

平成 27 年 10 月 19 日

ペプチド性天然化合物合成酵素に対する高感度 ELISA 法を開発

—自由自在なアデニレーションドメインの分子設計を可能にし、創薬シーズ開発加速に期待—

京都大学（総長：山極壽一）の掛谷秀昭 大学院薬学研究科教授、石川文洋 同特定助教らの研究グループは、有用なペプチド性天然化合物の合成酵素である非リボソーム性ペプチド合成酵素のアデニレーション（A）ドメインを標的にする合成小分子プローブ群を創出し、これらプローブ群を固定化することで、A ドメインの酵素機能（基質特異性）を迅速、簡便、かつ高感度に検出可能な ELISA 法を開発しました。これにより、自由自在に A ドメインの基質特異性を設計することが可能となり、非天然化合物の創出や複雑天然化合物の誘導體化が可能になり、創薬シーズ開発の加速が期待されます。

本研究成果は、2015 年 10 月 16 日に米国科学誌「*ACS Chemical Biology*」にオンライン掲載されました。

ポイント

- ・アデニレーション（A）ドメインを標的にする合成小分子プローブ群を開発した。
- ・合成小分子プローブ群を固定化した迅速、簡便、かつ高感度な A ドメインに対する ELISA 法を開発した。
- ・生化学的実験などにより、固定化した合成小分子プローブ群が標的である A ドメインの酵素機能（基質特異性）を特異的に検出可能であることを明らかにした。
- ・本 ELISA 法は精製系だけでなく、夾雑系に存在する A ドメインにおいても適応可能であった。
- ・本 ELISA 法を進化分子工学と組み合わせることにより、自由自在な A ドメインの創出が可能になり、創薬シーズになりうる新しい有用なペプチド性非天然化合物の創出にもつながることが期待される。

概要及び展望

微生物が産生するペプチド性天然有機化合物は、構造上極めて多様性に富み、強力な生物活性を有することから重要な研究ツールとなり創薬シーズとなっています。そのようなペプチド性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(Nonribosomal Peptide Synthetase; NRPS)と呼ばれる酵素群によって合成されます。NRPS のアデニレーション (A) ドメインは、厳密な基質特異性を有し、天然の 20 種のアミノ酸や非天然アミノ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-AMP (adenosine monophosphate) に活性化します (図 1)。次に、下流の担体タンパク質 (T) に存在する 4'-ホスホパンテテイン末端の SH 基にその基質を受け渡すことによって、ペプチド性天然有機化合物の合成が進行していきます (図 1)。すなわち A ドメインは、ペプチド性天然有機化合物合成における 'gatekeeper' の役割を担っています。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ました。

近年、これらの酵素システムを人為的に改変し、非天然化合物を創出する試みが多数報告されていますが、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ではありません。一因として、A ドメイン変異体ライブラリーから望む基質特異性を有する A ドメインを迅速に選別する明確な手法が確立されていない点が挙げられます。本研究グループ¹⁾では現在、研究課題の 1 つとして、NRPS の基本構成単位である A ドメインの有する厳密な基質特異性を利用することで、夾雑系に存在する内在性 NRPS の 1 つ 1 つの A ドメインを高選択的に標識可能なラベル化剤の開発を行ってきました^{2,3)}。すなわち、A ドメインに対するラベル化剤を駆使した網羅的 NRPS 発現解析および機能解析を基盤に、新規二次代謝生成遺伝子迅速同定システムを構築し、ゲノム解析技術および遺伝子工学的手法が利用できない、未利用微生物群 (未利用遺伝子資源) へのアプローチを目指し研究を展開しています。

今回の研究では、抗生物質グラミシジン S の生合成に関与する NRPS (GrsA)、抗生物質チロシジンの生合成に関与する NRPS (TycA, TycB1)、タンパク質分解酵素カルパイン阻害剤アウレウシミンの生合成に関与する NRPS (AusA2)、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) の A ドメインを標的タンパク質としました (図 2)。まず、A ドメインに高い親和性を有するアミノアシル-AMS-ビオチンを創製し (図 3)、これら化合物のビオチン官能基を利用し、ストレプトアビジンを吸着したプレートにプローブ群を固定化した A ドメインに対する ELISA 法の構築を行いました (図 4、表 1)。この A ドメインに対する ELISA 法は、大腸菌組換えタンパク質の tag 分子(His₆)を利用し、一次抗体として抗 tag マウス抗体を、二次抗体として HRP 縮合抗マウス抗体を組み合わせる間接 ELISA 法を採用しています。これにより、プローブ分子への結合を指標に、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、かつ高感度な検出法を実現しました。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可能であることを明らかにしました。これにより、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確固たる基盤技術が構築できました。

