110,000 と推定された。また、SDS-PAGE の結果 (図 18) から、この溶出体積に含まれるタンパク質は Qt-AlbE および Qt-AlbF であることが示唆された。Qt-AlbE および Qt-AlbF 計算上の分子量はそれぞれ 45689.02 および 42578.50 であることから、Qt-AlbE および Qt-AlbF がヘテロ二量体を形成していることが示唆された。

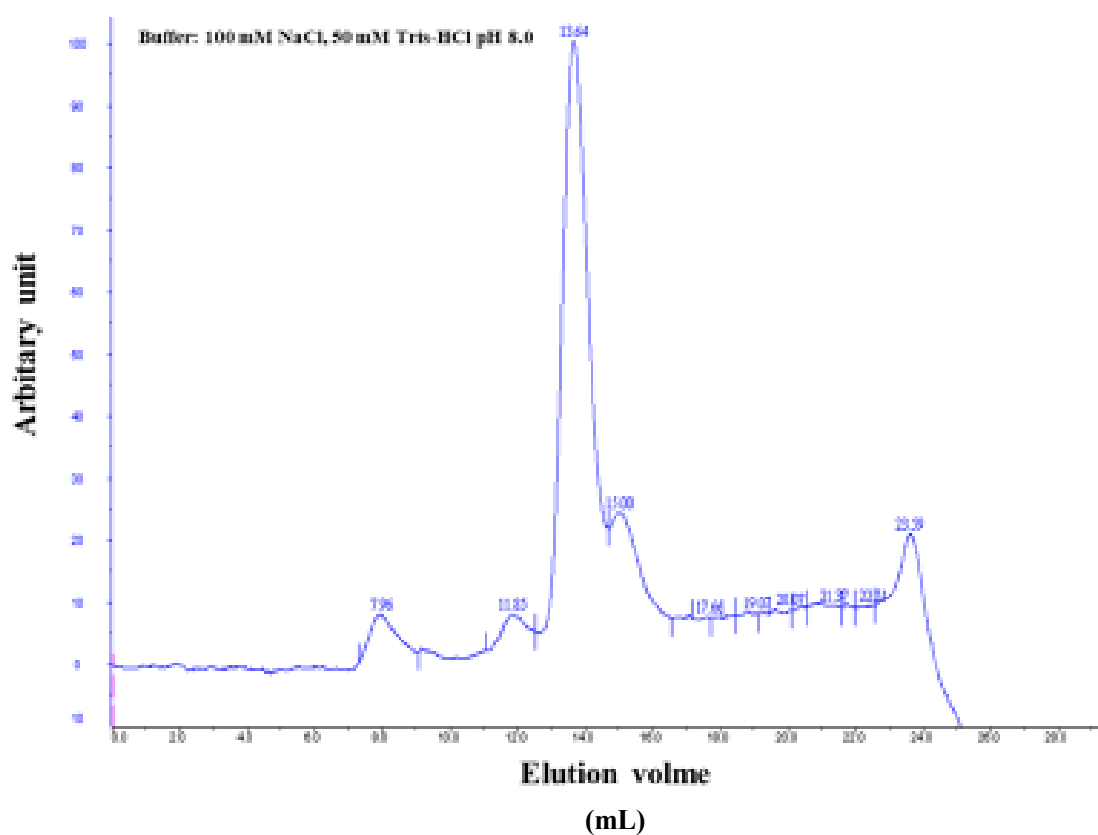


図 17. ゲルろ過の結果

縦軸は 280 nm の吸収波長、横軸は溶出体積 (mL) を示している。13.64 mL で溶出ピークが観察された。

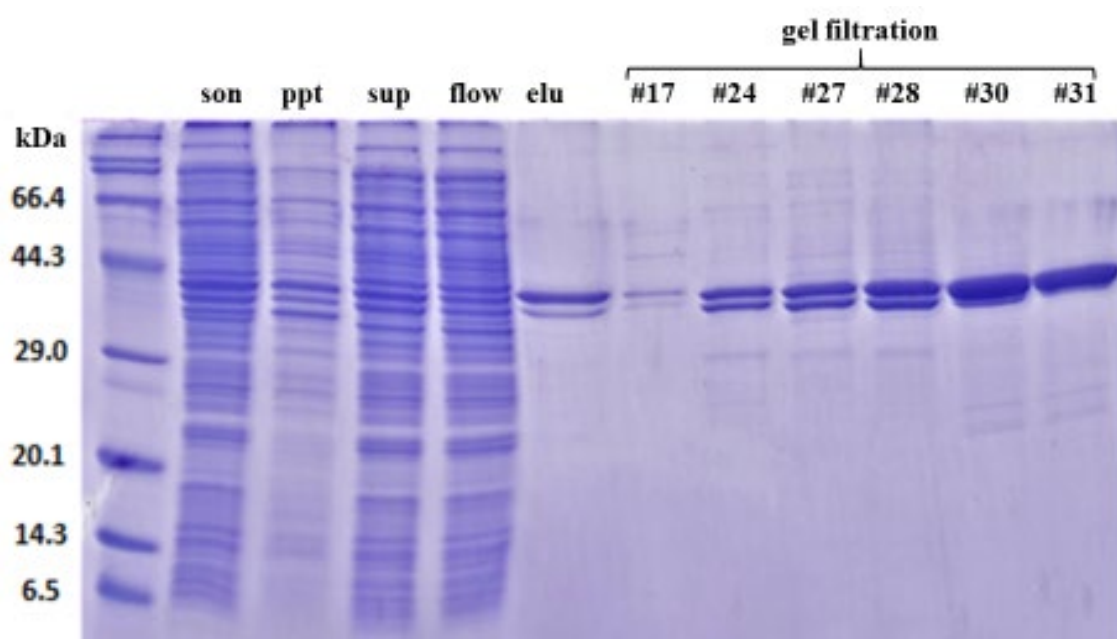


図 18. タンパク質の精製過程の各サンプルの SDS-PAGE

超音波破碎液 (son)、超音波破碎後の沈殿 (ppt) と上清 (sup)、アフィニティー精製時の素通り液 (flow) と溶出液 (elu)、そしてゲルろ過 (gel filtration) の結果については溶出フラクションを示している。最も左側のレーンは分子量既知の分子量マーカーで左側に分子量を示している。

3-3. Qt-AlbEF の結晶化と構造決定

高純度に精製されたタンパク質溶液を用いて、結晶化条件スクリーニングを行った。その結果、以下の 3 種類の条件で結晶が観察された（図 19）。

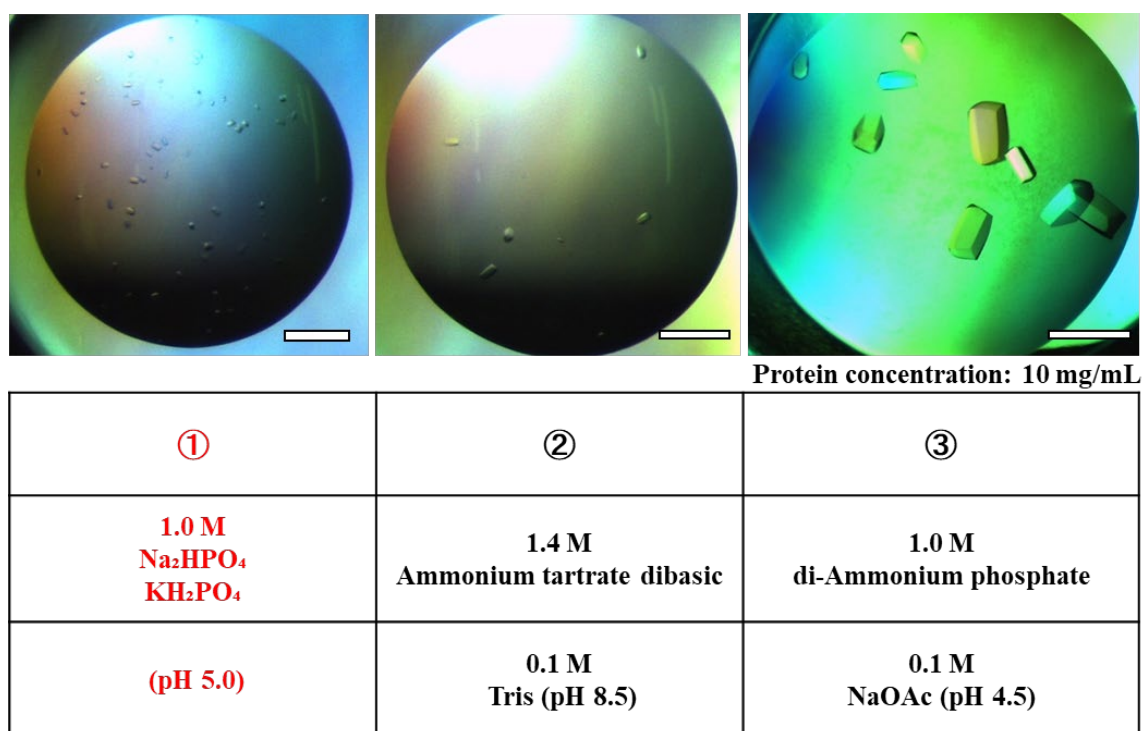
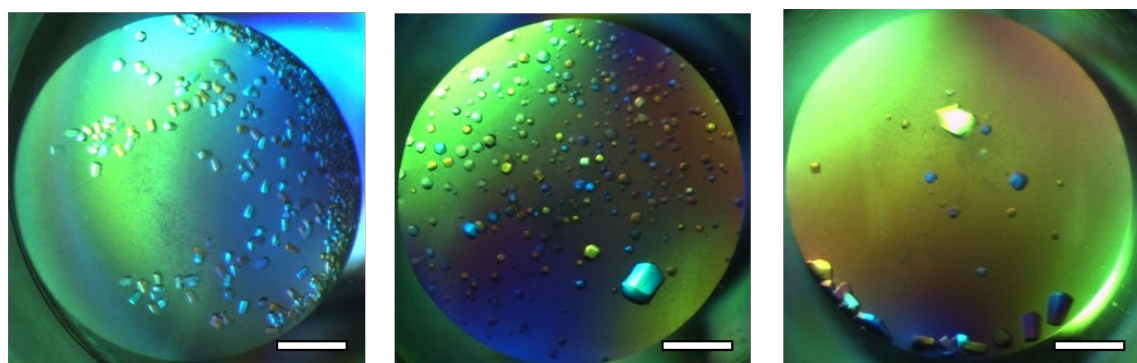


図 19. 結晶化スクリーニングの結果

タンパク質濃度 10 mg/mL でシッティングドロップ蒸気拡散法によって結晶化を行った。スケールバーは 200 μ m を表している。

- ① 1.0 M Na₂HPO₄/KH₂PO₄ (pH 5.0)
- ② 1.4 M ammonium tartrate dibasic, 0.1 M Tris (pH 8.5)
- ③ 1.0 M di-ammonium phosphate, 0.1 sodium acetate (pH 4.5)

これらの結晶化条件のうち、①の条件だけで結晶化の再現性が確認されたため、①の条件を基に結晶化条件の最適化を行った。その結果、1.6 M Na₂HPO₄/KH₂PO₄ の pH 5.8～6.2 の範囲で結晶が多数得られた。得られた結晶を用いて、高エネルギー加速器研究機構の放射光施設 Photon Factory（つくば市）にて X 線回折実験を行った（表 1、図 20）。得られた回折強度データを処理し、既知のメタロプロテアーゼの立体構造情報を用いて分子置換法による位相決定を試みたが、この試みはうまく行かなかった。



Protein concentration: 10 mg/mL

1.6 M Na₂HPO₄ KH₂PO₄		
(pH 5.8)	(pH 6.0)	(pH 6.2)

図 20. 結晶化条件の最適化

タンパク質濃度 10 mg/mL でシッティングドロップ蒸気拡散法によって結晶化を行った。スケールバーは 200 μ m を表している。

位相決定のために、沈殿剤溶液に対して 20%飽和濃度のテトラクロロ白金(II)酸カリウムおよび 25 v/v% エチレングリコールを含む抗凍結溶液を準備し、この抗凍結溶液に結晶を 60 秒間浸漬させて白金誘導体結晶を調製した後、波長 1.05 Å の X 線を用いて回折実験を行い、回折強度データを収集した (表 1)。白金誘導体結晶の回折強度データを用いて単波長異常分散法 (SAD) によって位相決定を行い、モデル構築を行った。構築したモデルを用いて Native 結晶から得られたデータに対して分子置換法を行うことで最終的に 1.98 Å 分解能で結晶構造を決定することができた (表 3)。

3-4. Qt-AlbEF 野生型の結晶構造

Qt-AlbEF は結晶学的非対称単位中に 2 分子のポリペプチド鎖が含まれており、それぞれのポリペプチド鎖の電子密度は Qt-AlbE および Qt-AlbF のアミノ酸配列と対応していた (図 21)。すなわち、Qt-AlbE および Qt-AlbF はヘテロ二量体を形成しており、これはゲル濾過の結果とも矛盾しない。また、以前に報告されている M16B 亜鉛プロテアーゼと同様に、生理的条件下においてもヘテロ二量体を形成することを示唆している。

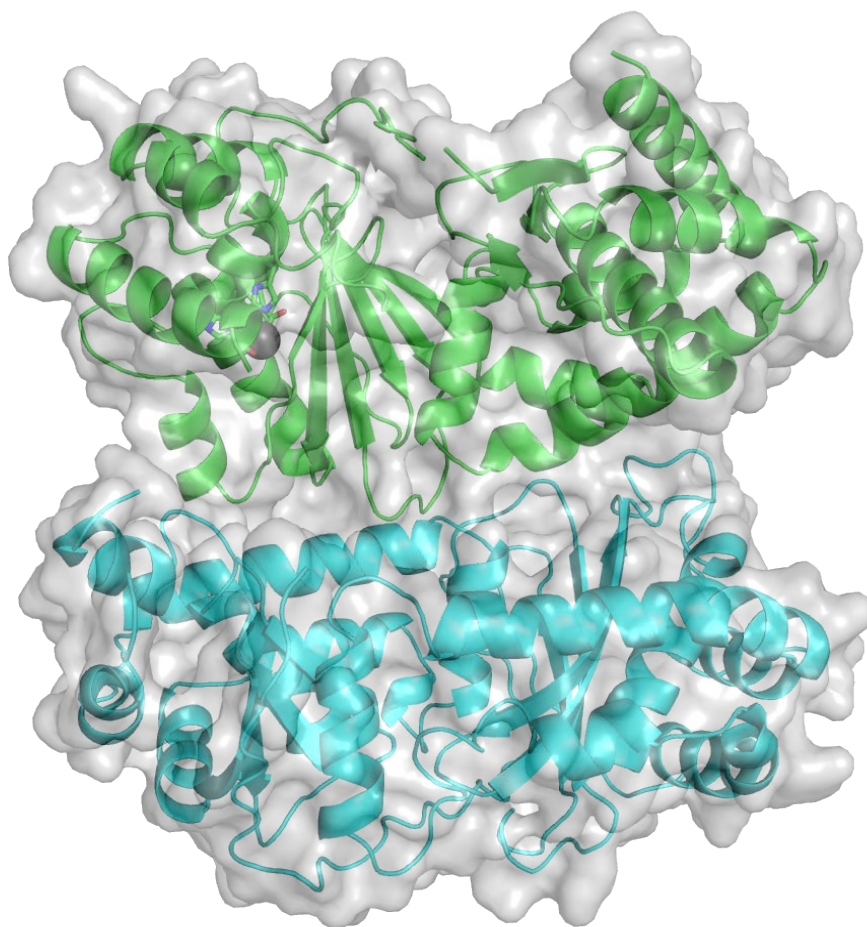


図 21. Qt-AlbEF 複合体の結晶構造

タンパク質の主鎖はリボンモデルで表示され、Qt-AlbE はシアン色、Qt-AlbF は緑色で色づけている。タンパク質表面は灰色で表示している。Qt-AlbF の保存された金属イオン結合モチーフはスティック表示で表されている。酸素原子、窒素原子はそれぞれ赤色と青色で表示されている。金属イオンは灰色の球で表示されている。

M16 ファミリーのメタロプロテアーゼは、基質結合チャンバーが開いたオープンクラムシェル構造（オープン型）と閉じたクローズドクラムシェル構造（クローズ型）の2つの構造状態を取りうるということが報告されている¹⁸。Qt-AlbEF 結晶構造と、立体構造が報告されている M16A、M16B、M16C 亜鉛メタロプロテアーゼとの間で、基質結合チャンバーの開口度合いをクラムシェル構造のヒンジ位置における角度で比較した。Qt-AlbEF ではサブユニット間の角度は 32°であった（Lys10e、Asp127e、Glu148f の C α 原子位置を頂点とした三角形について、辺 K10e-D127e: 37.3 Å、辺 K10e-E148f: 39.7 Å、辺 D127e-E148f: 21.7 Å から \angle E148f-K10e-D127e を求めた；添え字の e および f はそれぞれ Qt-AlbE および Qt-AlbF のアミノ酸残基を示す）。M16B サブファミリーに属する SPH2681/SPH2682 複合体あるいは酵母由来の MPP α /MPP β 複合体のオープン型構造ではサブユニット間の角度はそれぞれ、10°あるいは 27°であり、クローズ型の SPH2681/SPH2682 複合体では 2°である¹⁹。クラムシェル構造における開口部の広さについては、SPH2681/SPH2682 複合体あるいは MPP α /MPP β 複合体のオープン型構造では 15.9 Å と 20.0 Å で、クローズ型の SPH2681/SPH2682 複合体では 7.4 Å であるという報告がある²⁰。詳細は後述するが Qt-AlbEF においては、SPH2681/SPH2682 複合体あるいは MPP α /MPP β 複合体で開口部の広さを測定する指標として用いられた残基（SPH2681:Pro267, SPH2682: Pro259, MPP α : Leu253, MPP β : Thr262）が保存されていないことから、正確に比較することはできなかった。しかしながら、サブユニット間の角度と開口部の構造から、本研究で決定した Qt-AlbEF はオープン型であり、他の M16B サブファミリーのヘテロ二量体タンパク質よりも大きく開いたコンフォメーションをとることが示唆された（図 22）。また、Qt-AlbEF 複合体におけるヘテロ二量体化によって形成される基質結合チャンバーは約 6800 Å²の表面積をもち、体積は約 18000 Å³であることが CASTp プログラムによって計算された。オープン型の SPH2681/SPH2682 複合体および MPP α /MPP β 複合体では、基質結合チャンバーはそれぞれ約 6900 Å² および 7800 Å²の表面積をもち、体積についてはそれぞれ約 16000 Å³ および 18200 Å³と計算された。これらの結果から、Qt-AlbEF の開口部の広さは他のメタロプロテアーゼと比較して広い一方で、チャンバー内の空間は SPH2681/SPH2682 複合体よりは大きいものの、MPP α /MPP β 複合体と同程度であることが明らかになった。

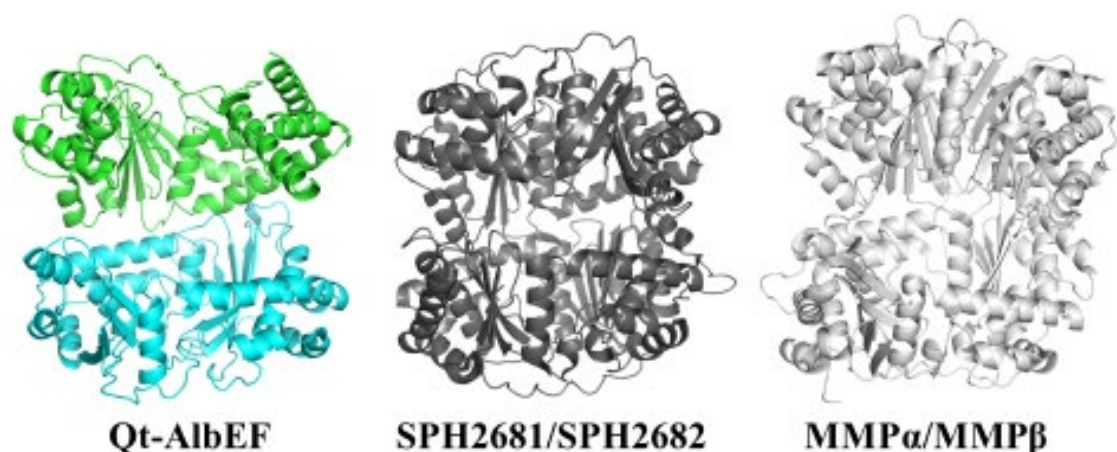


図 22. Qt-AlbEF 複合体とオープン型 M16B プロテアーゼの結晶構造の比較

タンパク質はループモデルで表示され、Qt-AlbF は緑色、Qt-AlbE はシアン色で色づけている。SPH2681/SPH2682 複合体は黒で、MPPα/MPPβ 複合体は白で色づけられている。

PDBePISA によって計算された Qt-AlbEF タンパク質全体の溶媒接触可能面積は約 33000 Å² であり、その内の約 2700 Å² (8%) がヘテロ二量体形成時の接触表面積であった。相互作用の界面は 12 個の水素結合、1 個の塩橋 (Glu321e-Lys95f)、そして多数の疎水性相互作用によって成り立っている (図 23)。水素結合に関与するのは主に、Lys9e Nζ-Asn317f Oδ、Lys10e N-Glu30f O、Thr12e N-Asn317f Oδ、Thr12e Oγ-Val313f O、Ala81e O-Ser5f Oγ、Thr84e Oγ-Leu2f O、Asn322e Nδ-Gly76f O、Arg325e Nη-Tyr33f O、Glu329e Oε-Tyr33e N である。SPH2681/SPH2682 複合体における二量体境界面の面積はクローズ型では約 2500 Å² で全表面積の 14%、オープン型では 1500 Å² で全表面積の 9%であり、コンフォメーション変化によって二量体どうしの接触面積が大きく変化する事が報告されている。Qt-AlbEF 複合体についても、オープン型からクローズ型へ構造変化した際に、開口部を形成する Qt-AlbE と Qt-AlbF のアミノ酸残基の接触が増えることによって接触面積が増加する可能性が示唆される。すなわち、Qt-AlbEF 複合体は比較的大きなサイズの基質であるサブチロシン前駆体と相互作用するために、基質非結合のオープン型では大きな開口部を持つが、基質と相互作用することにより、基質をちょうど内包できるサイズの基質結合チャンバーを持つクローズ型へとコンフォメーション変化することが考えられる。このとき、AlbEF の機能を考慮すると、クローズ型では基質結合チャンバーは水分子を排除した疎水的な環境となることが予想され、それによりリーダーペプチドの切断と大環状化反応が進行すると考えられる。

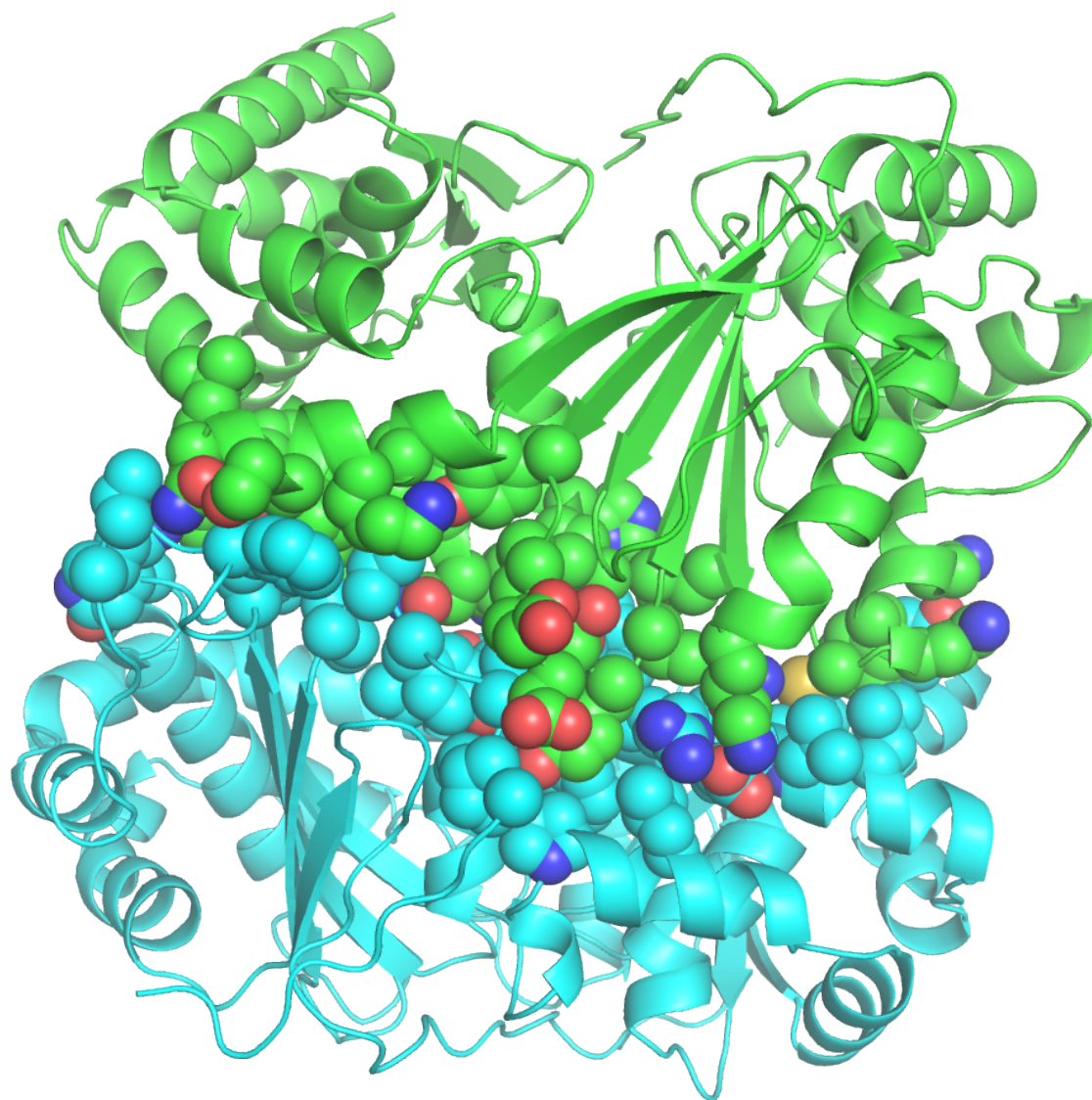


図 23. Qt-AlbEF 複合体のサブユニット間の相互作用

タンパク質の主鎖がリボンモデルで表示されている。疎水性相互作用および塩橋に関与する残基の側鎖は球で示され、赤色は酸素原子、青色は窒素原子、黄色は硫黄原子を示している。

Qt-AlbF においては、メタロプロテアーゼで保存されている亜鉛結合モチーフ HxxEH によって配位された金属イオンと考えられる電子密度が観察された (図 24)。この電子密度が示す金属イオンを同定するために、Qt-AlbEF 結晶を 1 mM 塩化亜鉛が含まれる抗凍結溶液に 60 秒間浸漬させた後に、4 波長 (1.00、1.25、1.30、1.51 Å) の X 線を用いて、それぞれの回折強度データセットを取得した (表 2)。亜鉛原子は 1.28 Å に K 吸収端があり、その近傍の高エネルギー (短波長) 側では異常散乱を示す (図 25)。本実験の結果、波長 1.00 Å、1.25 Å だけでなく波長 1.30 Å のデータセットにおいて異常散乱シグナルが観測された。一方で、1.51 Å の波長で測定したデータセットにおいては異常散乱シグナルが観測されなかった (図 26)。1.30~1.51 Å の波長領域で異常散乱を示す原子はニッケルあるいは銅である。これらのことからヘキサヒスチジンタグ融合タンパク質として発現させ、Ni 樹脂によってアフィニティー精製を行っている間に Qt-AlbEF の金属イオン結合部位にニッケルイオンが結合し、さらに亜鉛イオンを含む溶液での結晶浸漬によってもニッケルイオンが亜鉛イオンに置換されなかったということが考えられる。ニッケル原子は His54f Ne、His58f Ne、Glu130f Oε とリン酸分子の 2 つの酸素原子によって 5 配位している (図 27)。

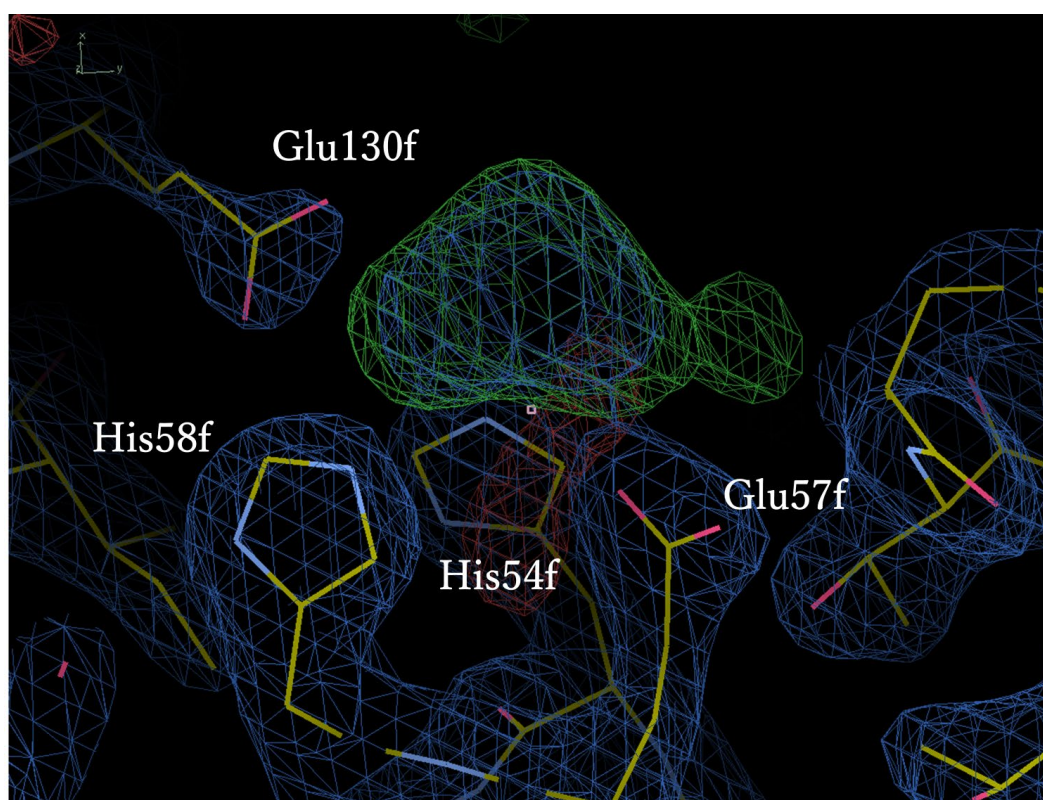


図 24. 亜鉛結合モチーフにおける電子密度

アミノ酸残基はスティックとして表示されており、炭素、酸素、窒素はそれぞれ黄色、赤色、青色で色づけられている。2Fo-Fc 電子密度マップは 2.0 σ で青メッシュとして、Fo-Fc 電子密度マップは 3.0 σ で緑メッシュとして表示されている。