今後、本 ELISA 法を基盤とする高速 A ドメイン進化分子工学技術を開発し、望む基質特異性を

有する A ドメインを創出したいと考えています。天然の 20 種類のアミノ酸だけでなく、天然には存在しない基質特異性を有する A ドメインを設計することに道を拓き、新しい非天然ペプチド性有機化合物の創出につながると考えています。また、プロパルギル基やアジド基を有する非天然アミノ酸を有用なペプチド性天然有機化合物に導入し、クリックケミストリーと組み合わせることで複雑天然有機化合物の誘導体化も大いに期待できます。

- 1) 京都大学大学院薬学研究科医薬創成情報科学専攻システムケモセラピー（制御分子学）分野
(URL : <http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/sc-molsci/>)
- 2) Ishikawa, F. Kakeya, H. Specific enrichment of nonribosomal peptide synthetase module by an affinity probe for adenylation domains. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 865-869, 2014.
- 3) Ishikawa, F. Konno, S., Suzuki, T., Dohmae, N., Kakeya, H. Profiling nonribosomal peptide synthetase activities using chemical proteomic probes for adenylation domains. *ACS Chem. Biol.* 10, 1989-1997, 2015

書誌情報 :

[DOI] 10.1021/acscchembiol.5b00595

“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”

Fumihito Ishikawa, Kengo Miyamoto, Sho Konno, Shota Kasai, Hideaki Kakeya.

ACS Chem. Biol. Published online: October 16, 2015.

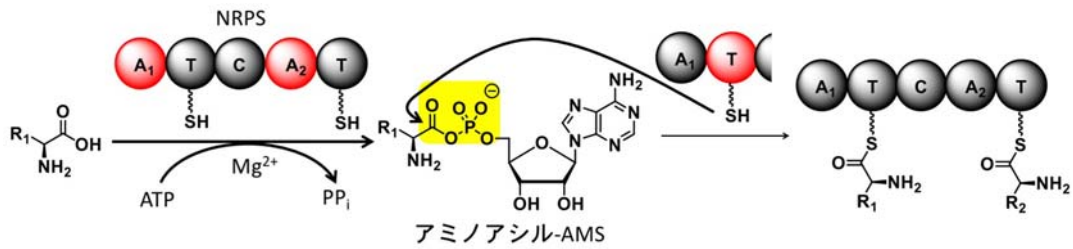


図 1. NRPS のアデニレーション(A)ドメインの触媒機構

A ドメインは、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, アリー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-AMP に活性化します。次に、下流の T ドメインに存在する 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、ペプチド性化合物の合成が進行します。NRPS はアデニレーションドメイン(A)、担体タンパク質(T)、縮合酵素 (C) を基本構成単位として有しています。

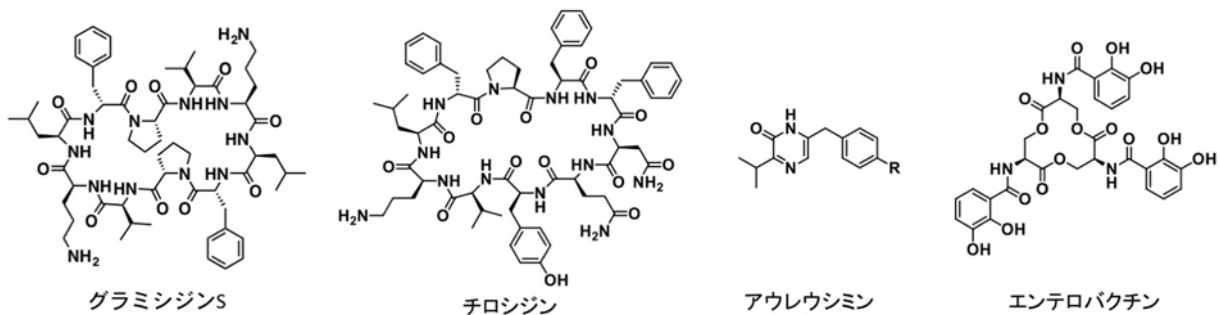


図 2. 本研究で標的とした NRPS により生合成されるペプチド性天然化合物の化学構造

GrsA はグラミシジン S、TycA および TycB1 はチロシジン、AusA2 はアウレウシミン、EntE はエンテロバクチンの生合成にそれぞれ関与しています。また、グラミシジン S は抗菌活性 (グラム陽性菌、グラム陰性菌に有効)、チロシジンは抗菌活性 (グラム陽性菌に有効)、アウレウシミンはタンパク質分解酵素カルパイン阻害活性、エンテロバクチンは鉄結合 (シデロフォア) 活性をそれぞれ有しています。