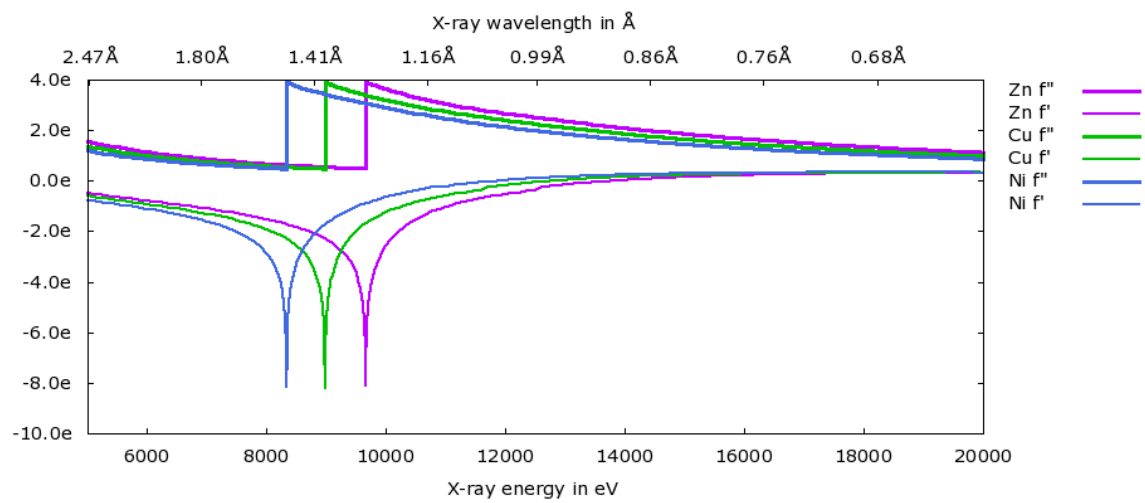


図 25. 金属イオンの異常散乱因子

縦軸は異常散乱因子を、横軸は X 線の波長を示している。

図は <http://skuld.bmsc.washington.edu/scatter/>にて作成した。

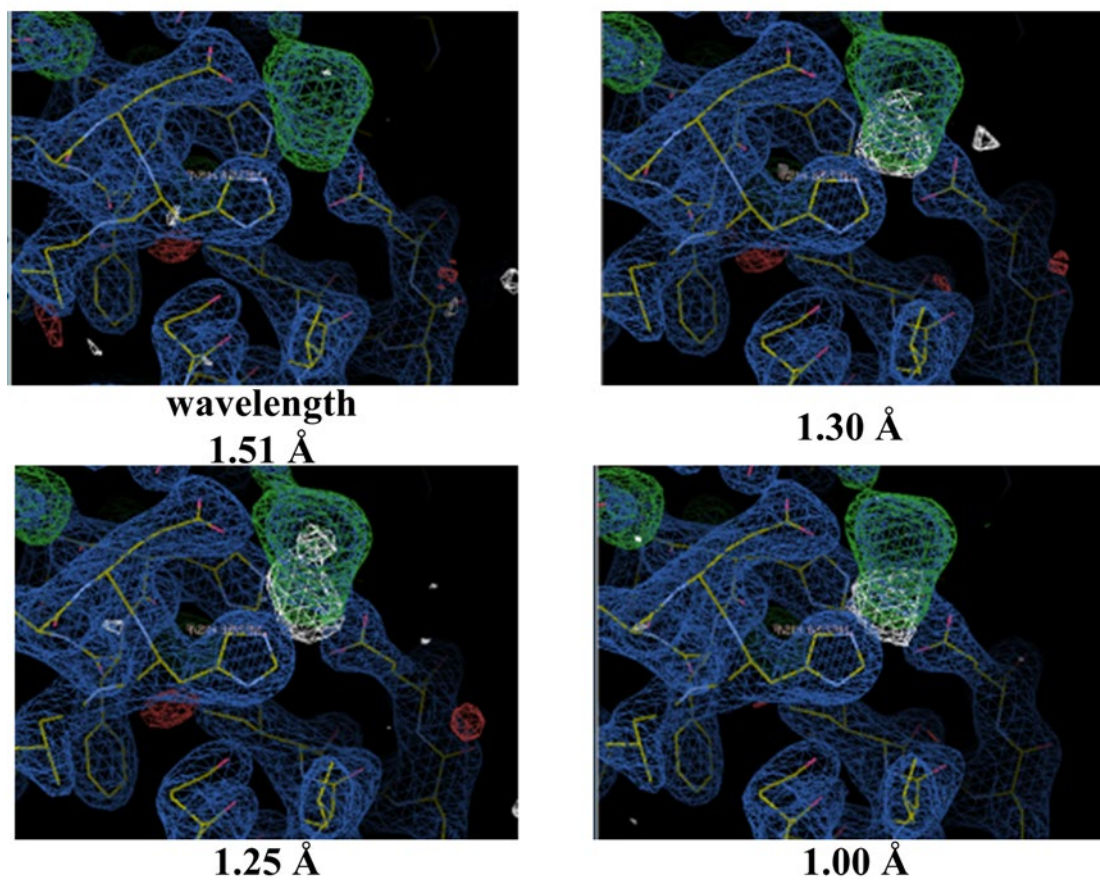


図 26. Qt-AlbEF 結晶における異常散乱

(上) 縦軸は異常散乱因子を、横軸は X 線の波長を示している。(下) それぞれ 1.51 Å、1.30 Å、1.25 Å、1.00 Å の波長で測定したデータの解析結果を示している。タンパク質の炭素原子、酸素原子、窒素原子はそれぞれ黄色、赤色、青色で表示されている。電子密度は $2Fo-Fc$ マップは 2.0σ の青色メッシュで、 $Fo-Fc$ は 3.0σ の緑色メッシュで表示されている。異常分散差フーリエマップは 3.0σ の白色メッシュで表示されている。

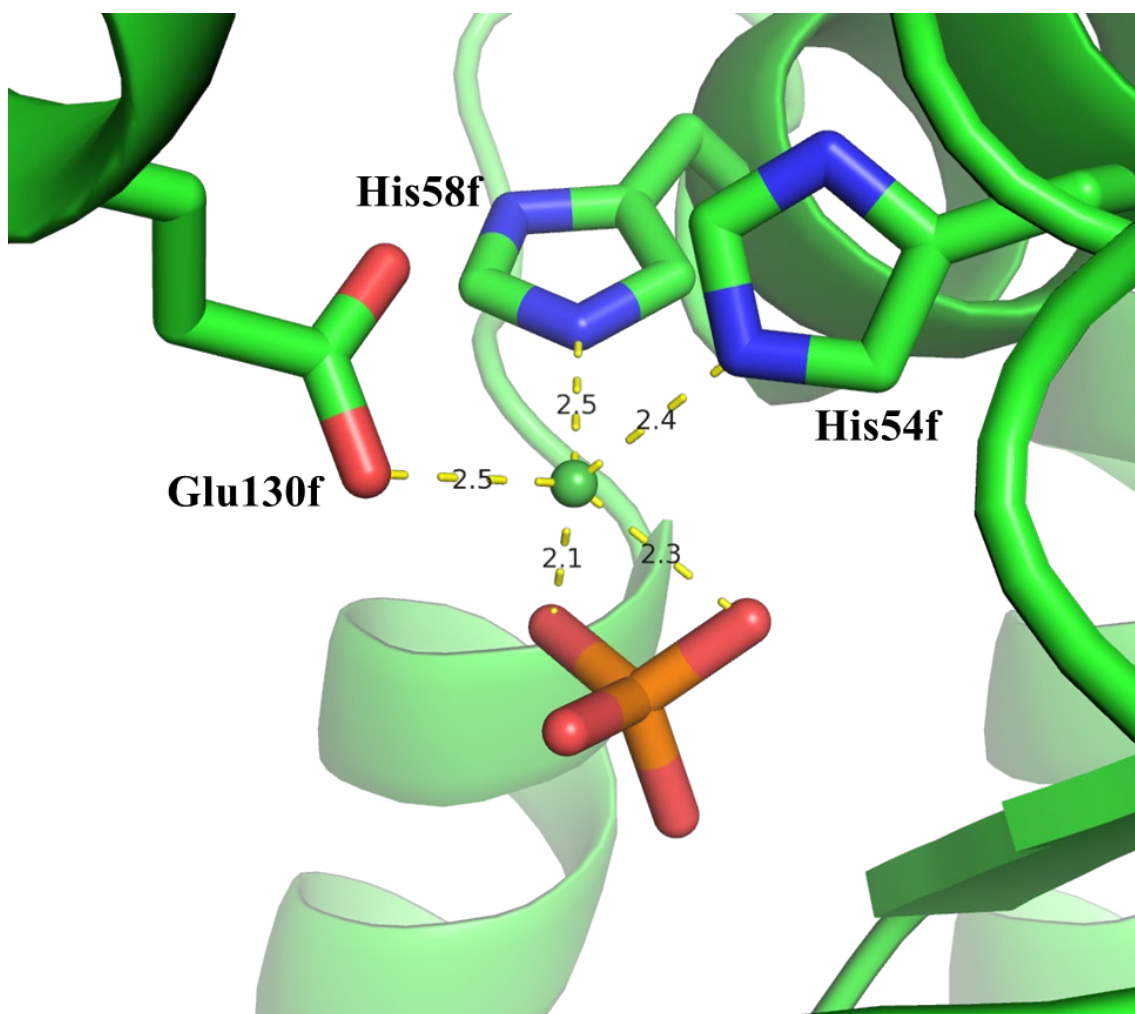


図 27. Qt-AlbF の金属イオン結合モチーフ

タンパク質はリボンモデルで表示され、金属イオンの配位に関与する残基はスティックで表示されている。炭素原子は緑色、酸素原子は赤色、窒素原子は青色、リン原子はオレンジ色で色づけられている。Ni イオンは緑色の球で表示されている。各原子間の距離 (Å) を図中に示している。

3-5. Qt-AlbEF 変異体の結晶構造

Qt-AlbEF とサブチロシン前駆体との複合体の構造を解析するため、Qt-AlbEF の不活性変異体を作成した。Qt-AlbF において保存されている亜鉛結合モチーフ HxxEH に含まれている His54 ならびに His58 を Ala に置換した変異体タンパク質 (Qt-AlbF_H54A_H58A) を発現するためのプラスミドを作製し、野生型と同様の手法によって、Qt-AlbEF (F_H54A_H58A) 変異体タンパク質を精製した。サブチロシン前駆体の代わりに、その N 末端から 13 残基 (SboN13: 配列 EKGIMVANKGCSA) あるいは C 末端から 11 残基 (SboC11: 配列 MGITGTFGISG) のアミノ酸配列を有する合成ペプチドを用いた。結晶化の際に、これらの合成ペプチドを加えて、ペプチド鎖がどのように基質結合チャンバーに結合しているのかを明らかにしようと試みた。Qt-AlbEF (F_H54A_H58A) 変異体タンパク質の結晶は野生型と同様の結晶化条件で得られ (図 28)、野生型と同様の手順で構造解析を行った。最終的には Qt-AlbEF とペプチド SboN13 およびペプチド SboC11 との共結晶化条件で得られたタンパク質結晶を用いて、Qt-AlbEF (F_H54A_H58A) 変異体の結晶構造を 2.10 Å 分解能で決定した (表 1、表 3、図 29)。

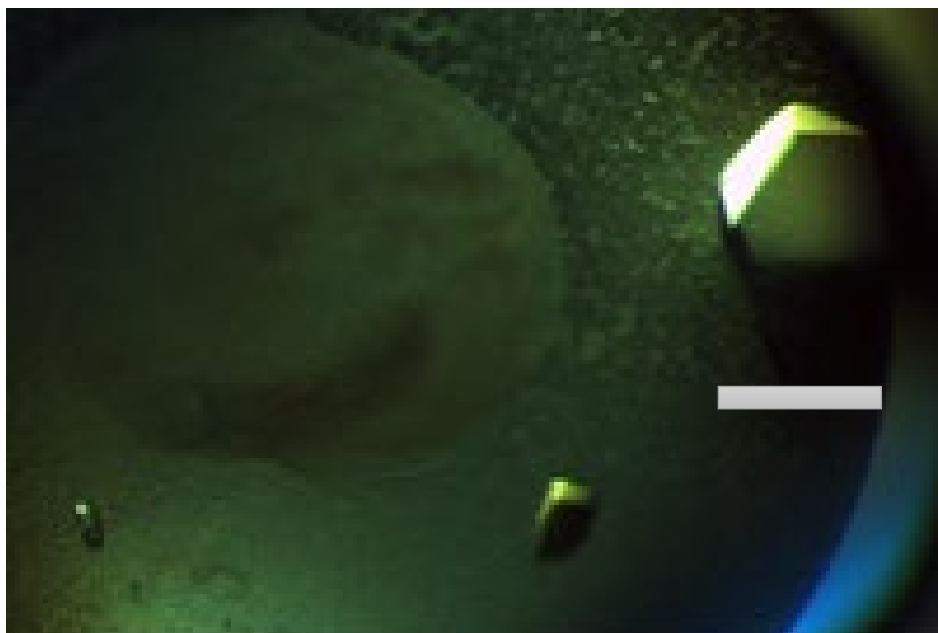


図 28. Qt-AlbEF 変異体とペプチドとの共結晶化条件で観察された結晶
スケールバーは 100 μm を表している。

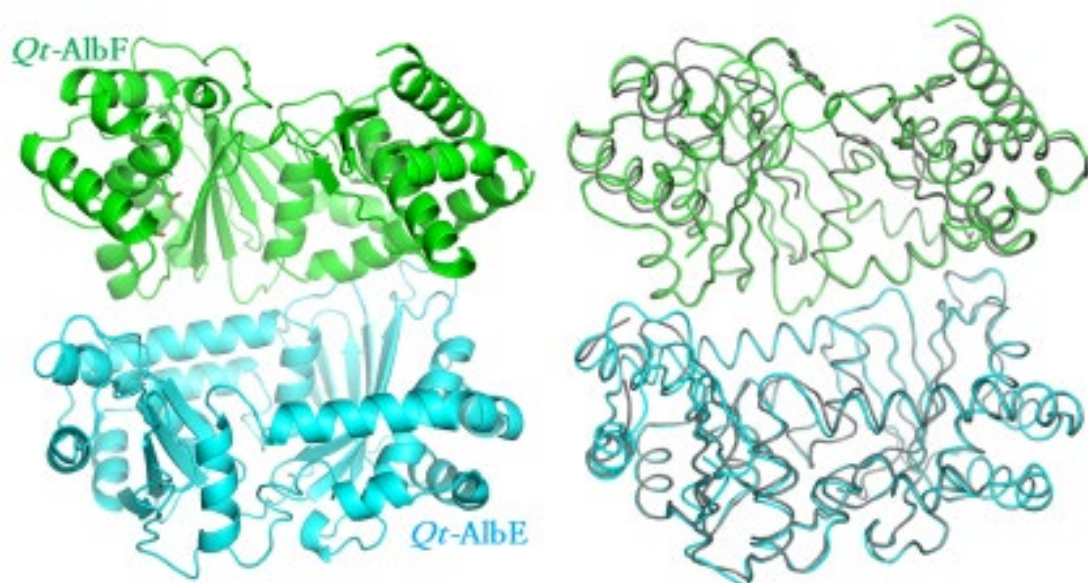


図 29. Qt-AlbEF 複合体の変異体の結晶構造（左）と野生型との重ね合わせ（右）
タンパク質は主鎖をリボンで表示され、Qt-AlbE はシアン色、Qt-AlbF は緑色で色づけられ
おり、野生型の Qt-AlbEF の結晶構造は灰色で表示されている。

Qt-AlbEF (F_H54A_H58A) は野生型 Qt-AlbEF と同様に結晶学的非対称単位中に 2 種類のポリペプチド鎖 (Qt-AlbE および Qt-AlbF_H54A_H58A) が含まれていた。野生型 Qt-AlbEF の結晶構造との重ね合わせを行ったところ、RMSD (平均二乗偏差) 値は 557 個の C α 原子に対して 0.32 Å であり、実質的に同一の構造をしていた。基質前駆体として加えた合成ペプチドの電子密度は SboN13、SboC11 とも観察されなかった。これは、合成ペプチドが短く基質結合ポケットに結合するのに十分な親和性を持っていなかったこと、活性部位の His が Ala になったことにより表面構造が変化しペプチドが結合できなかったこと、あるいは Qt-AlbEF はチオエーテル架橋が形成されたサブチロシン前駆体の全体構造を認識して結合することなどの理由によるものと考えられる。

Qt-AlbF 鎖において Ala へ置換した 54 番目および 58 番目の残基では、野生型と比較して側鎖にあたる電子密度が明確に小さくなっており Ala に置換されていることが確認できた (図 30)。Ala への置換の影響により、金属イオンの電子密度も観察されなくなった。また、金属イオンの配位に関わる残基の 1 つである Glu130f の側鎖の配置は野生型のものとは異なり、この残基を含む Gln117f-Asn132f の α ヘリックスはタンパク質中心から外側へシフトしていることが明らかになった (図 31)。

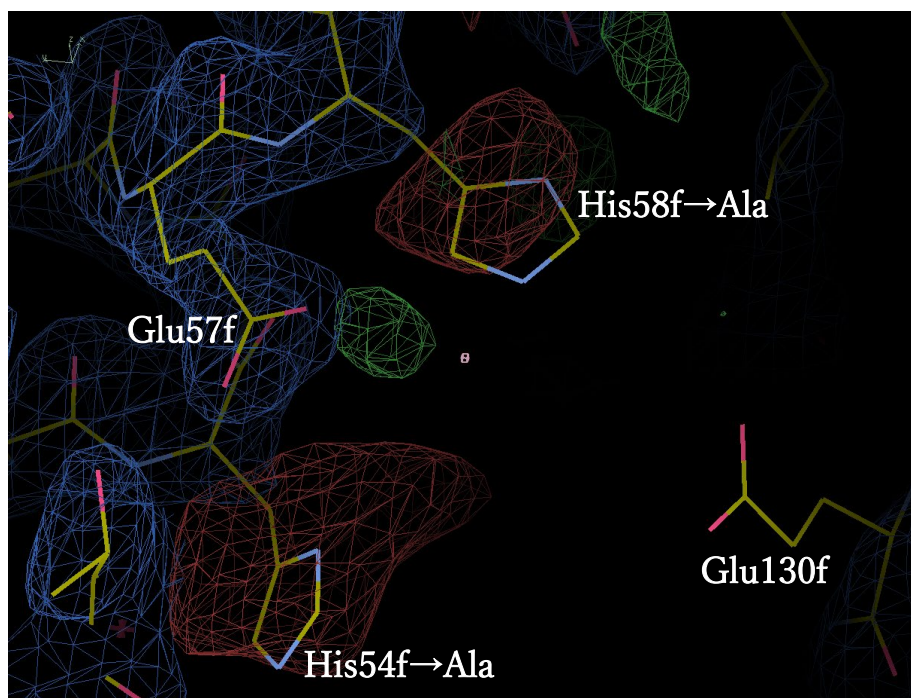


図 30. Qt-AlbEF 変異体における金属イオン結合部位周辺の電子密度

アミノ酸残基はスティックとして表示されており、炭素、酸素、窒素はそれぞれ黄色、赤色、青色で色づけられている。2*Fo-Fc* 電子密度マップは 2.0 σ で青メッシュとして、*Fo-Fc* 電子密度マップは 3.0 σ で緑メッシュと赤メッシュとして表示されている。変異導入によって Ala54 および Ala58 となっているため野生型 (His54 および His58) をモデルとして計算すると赤メッシュで示されるように *Fo-Fc* 電子密度における負のピークが観察される。

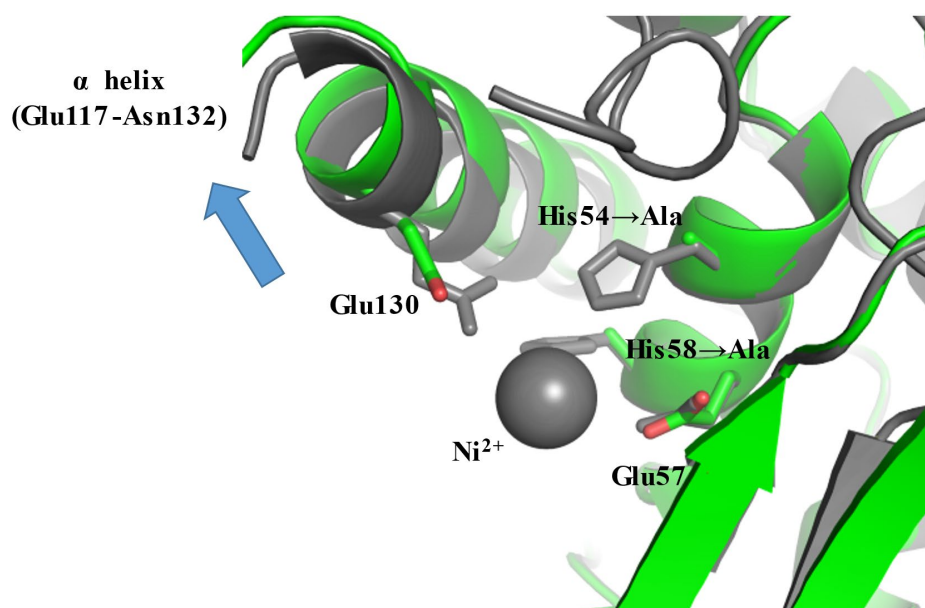


図 31. Qt-AlbF の金属イオン結合部位周辺の立体構造変化

タンパク質の主鎖はリボンで表され、変異体は緑色、野生型を灰色で表示している。金属イオンの配位に関与する残基の側鎖はスティックで表示されている。変異体の酸素原子は赤色で色付けられている。野生型で観察されたニッケルイオンは灰色の球で表示されている。

さらに特徴的なこととして、Qt-AlbF の Gly42f-His49f、Glu148f-Arg164f、Val217f-Asn220f の各領域については野生型とは異なる構造をしていることが明らかになった (図 32A)。Gly42f-His49f の領域については、野生型ではループ構造で特定の二次構造を形成していなかったが、変異体では明確に α ヘリックスを形成していた。Glu148f-Arg164f の領域では、野生型では Ala156f-Arg161f の範囲で α ヘリックスを形成しているが、変異体では Ala134f-Ser155f の範囲には解釈可能な電子密度が観察されず構造的に揺らいでいることが予想された。一方で Val217f-Asn220f は、野生型では解釈可能な電子密度が観察されず構造的に揺らいでいたが、変異体では明確な電子密度が観察された。

これらの構造的差異は、His54 および His58 の Ala への置換により Qt-AlbF の金属イオン結合能が欠失したこととともなって、局所的な構造の安定性が低下したことに起因すると考えられる。変異体において、金属イオンと配位しなくなった Glu130f を含む α ヘリックスが外側へシフトすることによって生じる、隣接した α ヘリックスとループを含む領域 (Glu148f-Arg164f) との立体障害を軽減するためにこのヘリックスを含む領域が Glu130f を含む α ヘリックスから遠ざかる。さらに野生型において電子密度が観察されていた Glu130f-Ser154f の領域は変異体では金属イオンとの配位などの分子内接触が減少したことで構造的に不安定になり α ヘリックスが短くなったと考えられる (図 32B)。結果として His49f の側鎖は Ser158f 側鎖との立体障害を回避するために側鎖の配向を変化させる (図 32B, C)。さ

らに、Tyr48f 側鎖は His49f 側鎖との立体障害を回避するために側鎖の配向を変え、His49f ならびに Tyr48f の側鎖の配向が変化することで Gly42f-His49f の領域において α ヘリックスが形成される (図 32C)。Tyr48f 側鎖は隣接するループ領域をわずかにシフトさせる。この他、Glu148f-Arg164f の領域で α ヘリックスが短くなったこと (図 32B) に起因して、Cys151f 側鎖との立体障害が緩和されることで Val217f-Asn220f の領域は構造の不安定性が低下し、モデルを構築可能な電子密度が観察できるようになったと考えられる (図 32D)。

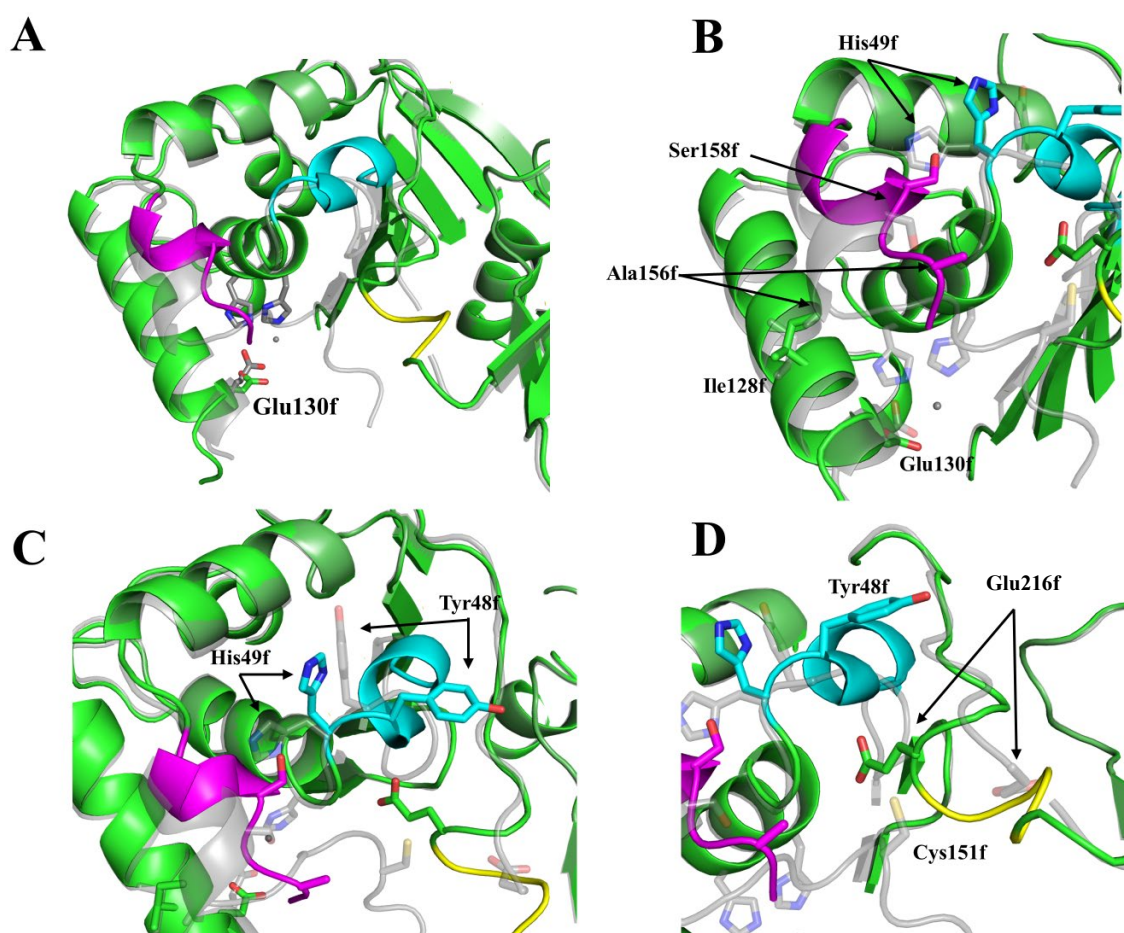


図 32. Qt-AlbEF と変異体の構造の重ね合わせ

A-D: タンパク質の主鎖はリボンで表され、変異体は緑色、野生型を灰色で表示している。Gly42f-His49f、Glu148f-Arg164f、Val217f-Asn220f の領域はそれぞれ、シアン色、マゼンタ色、黄色で表している。構造変化に関与する側鎖はスティックで表示されている。変異体の酸素原子、窒素原子、および硫黄原子はそれぞれ赤色、青色、そして黄色で色づけられている。

これらの活性部位周辺の構造の変化は基質との親和性を変化させるため、Qt-AlbEF 複合体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可能性がある。

3-6. Qt-AlbE と他の M16 亜鉛プロテアーゼとの構造比較

構造的相同性検索プログラムである DALI⁴⁴ を用いて、Qt-AlbE あるいは Qt-AlbF について、構造的に類似したタンパク質を検索した。

Qt-AlbE については、*E. faecalis* V583 由来の特徴付けされていないタンパク質 (PDB code 3D3Y, 以下 3D3Y と呼称) や *A. acidocaldarius* 由来の推定ペプチダーゼ M16 ドメインタンパク質 (PDB code 4XEA, 以下 4XE4 と呼称) との構造的相同性が示唆された (Z-Score > 20)。この他、酵母由来のシトクロム *bc₁* 複合体 (例: 酵母ミトコンドリアシトクロム *bc₁* 複合体サブユニット 2, PDB code 1EZV) とともに低い構造的相同性を示した (表 5)。

表 5. Qt-AlbE における DALI を用いた立体構造に基づく相同性検索の結果

	PDB code : Chain ID	RMSD (Å)	Cα atoms	Z-score	Protein
1	3D3Y: A	3.2	336	24.8	Uncharacterized
2	4XEA: A	4.3	313	20.4	Peptidase
3	3AMI: A	4.0	315	20.1	Protease
4	7JRG: A	3.7	318	19.3	Peptidase
5	3AMJ: B	4.0	319	19.2	Peptidase
6	4RPU: A	4.3	326	17.7	Protease
7	2G49: A	4.0	315	15.4	Peptidase
8	1EZV: B	4.1	279	13.6	Cytochrome <i>bc₁</i>
9	3IVL: A	2.9	141	12.9	Protease
10	5CIO: A	4.7	269	11.4	Peptidase

Qt-AlbE と 3D3Y の間の構造の重ね合わせの RMSD 値は 6.69 Å (257 個の Cα 原子) であった。3D3Y と 4XEA 間の構造の重ね合わせの RMSD 値は 3.65 Å (278 Cα)、Qt-AlbE と 4XEA 間の重ね合わせの RMSD 値は 13.56 Å (88 Cα) であった。すなわち、Qt-AlbE と 3D3Y や 3EOQ とは、基本的な骨格構造は類似しているものの相違点が多いことが分かった。例えば、Qt-AlbE と 3D3Y を比較すると、タンパク質の中央に位置する基質結合部位の一部と考えられる領域では、3D3Y の方がやや広く深いポケットを形成する。ポケット周辺は、どちらのタンパク質も正に帯電していた。(図 33)。

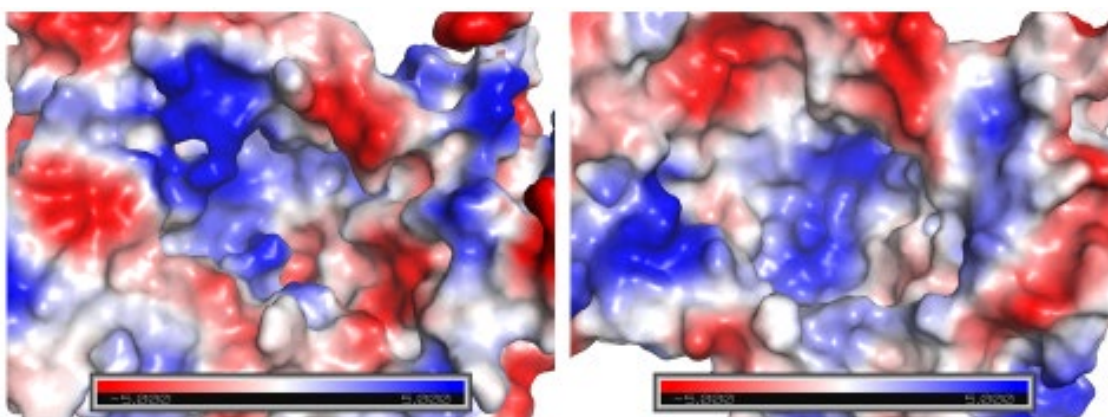


図 33. 基質結合ポケットの静電ポテンシャル図

Qt-AlbE (左)、3D3Y (右) について赤色 -5 kT/e ~ 青色 5 kT/e で示されている。

さらに詳細に立体構造を比較するために、PDBsum を用いて二次構造トポロジー図を作製した (図 34、図 35)。M16B サブファミリーは、約 30 アミノ酸残基の長いリンカーによって、それぞれ約 200 アミノ酸残基からなる N 末端側のドメイン 1 と C 末端側のドメイン 2 に分けられる。二次構造トポロジー図と三次元構造を比較すると、Qt-AlbE も 3D3Y と同様に、それぞれ 200 アミノ酸残基前後のドメイン 1 とドメイン 2 から構成されている。ドメイン 1 については 6 本の β ストランドからなる β シートの外側を 9 本の α ヘリックスが取り囲む構造をしているが、 β シートを構成する β ストランドの並び方や向きは表 6 に示すように Qt-AlbE と 3D3Y の間で異なっていた。ドメイン 2 に関しては β ストランドの並び方や向きに違いはなかったが、Qt-AlbE では 3D3Y などの他のプロテアーゼにも観察される 1 本目の β ストランドが欠失していた (表 7)。すなわち、Qt-AlbE と 3D3Y の構造の比較から、全体的な構造は類似しているが、二次構造のトポロジーが異なることが明らかになった。

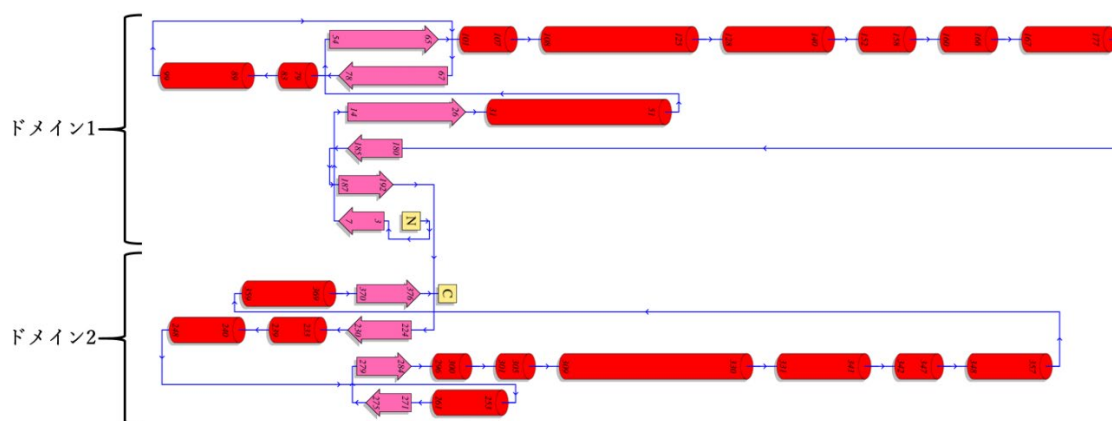


図 34. Qt-AlbE の二次構造トポロジー図

β ストランドは矢印、 α ヘリックスは円柱で表現されており、N 末端と C 末端は N と C でラベルされている。

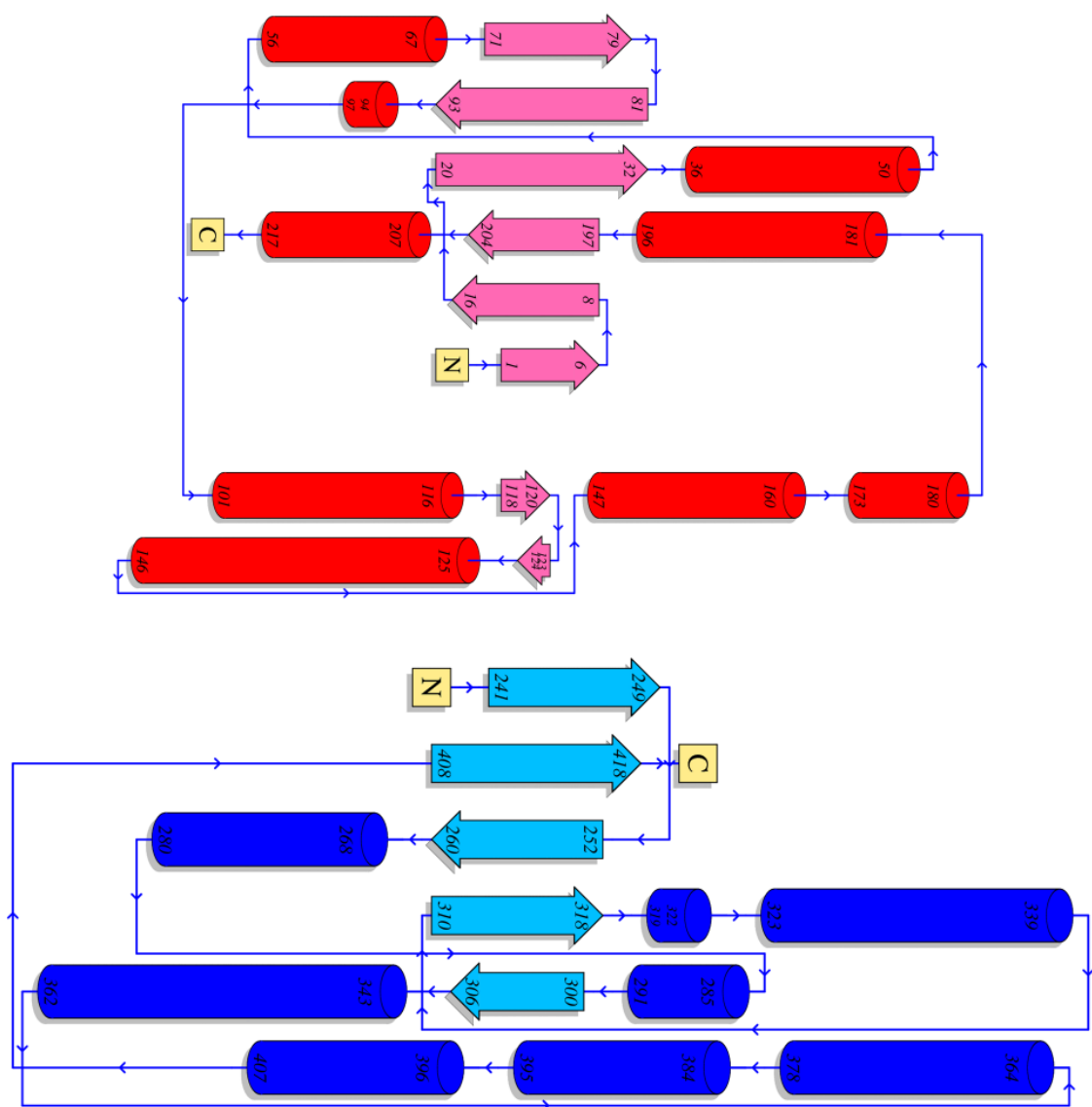


図 35. 3D3Y の二次構造トポロジー図

1-217 (赤色)、241-418 (青色) がそれぞれドメイン 1 とドメイン 2 を示している。218-240 はドメイン間をつなぐ長いループで二次構造トポロジーでは省略されている。

表 6. Qt-AlbE と 3D3Y におけるドメイン 1 の N 末端からの β ストランドの並び方と方向性
数字と矢印は最も N 末端にある β ストランドを 1 本目とした時に、どのような順序で何本目の β ストランドが $\beta 1$ に対して平行 (\uparrow) あるいは逆平行 (\downarrow) であるかを示している。

Qt-AlbE	1	6	5	2	4	3
	\uparrow	\downarrow	\uparrow	\downarrow	\uparrow	\downarrow
3D3Y	1	2	6	3	5	4
	\uparrow	\downarrow	\downarrow	\uparrow	\downarrow	\uparrow

表 7. Qt-AlbE と 3D3Y におけるドメイン 2 の N 末端からの β ストランドの並び方と方向性
数字と矢印は 3D3Y を基準として最も N 末端にある β ストランドを 1 本目とした時に、どのような順序で何本目の β ストランドが $\beta 1$ に対して平行 (\uparrow) あるいは逆平行 (\downarrow) であるかを示している。

Qt-AlbE		5	2	4	3
		\uparrow	\downarrow	\uparrow	\downarrow
3D3Y	1	5	2	4	3
	\uparrow	\uparrow	\downarrow	\uparrow	\downarrow

続いて、Qt-AlbF についての構造比較を行った。DALI 検索の結果、Qt-AlbE と同様に様々な生物種のペプチダーゼと相同性を示すことが明らかになった (表 8)。Qt-AlbE における相同性検索の結果、相同性が高いとされた *A. acidocaldarius* 由来の推定ペプチダーゼ M16 ドメインタンパク質 (PDB code 4XEA) や *Sphingomonas* SP. A1 由来の M16B ペプチダーゼのヘテロダイマーの触媒サブユニット (PDB code 3AMJ) も含まれる (Z-Score > 20)。

表 8. Qt-AlbF における DALI を用いた立体構造に基づく相同性検索の結果

	PDB code : Chain ID	RMSD (Å)	Ca atoms	Z-score	Protein
1	4XEA: A	3.4	325	25.9	Peptidase
2	3AMI: A	3.3	326	25.9	Peptidase
3	7JRG: A	3.1	307	24.9	Peptidase
4	3AMJ: B	3.4	311	22.0	Peptidase
5	6B03: A	3.9	318	20.6	Protease
6	2G49: A	3.5	314	20.6	Peptidase
7	5CIO: A	4.1	295	19.7	Peptidase
8	1EZV: B	3.3	270	18.8	Cytochrome <i>bc</i> ₁
9	4RPU: A	3.2	319	17.2	Protease
10	3S5M: A	3.4	321	16.2	Peptidase

以下の構造比較においては *Sphingomonas* SP. A1 由来の M16B ペプチダーゼのヘテロダイマーの触媒サブユニット (3AMJ と呼称) を類似タンパク質の代表として用いた。Qt-AlbE と同様に PDBsum を利用して Qt-AlbF と 3AMJ の二次構造トポロジー図を作製し (図 36、図 37)、結晶構造および二次構造トポロジー図を用いて両者を比較した。

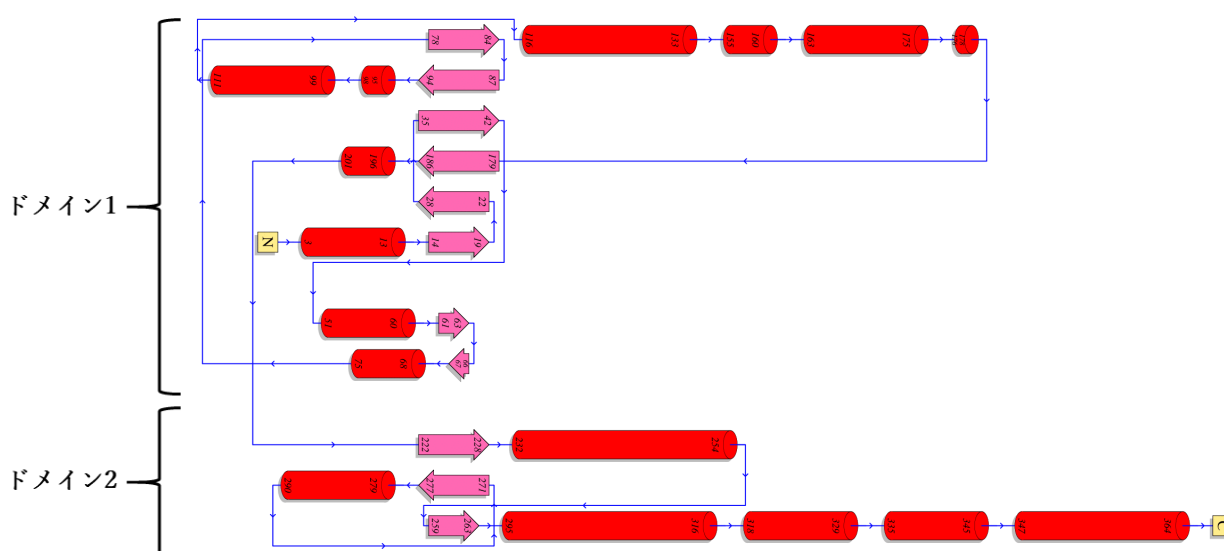


図 36. Qt-AlbF の二次構造トポロジー図

β ストランドは矢印、α ヘリックスは円柱で表現されており、N 末端と C 末端は N と C でラベルされている。

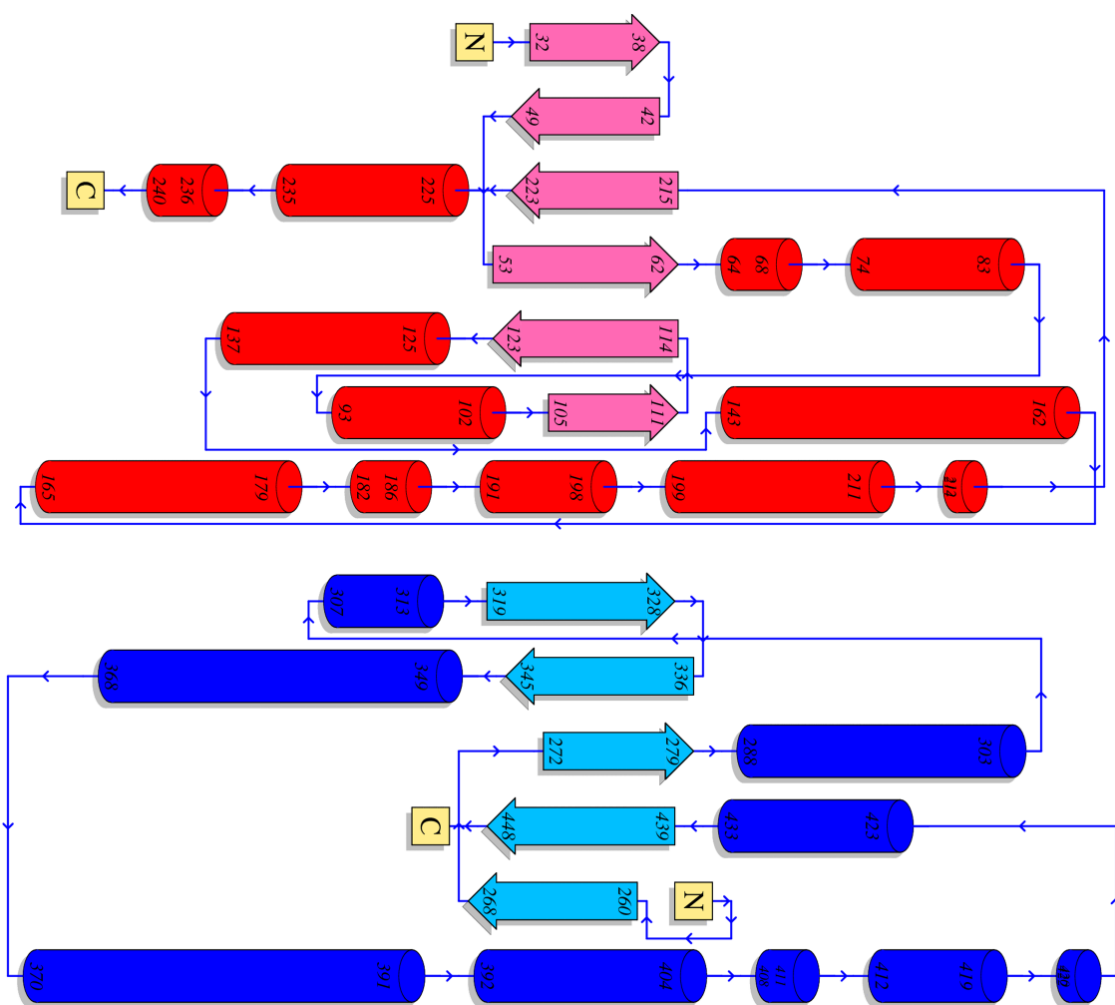


図 37. 3AMJ の二次構造トポロジー図

32–240 (赤色)、260–448 (青色) がそれぞれドメイン 1 とドメイン 2 を示している。241–259 はドメインをつなぐ長いループで二次構造トポロジーでは省略されている。

Qt-AlbE と同様に Qt-AlbF もドメイン 1 とドメイン 2 で構成されることが示唆された。Qt-AlbF のドメイン 1 は 6 本の β ストランドから形成される β シート構造を α ヘリックスが取り囲む構造をしており、Qt-AlbF のドメイン 1 においては、 β ストランドの並び方や向きは 3AMJ と同様であった（表 9）。実際に Qt-AlbF のドメイン 1（1–201）の範囲で 3AMJ の構造と重ね合わせの RMSD 値は 1.32 Å（101 C α 原子）であり、互いに非常に類似した立体構造をとっていた。

表 9. Qt-AlbF と 3AMJ におけるドメイン 1 の N 末端からの β ストランドの並び方と方向性
数字と矢印は最も N 末端にある β ストランドを 1 本目とした時に、どのような順序で何本目の β ストランドが $\beta 1$ に対して平行（↑）あるいは逆平行（↓）であるかを示している。

Qt-AlbF	1	2	6	3	5	4
	↑	↓	↓	↑	↓	↑
3AMJ	1	2	6	3	5	4
	↑	↓	↓	↑	↓	↑

一方で、ドメイン 2 の比較において、Qt-AlbF と他の M16B 亜鉛プロテアーゼとの間で差異が確認された。他の M16B 亜鉛プロテアーゼのドメイン 2 は、3AMJ と同様に 5 本の β ストランドを α ヘリックスが取り囲む構造をしている。しかしながら、Qt-AlbF においては、 β ストランドは 3 本のみであり、他の M16B 亜鉛プロテアーゼのドメイン 2 における β ストランドの 1 本目と 5 本目が欠失していることが明らかになった（表 10、図 38）。このような欠失は、ドメイン 2 でのアミノ酸配列相同性が低いことから、配列比較からは推定できず、本研究における構造解析によって明らかにすることができた。

表 10. Qt-AlbF と 3AMJ におけるドメイン 2 の N 末端からの β ストランドの並び方と方向性
数字と矢印は最も N 末端にある β ストランドを 1 本目とした時に、どのような順序で何本目の β ストランドが $\beta 1$ に対して平行（↑）あるいは逆平行（↓）であるかを示している。

Qt-AlbF			1	3	2
			↑	↓	↑
3AMJ	1	5	2	4	3
	↓	↓	↑	↓	↑

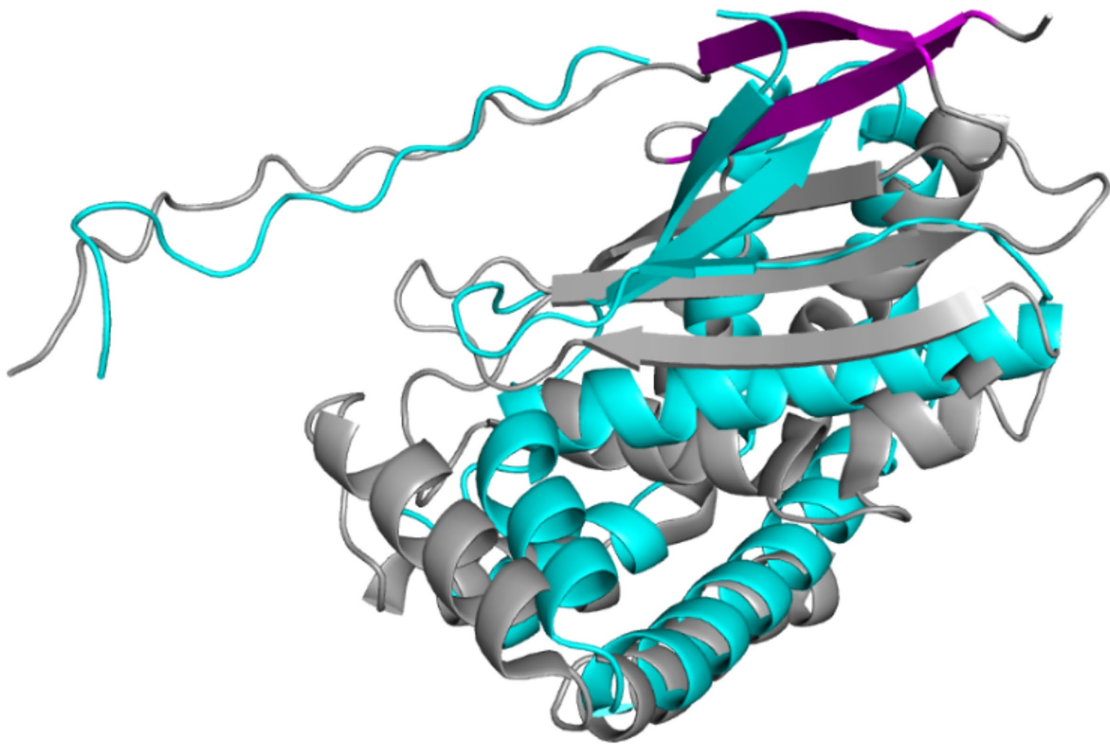


図 38. Qt-AlbF と 3AMJ のドメイン 2 領域

Qt-AlbF はシアン色、3AMJ は灰色で示してあり、3AMJ の β ストランド 1 及び 5 はマゼンタで示している。

また、Qt-AlbF と 3AMJ の間で基質結合ポケットを比較すると、3AMJ のドメイン 2 における長い β ストランドによって、3AMJ の方がより深く広いポケットを形成していた。また Qt-AlbF は、3AMJ と比較してポケット全体が負に帯電していることが明らかになった (図 39)。

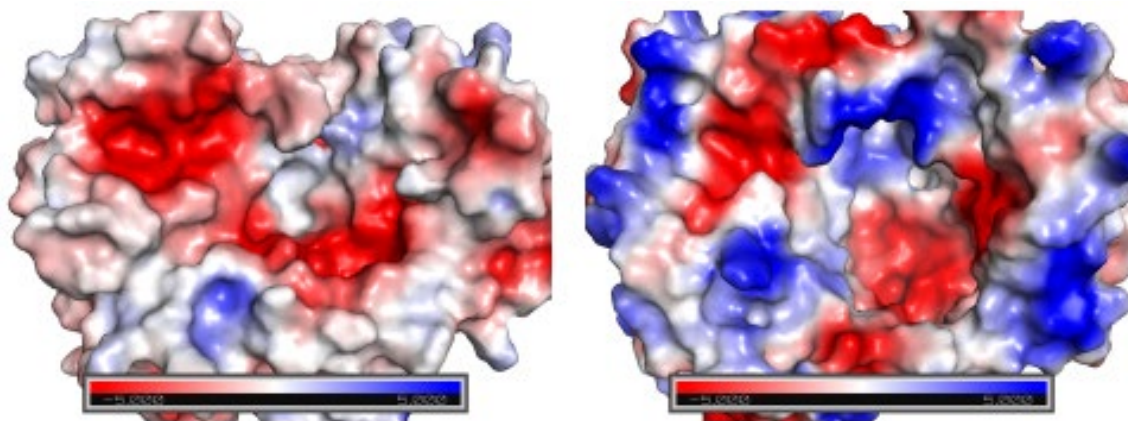


図 39. 基質結合ポケットの静電ポテンシャル図

Qt-AlbF (左)、3AMJ (右) について赤色 -5 kT/e ~ 青色 5 kT/e で示されている。

ここまでの構造比較の結果をまとめると、*Q. thermotolerans* 由来の AlbEF ホモログは立体構造既知の亜鉛プロテアーゼと全体的な構造は類似しているものの、Qt-AlbE のドメイン 1 では β ストランドのトポロジーが異なり、Qt-AlbF のドメイン 2 では β ストランドが一部欠失しているといった違いが明らかとなった。これらの差異は、他のメタロプロテアーゼとは異なり、サブチロシン前駆体のみを基質とする Qt-AlbEF の基質特異性の高さに起因すると考えられる。すなわち、基質に対する親和性を高める目的に加えて、リーダーペプチド切断の際に加水分解反応が進行しないよう基質結合チャンバーから水を排除するために、Qt-AlbEF では他のメタロプロテアーゼと比較して一部の構造が欠失することで、全体としてコンパクトな基質結合チャンバーを形成している可能性が考えられる。このとき、Qt-AlbE 側のポケットは比較的に正に帯電し、Qt-AlbF 側のポケットは広く負に帯電している。基質の電荷分布に関しては、*B. subtilis* 由来のサブチロシンの静電ポテンシャルを計算すると、正電荷を持つ領域と負電荷を持つ領域に分かれることが明らかとなった (図 40)。また、*B. subtilis* 由来のサブチロシンを基に *Q. thermotolerans* サブチロシン (Qt-サブチロシン) モデルを作製したところ (図 41)、図 11 のアミノ酸配列比較に示されるように、電荷が変化するようなアミノ酸残基の違いはないため、両者は類似した表面電荷分布となった。

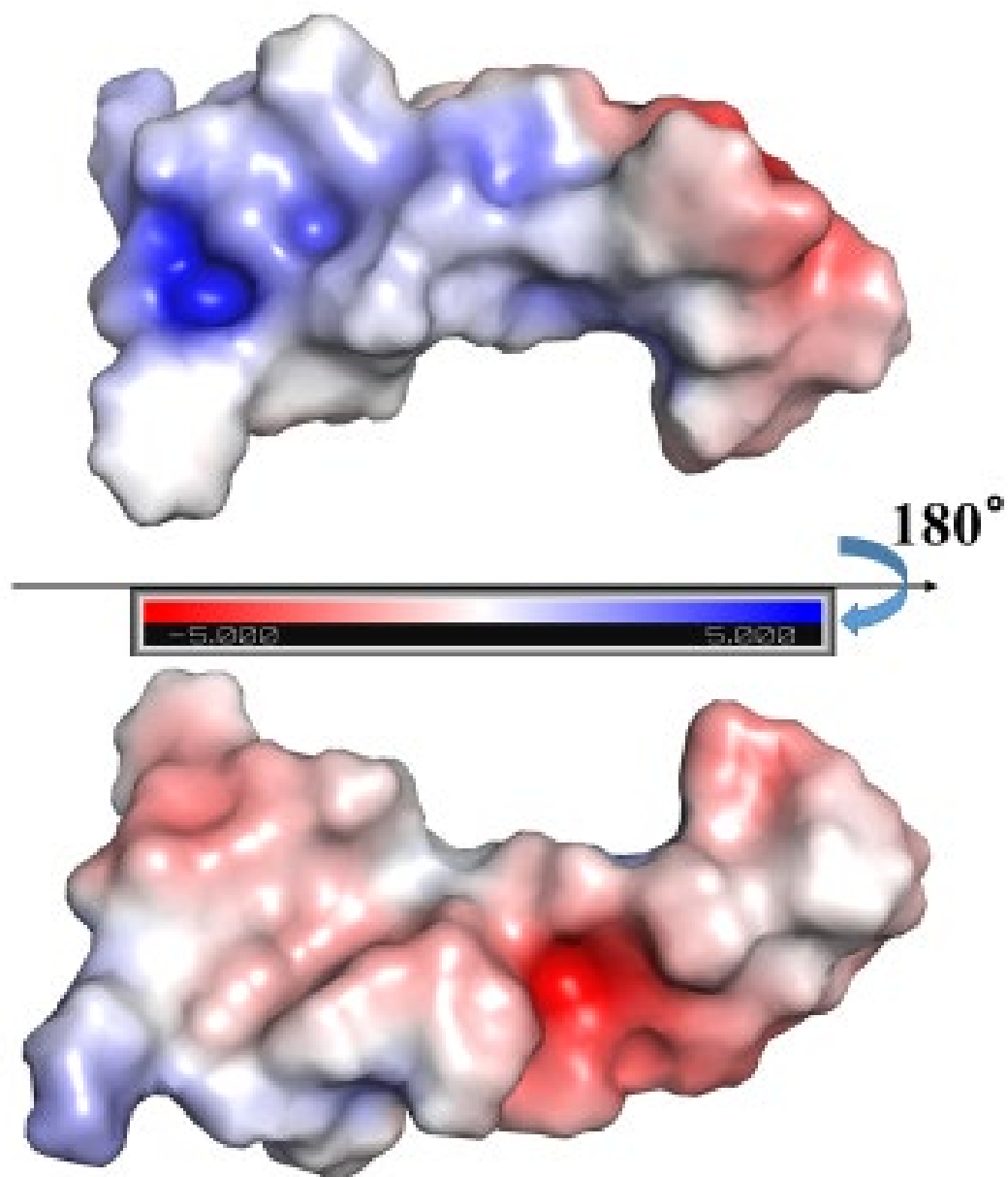


図 40. *B. subtilis* 168 株由来のサブチロシン (PDB code 1PXQ) の静電ポテンシャル図
赤色 -5 kT/e ~ 青色 5 kT/e で示されている。

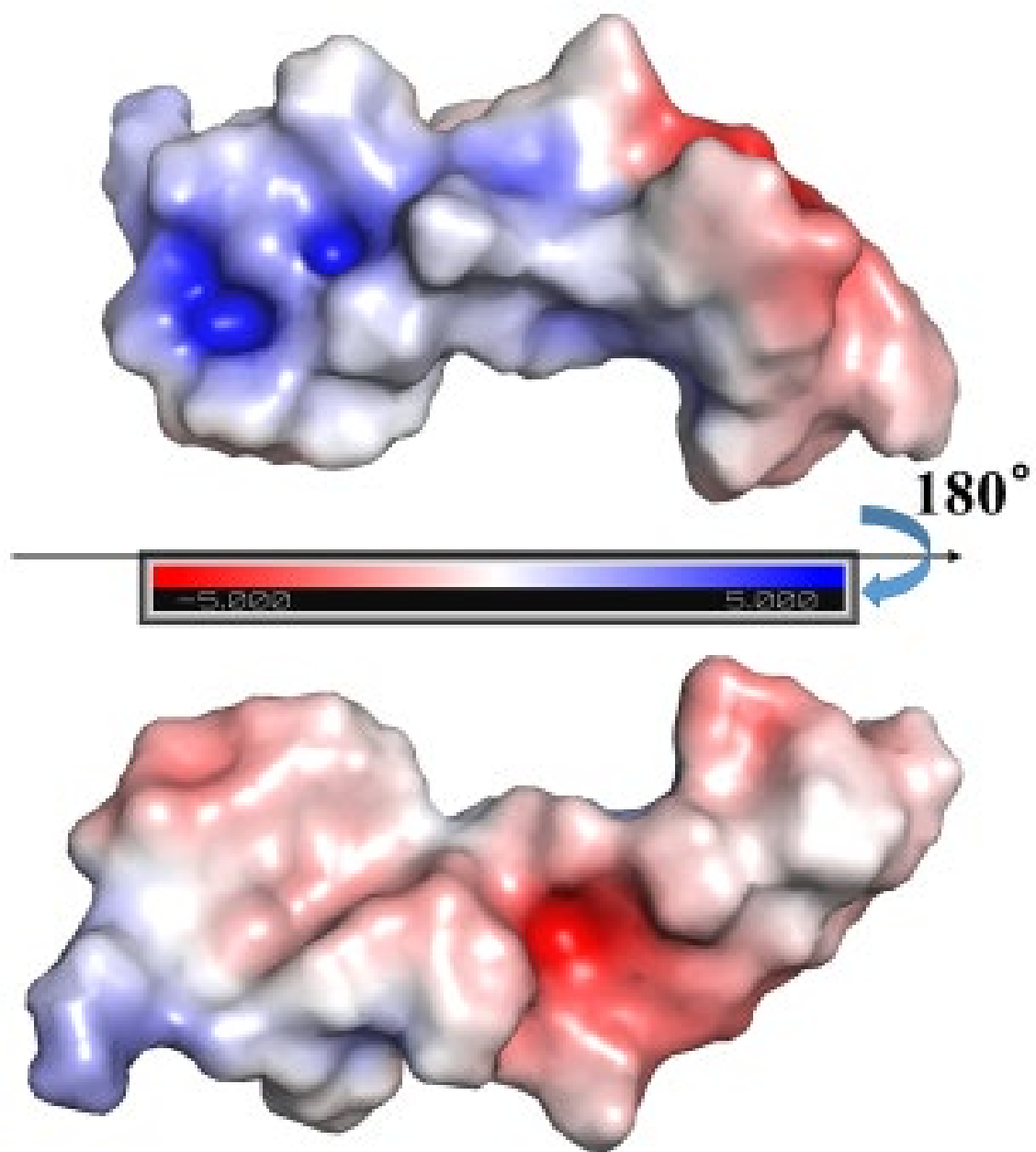


図 41. *Q. thermotolerans* のサブチロシンモデルの静電ポテンシャル図
赤色 -5 kT/e ~ 青色 5 kT/e で示されている。

3AMJ の結晶構造にはオープン型およびクローズ型の SPH2861/SPH2862 複合体が含まれている。クローズ型の SPH2861/SPH2862 複合体の構造を詳細に解析すると、活性部位から分子表面に向かって、ペプチド基質が出入りするようなチャンネルが存在していることが見出された。Qt-AlbEF についてもクローズ型へと構造変化した際には、リーダーペプチドが切断される前にリーダーペプチドがチャンネルに沿う形で結合し、活性部位においてペプチド結合の切断が起きた後、リーダーペプチドだけが溶媒中へと遊離する機構が考えられる。そこで、Qt-AlbEF と SPH281/SPH2862 構造の重ね合わせから、Qt-AlbEF がクローズド型の形態変化をした際に、チャンネルを構成しうる残基を推定した。まず 3AMJ の活性サブユニットでは、Phe84、Lys85、Gly93、Ser96、Asn107、Glu150、Val153 がチャンネルを構成している。構造の重ね合わせから Phe61f (Phe84)、Trp62f (Lys85)、Tyr69f (Ser96)、Asn80f (Asn107)、Glu123f (Glu150)、Ile126f (Val153) では同一アミノ酸残基あるいは性質の近いアミノ酸残基であるため、これらが Qt-AlbF においてチャンネルを構成し得る残基であることが示唆された (図 42)。Qt-AlbF においては Gly93 に対応する残基は存在しなかったが、Trp62f の側鎖が Lys85 や Gly93 両方の役割に相当する可能性が示唆された。一方で Qt-AlbE は 3AMJ の非活性サブユニットとの相同性が低く、重ね合わせは困難であった。3AMJ の非活性サブユニットのチャンネルを構成する残基は主に、ドメイン 2 の $\beta 2$ ストランドと $\beta 3$ ストランドの間に存在する $\alpha 1$ ヘリックス上に集中している (図 43)。Qt-AlbE のドメイン 2 のこれらの領域においては、Tyr251e、His253e、Leu256e、Leu260e、Asp264e、Phe267e などの残基が存在しており (図 44)、これらの残基が Qt-AlbEF 複合体のオープン型からクローズ型への構造変化の際にチャンネル形成に関与する可能性がある。

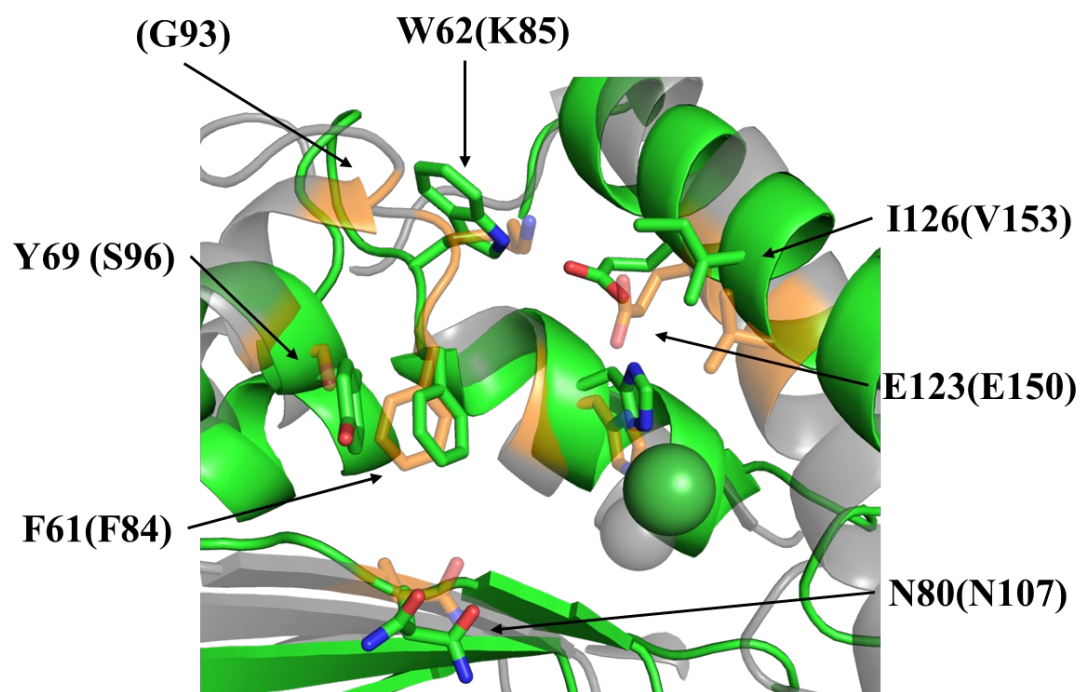


図 42. Qt-AlbF のチャンネルを構成すると考えられる残基

タンパク質の主鎖はリボンで表され、Qt-AlbF は緑色、3AMJ を灰色、3AMJ におけるチャンネル形成に関与する領域はオレンジ色で表示されており、チャンネル形成に関与する残基はスティックで表示されている。酸素原子と窒素原子はそれぞれ赤色と青色で色付けられている。Qt-AlbF で観察されたニッケルイオンは緑色の球で、3AMJ の亜鉛イオンは灰色の球で表示されている。

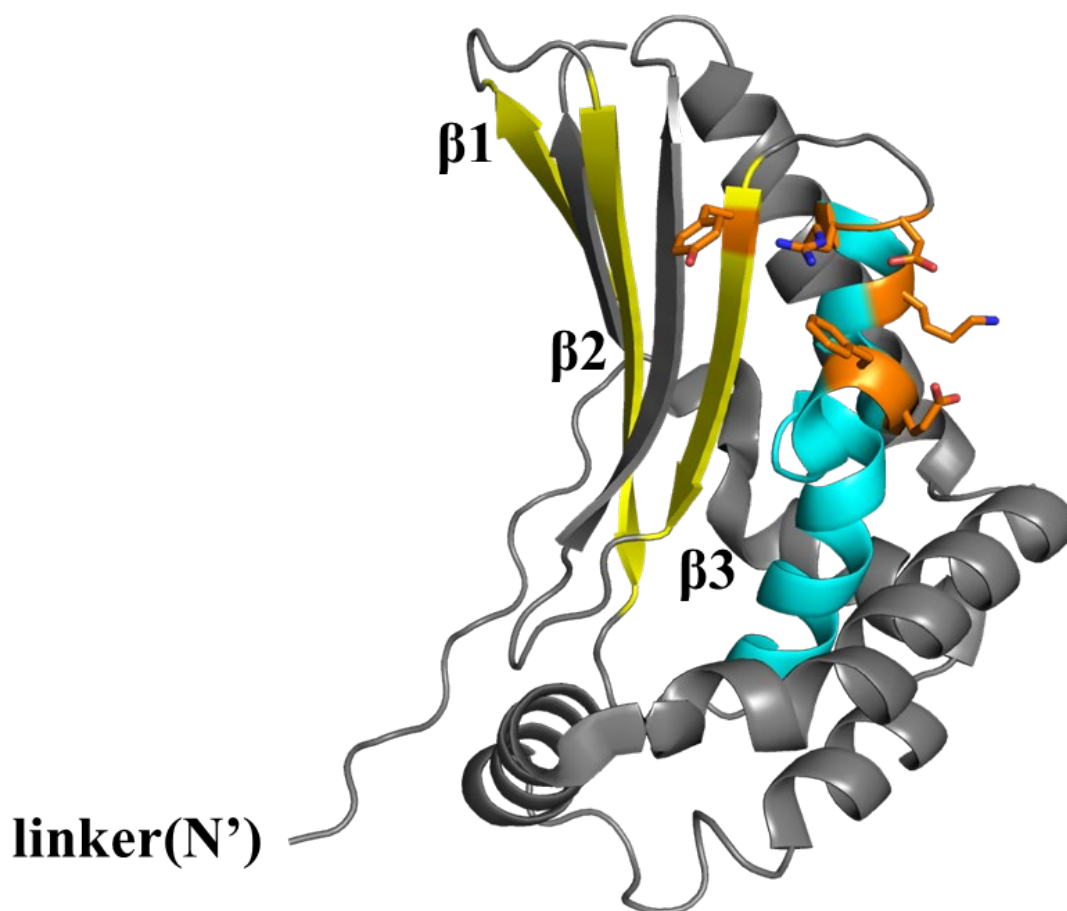


図 43. 3AMJ の非活性サブユニットのチャンネルを構成する残基。
 タンパク質の主鎖はリボンで表され、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ ストランドは黄色、 $\beta 2$ ストランドと $\beta 3$ ストランドに挟まれた $\alpha 1$ ヘリックスはシアン色、チャンネル形成に関与する残基はオレンジ色のスティックで表示されている。酸素原子と窒素原子はそれぞれ赤色と青色で色付けられている。

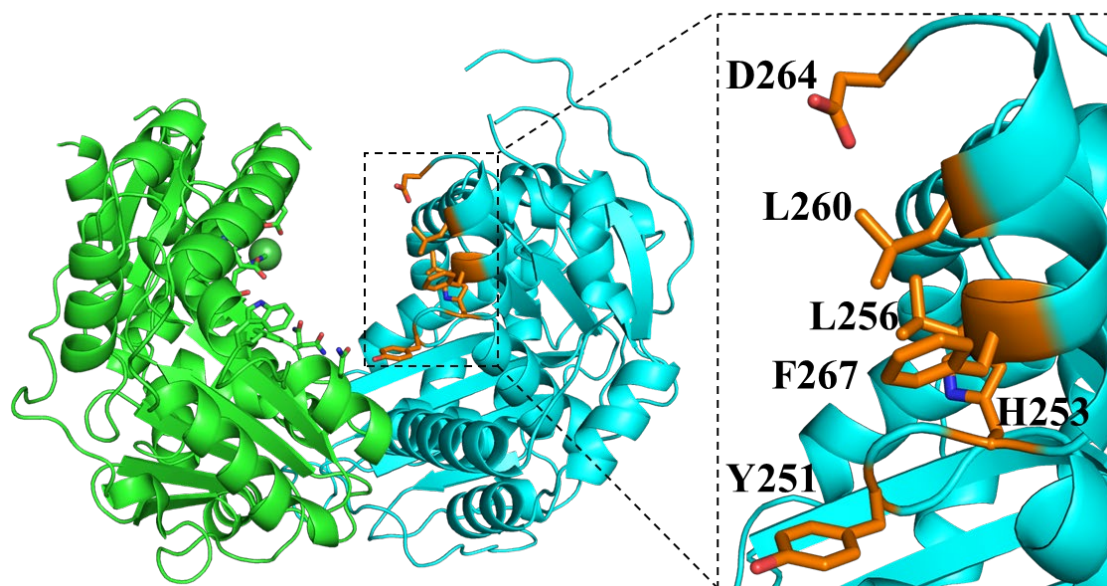


図 44. Qt-AlbE のチャンネルを構成すると考えられる残基

タンパク質の主鎖はリボンで表され、Qt-AlbF は緑色、Qt-AlbE をシアン色、Qt-AlbE におけるチャンネル形成に関与すると考えられる領域はオレンジ色で表示されており、チャンネル形成に関与する残基はスティックで表示されている。酸素原子と窒素原子はそれぞれ赤色と青色で色付けられている。Qt-AlbF で観察されたニッケルイオンは緑色の球で表示されている。

以上の Qt-AlbEF および Qt-サブチロシンモデルの構造的特徴を考え合わせて、酵素-基質複合体モデルを作製することとした。Qt-サブチロシン前駆体のリーダーペプチドが活性部位において切断されることから Qt-サブチロシンモデルの N/C 大環状化形成部位を Qt-AlbEF の活性部位近傍に、Qt-サブチロシンモデルのヘアピン部位を Qt-AlbEF の活性部位から遠位に配置した。このとき、Qt-サブチロシンモデルには含まれていない Qt-サブチロシン前駆体のリーダーペプチド領域はクローズ型の Qt-AlbEF での形成が予想されるチャンネルの近くに位置することになる。さらに、チャンバー表面の Qt-AlbE の正電荷、Qt-AlbF の負電荷に対して Qt-サブチロシンモデルの負電荷および正電荷領域が相対するように、Qt-サブチロシンモデルを配置した。その結果、立体障害を起こすことなく Qt-サブチロシンモデルを Qt-AlbEF の基質結合チャンバー内に収めることができた (図 45)。ただし、本研究で結晶構造解析により決定した Qt-AlbEF の立体構造はオープン型であり、Qt-サブチロシンモデルが Qt-AlbEF のチャンバー内にどのように收容されるかを正確に予想することは難しく、酵素-基質複合体の詳細な結合様式を議論することはできない。このモデルの確からしさを検証するためには、Qt-AlbEF と基質ペプチドとの複合体での構造情報が必要不可欠である。

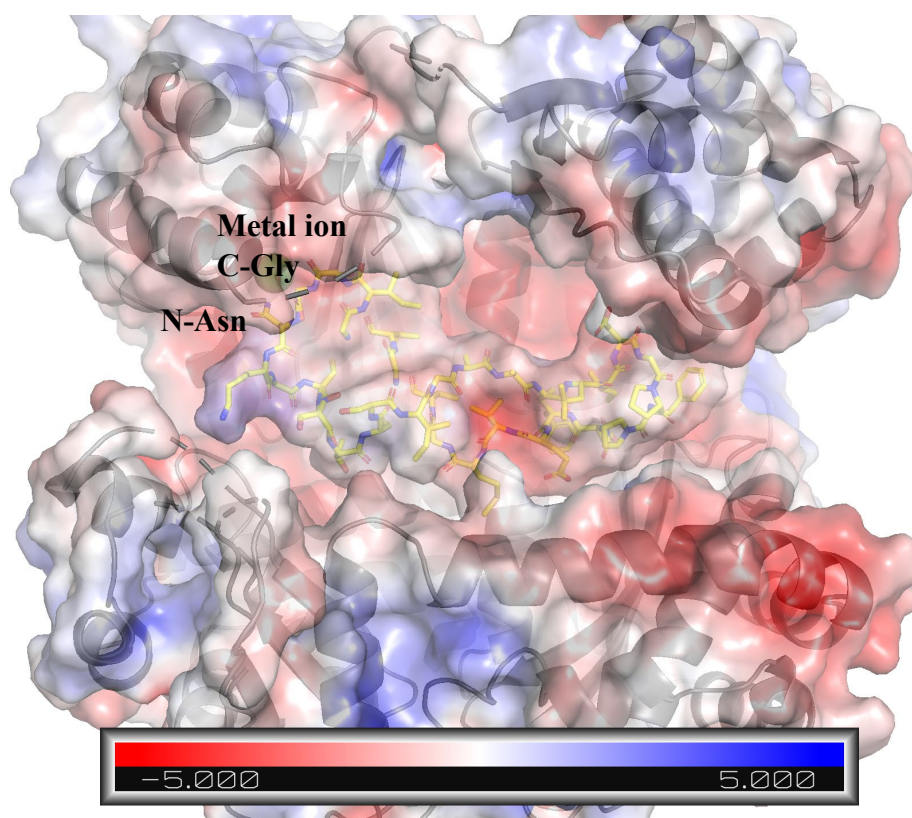


図 45. Qt-AlbEF とサブチロシン前駆体の相互作用

Qt-AlbEF の主鎖は灰色のリボン図として表されている。サブチロシン前駆体は主鎖を黄色、酸素を赤色、窒素を青色としてスティックモデルで表されている。金属イオンは緑色の球で表されている。Qt-AlbEF およびサブチロシン前駆体の分子表面には静電ポテンシャルが示されている（赤色 -5 kT/e ~ 青色 5 kT/e）。

3-7. サブチロシン生合成に関わる AlbEF の特徴

RiPPs 生合成遺伝子クラスター検索プログラムである RODEO を用い、Qt-AlbEF の立体構造情報に基づいた相同性検索によって Qt-AlbEF と類似構造を持つことが明らかになったタンパク質（表 5 および表 8 のプロテアーゼ）をコードする遺伝子の近傍を調べたところ、サブチロシン A のようなサクチペプチドを産生するような遺伝子クラスターや、前駆体ペプチドをコードするような遺伝子を発見することができなかった。したがって、本研究で決定された Qt-AlbEF 複合体の結晶構造はサブチロシン生合成に関与すると考えられるメタロプロテアーゼの最初の報告である。

構造が未知である *B. subtilis* 168 株由来の AlbE (Bs-AlbE) あるいは AlbF (Bs-AlbF) のアミノ酸配列と比較すると、Bs-AlbE では Qt-AlbE におけるドメイン 1 の 4 番目の β ストランド (N67e-I78e) の領域が欠失している (図 46)。この他、一部の β ストランドあるいは α ヘリックスが伸長するような挿入が存在する (図 47)。Qt-AlbE のドメイン 1 の 6 本の β ストランドからなる β シートは、そのトポロジーは異なるものも相同タンパク質間で高度に保存されているが、アミノ酸配列比較からは Bs-AlbE で欠失している 4 番目の β ストランドを補完するような挿入配列を見出すことはできなかった。これらの差異、特に活性部位を有さない AlbE における 4 番目の β ストランドの欠失はタンパク質表面よりもむしろタンパク質内部に存在し、表面構造を大きく変化させるものではないと考えられる。その他の挿入変異も生物種間での進化の過程で生じたものであると推測され、サブチロシン生合成に大きな影響を与えないものと考えられる。

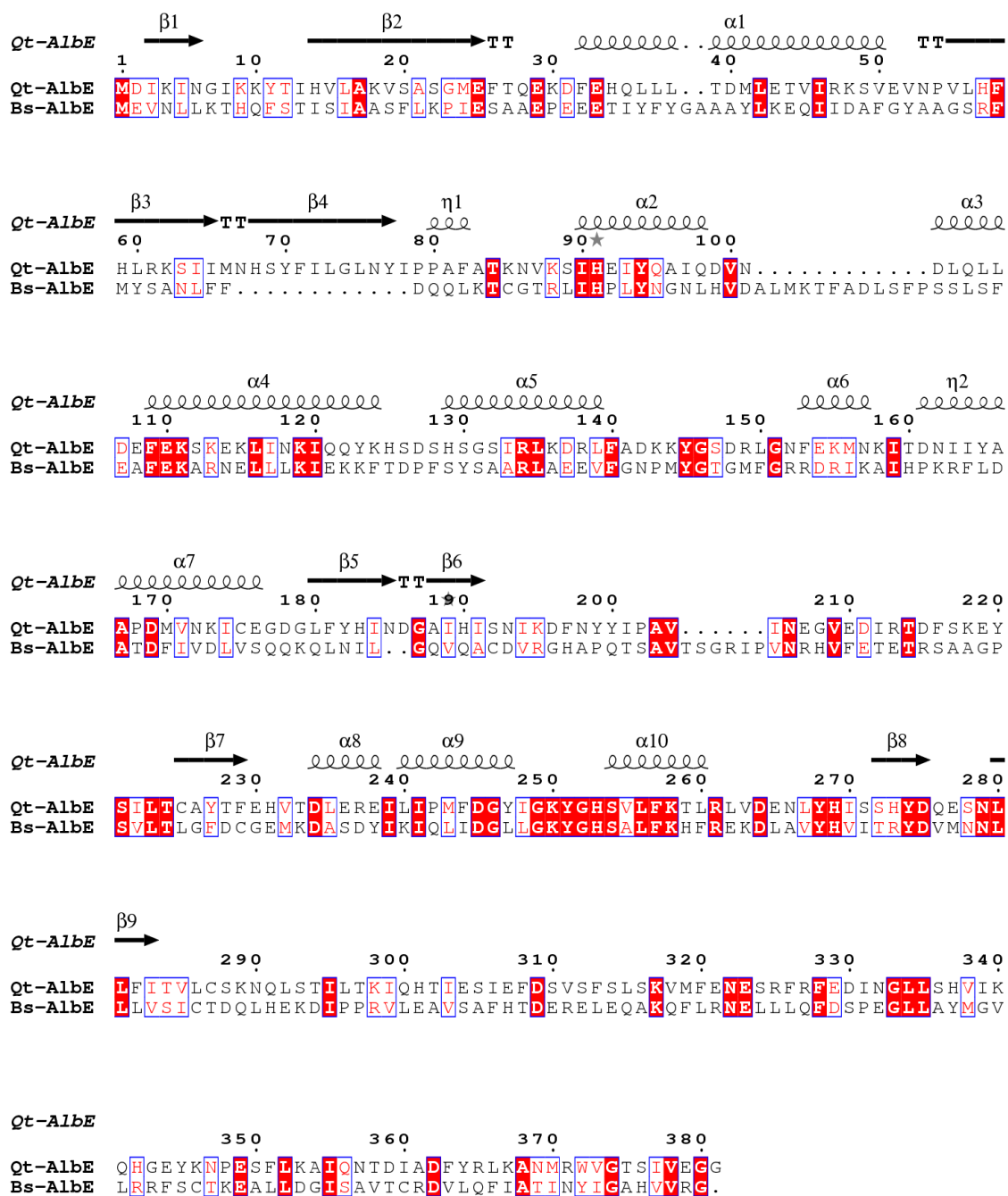


図 46. Qt-AlbE の結晶構造に基づく Qt-AlbE および Bs-AlbE のアミノ酸配列アライメント
アライメントの上には Qt-AlbE の二次構造を表示しており、矢印は β ストランド、らせんは α ヘリックスを表す。

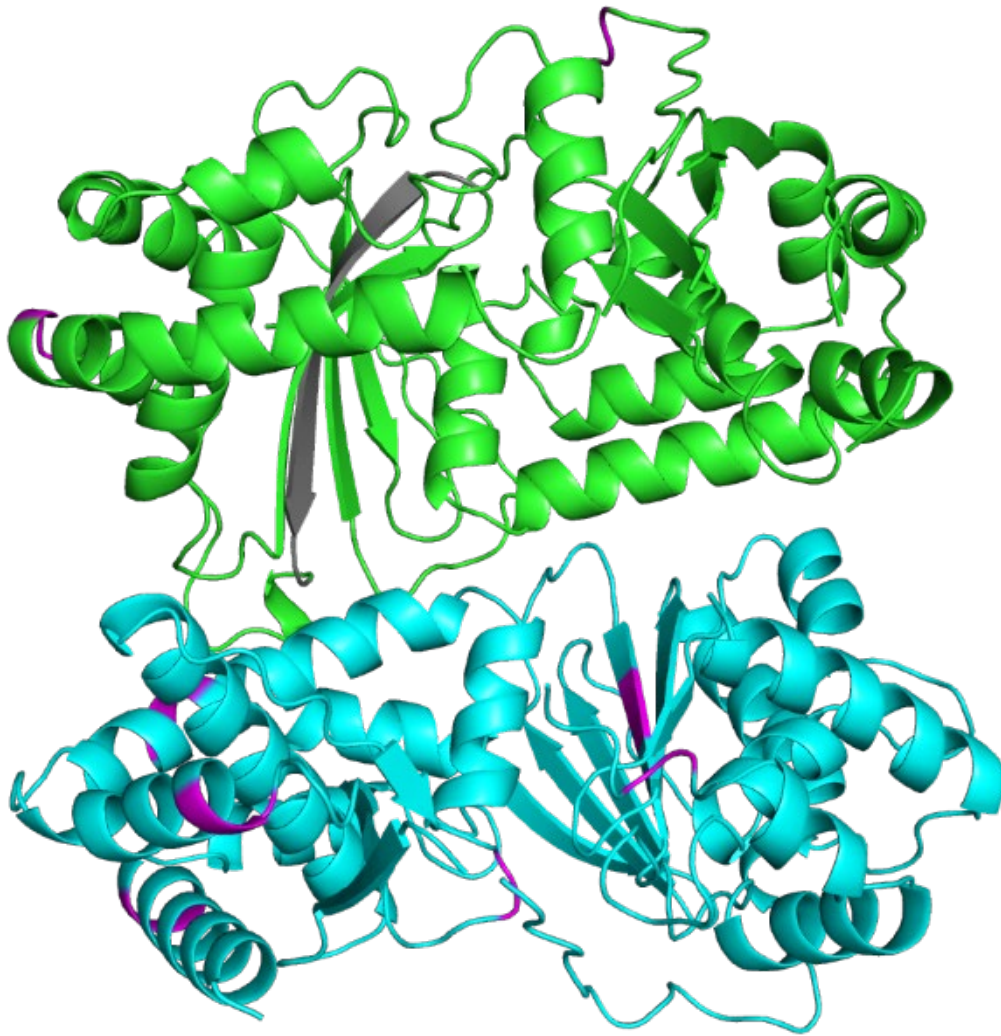


図 47. Qt-AlbEF 複合体の結晶構造

Qt-AlbE は緑色、Qt-AlbF はシアン色で示されている。灰色とマゼンタ色は Qt-AlbEF と *B. subtilis* 168 株由来の AlbEF (Bs-AlbEF) のアミノ酸配列を比較した時に、Bs-AlbEF で欠失、挿入が生じる箇所をそれぞれ示している。

3-8 総括

本研究では、AlbEF ホモログである Qt-AlbEF ヘテロ二量体の結晶構造を決定した。本研究において精製された Qt-AlbEF は金属イオンとしてニッケルイオンを配位している可能性が高いことが示唆された。金属イオン結合部位変異体（金属イオン非結合型）との構造比較からは、金属イオン結合部位を起点とした分子内相互作用の変化が伝播することにより、主に Qt-AlbF において二次構造が変化するということが明らかになった。Qt-AlbEF 複合体と他のタンパク質との比較からは、特にドメイン 2 における構造的な差異が明らかになった。Qt-AlbEF では浅い触媒チャンバーを形成するのに対し、3D3Y あるいは 3AMJ をはじめとした相同的なメタロプロテアーゼでは、ドメイン 2 の β ストランドが Qt-AlbEF のものよりも長く、より深い触媒チャンバーを形成するのに寄与していると考えられる。また、リーダーペプチド領域を溶媒中へ排出する際の利用が推定されるチャンネルを形成する可能性のあるアミノ酸残基が Qt-AlbF に存在していることを見出した。Qt-AlbE についても相同的タンパク質との比較によって、チャンネルを形成しうる残基が推定された。以上のような構造的特徴は、チオエーテル架橋が形成された状態のサブチロシン前駆体を Qt-AlbEF 複合体がその触媒チャンバーの長軸に沿って内包させ、前駆体の周囲から水分子を排除することでリーダーペプチドとコアペプチドの間の加水分解を防ぎつつ、リーダーペプチド切断によって新たに露出したコアペプチド領域の N 末端アミドと C 末端カルボキシル基との間での N/C 大環状化を進行させるために備えていると考えられる（図 48）。

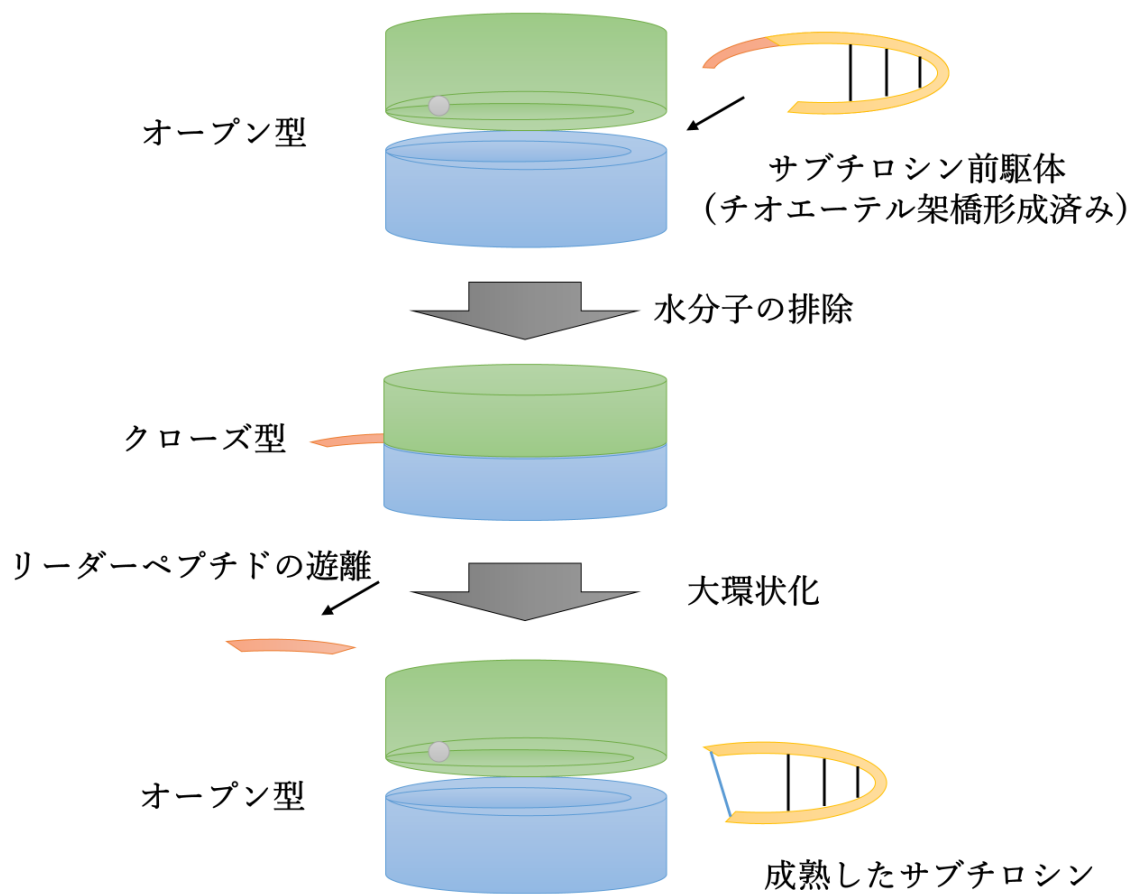


図 48. Qt-AlbEF によるサブチロシンの N/C 大環状化機構の予想

AlbF と AlbE はそれぞれ緑色と水色で表されており、灰色の球は AlbF に結合した金属イオンを表している。

4. References

1. Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* **10**, 226–236 (1929).
2. Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R. J. & Hugenholtz, J. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek* **69**, 193–202 (1996).
3. Lubelski, J., Rink, R., Khusainov, R. *et al.* Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 455–476 (2008).
4. Cotter, P. D., Hill, C. & Ross, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 777–788 (2005).
5. Finking, R. & Marahiel, M. A. Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 453–488 (2004).
6. Arnison, P. G. *et al.* Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat. Prod. Rep.* **30**, 108–160 (2013).
7. Grell, T. A. J. *et al.* Structural and spectroscopic analyses of the sporulation killing factor biosynthetic enzyme SkfB, a bacterial AdoMet radical sactisynthase. *J. Biol. Chem.* **293**, 17349–17361 (2018).
8. Kawulka, K. *et al.* Structure of subtilisin A, an antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual posttranslational modifications linking cysteine sulfurs to α -carbons of phenylalanine and threonine. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 4726–4727 (2003).
9. Kawulka, K. E. *et al.* Structure of subtilisin A, a cyclic antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual sulfur to α -carbon cross-links: formation and reduction of α -thio- α -amino acid derivatives. *Biochemistry* **43**, 3385–3395 (2004).
10. Flühe, L. *et al.* The radical SAM enzyme AlbA catalyzes thioether bond formation in subtilisin A. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 350–357 (2012).
11. Zheng, G., Hehn, R. & Zuber, P. Mutational analysis of the *sbo-alb* locus of *Bacillus subtilis*: identification of genes required for subtilisin production and immunity. *J. Bacteriol.* **182**, 3266–3273 (2000).
12. Stein, T., Düsterhus, S., Stroh, A. & Entian, K. D. Subtilisin production by two *Bacillus subtilis* subspecies and variance of the *sbo-alb* cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 2349–2353 (2004).
13. Zheng, G., Yan, L. Z., Vederas, J. C. & Zuber, P. Genes of the *sbo-alb* locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriocin subtilisin. *J. Bacteriol.* **181**, 7346–7355 (1999).
14. Huang, T. *et al.* Isolation of a variant of subtilisin A with hemolytic activity. *J. Bacteriol.* **191**, 5690–5696 (2009).

15. Chiumento, S. *et al.* Ruminococcin C, a promising antibiotic produced by a human gut symbiont. *Sci. Adv.* **5**, eaaw9969 (2019).
16. Grove, T. L. *et al.* Structural insights into thioether bond formation in the biosynthesis of sactipeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 11734–11744 (2017).
17. Rawlings, N. D., Barrett, A. J. & Bateman, A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* **38**, D227–D233 (2010).
18. Aleshin, A. E. *et al.* Crystal and solution structures of a prokaryotic M16B peptidase: an open and shut case. *Structure* **17**, 1465–1475 (2009).
19. Johnson, K. A. *et al.* The closed structure of presequence protease PreP forms a unique 10 000 Å³ chamber for proteolysis. *EMBO J.* **25**, 1977–1986 (2006).
20. Maruyama, Y., Chuma, A., Mikami, B., Hashimoto, W. & Murata, K. Heterosubunit composition and crystal structures of a novel bacterial M16B metallopeptidase. *J. Mol. Biol.* **407**, 180–192 (2011).
21. King, J. V. *et al.* Molecular basis of substrate recognition and degradation by human presequence protease. *Structure* **22**, 996–1007 (2014).
22. Maqueda, M. *et al.* Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Curr. Protein Pept. Sci.* **5**, 399–416 (2004).
23. Sánchez-Hidalgo, M. *et al.* AS-48 bacteriocin: close to perfection. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 2845–2857 (2011).
24. Kemperman, R. *et al.* Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1589–1597 (2003).
25. Kawai, Y., Kemperman, R., Kok, J. & Saito, T. The circular bacteriocins gassericin A and circularin A. *Curr. Protein Pept. Sci.* **5**, 393–398 (2004).
26. Wirawan, R. E., Swanson, K. M., Kleffmann, T., Jack, R. W. & Tagg, J. R. Uberolysin: a novel cyclic bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Microbiology* **153**, 1619–1630 (2007).
27. Seifart, K. H. & Sekeris, C. E. α Amanitin, a specific inhibitor of transcription by mammalian RNA-polymerase. *Zeitschrift fur Naturforschung - Sect. B* **24**, 1538–1544 (1969).
28. Koehnke, J. *et al.* The mechanism of patellamide macrocyclization revealed by the characterization of the PatG macrocyclase domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 767–772 (2012).
29. Koehnke, J. *et al.* The structural biology of patellamide biosynthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **29**, 112–121 (2014).
30. Mann, G. *et al.* The structure of the cyanobactin domain of unknown function from PatG in the patellamide gene cluster. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* **70**, 1597–1603 (2014).
31. Agarwal, V., Pierce, E., McIntosh, J., Schmidt, E. W. & Nair, S. K. Structures of cyanobactin maturation enzymes define a family of transamidating proteases. *Chem. Biol.* **19**, 1411–1422 (2012).

32. Yang, G. *et al.* *Bacillus thermotolerans* sp. nov., a thermophilic bacterium capable of reducing humus. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**, 3672–3678 (2013).
33. Kabsch, W. *XDS*. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132 (2010).
34. Evans, P. R., Murshudov, G. N. How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **69**, 1204–1214 (2013).
35. Winn, M. D. *et al.* Overview of the *CCP4* suite and current developments. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **67**, 235–242 (2011).
36. Emsley, P. & Cowtan, K. *Coot*: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132 (2004).
37. Murshudov, G. N. *et al.* *REFMAC5* for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **67**, 355–367 (2011).
38. Terwilliger, T. C. *et al.* Decision-making in structure solution using Bayesian estimates of map quality: the *PHENIX AutoSol* wizard. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **65**, 582–601 (2009).
39. Adams, P. D. *et al.* *PHENIX*: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221 (2010).
40. Gatson, J. W. *et al.* *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 1475–1484 (2006).
41. Igimi, S., Kawamura, S., Takahashi, E. & Mitsuoka, T. *Staphylococcus felis*, a new species from clinical specimens from cats. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **39**, 373–377 (1989).
42. Varaldo, P. E. Kilpper-Bälz, R., Biavasco, F., Satta, G. & Schleifer, K. H. *Staphylococcus delphini* sp. nov., a coagulase-positive species isolated from dolphins. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **38**, 436–439 (1988).
43. Kämpfer, P., Martin, K. & Glaeser, S. P. *Lysinibacillus contaminans* sp. nov., isolated from surface water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**, 3148–3153 (2013).
44. Holm, L. Using Dali for protein structure comparison. *Methods Mol. Biol.* **2112**, 29–42 (2020).