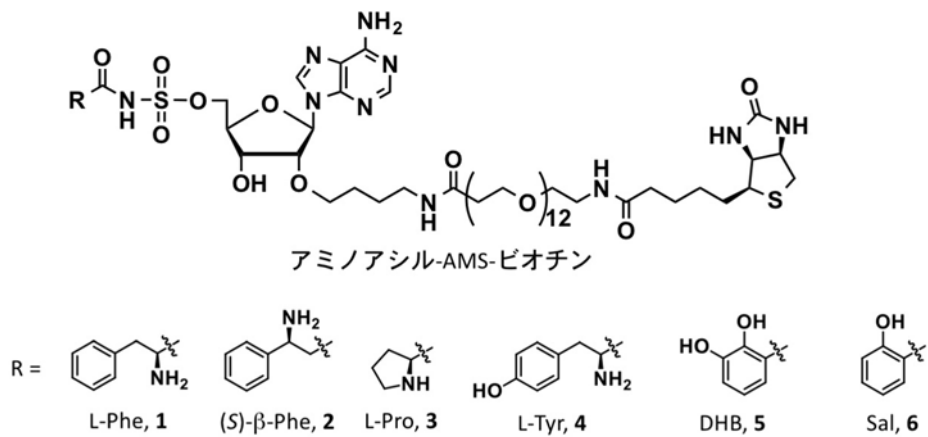


図 3. 合成小分子プローブの化学構造

リガンド部位としてアミノアシル-AMS を用いています。アミノアシル化反応の活性中間体であるアミノアシル-AMP のリン酸エステル結合を生物学的等価体(bioisostere)であるスルファモイル基で置換したアミノアシル-AMS は NRPS A ドメインに非常に高い親和性を示します。A ドメインの厳密な基質特異性を利用し、リガンド部位のアミノ酸、アリアル酸を入れ替えることによってリガンド認識駆動によって A ドメインに結合することが可能となります。また、A ドメインはアデノシン骨格の 2'-ヒドロキシル基への化学修飾に対して非常に寛容であるため、この 2'-ヒドロキシル基にペグリンカーを介してビオチン官能基を導入しています。DHB: 2,3-ジヒドロキシ安息香酸; Sal: サリチル酸。

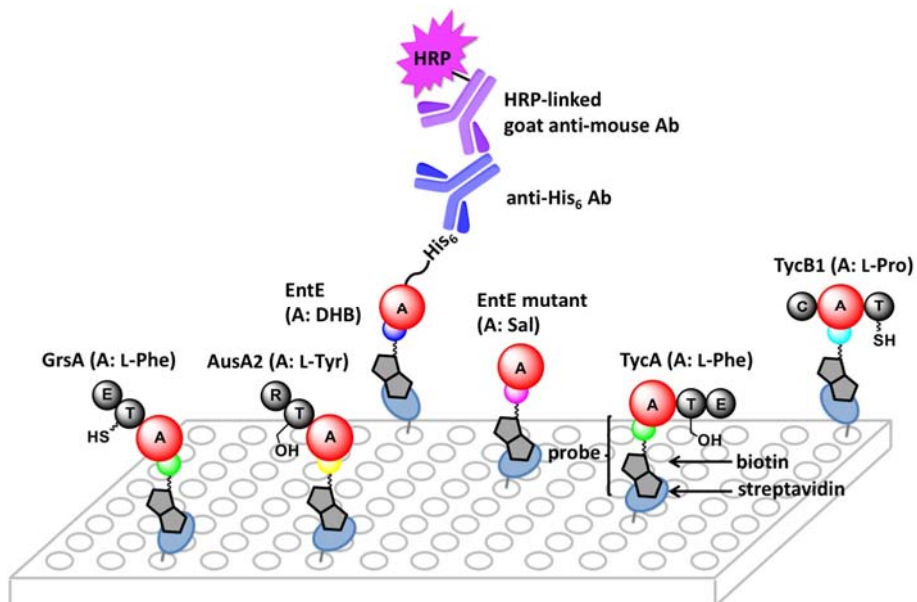


図 4. 合成小分子プローブ群を固定化したアデニレーション(A)ドメインに対する ELISA 法のイメージ図

合成小分子プローブ群のビオチン官能基を利用することで、ストレプトアビジンに吸着したブ

レートに固定化することができます。この A ドメインに対する ELISA 法は、大腸菌組換えタンパク質のタグ分子(His₆)を利用し、一次抗体として抗タグ抗体を、二次抗体として西洋わさび由来のペルオキシダーゼを縮合した抗マウス抗体を組み合わせる間接 ELISA 法を採用しています。これにより、合成小分子プローブ（アミノアシル-AMS-biotin プローブ; アミノアシル-AMS は 5'-*O*-*N*-(aminoacyl)sulfamoyladenosine を示す) のリガンド部位 (色丸) に基質特異性 (酵素活性) を有する A ドメインの迅速、簡便、高感度な検出を実現しました。GrsA、TycA、TycB1、AusA2、EntE は NRPS タンパク質で、それぞれ L-Phe、L-Phe、L-Pro、L-Tyr、2,3-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB) に基質特異性をもつ A ドメイン (赤色) を有しています (表 1)。その他の酵素ドメインは、担体タンパク質 (T)、異性化酵素 (E)、縮合酵素 (C)、還元酵素 (R) で表示しています。

表 1. 合成小分子プローブ群および NRPS タンパク質の対応表

| NRPS | 化合物番号 | | | | | |
|----------|-------|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| GrsA | ✓ | ✓ | | | | |
| TycA | ✓ | | | | | |
| TycB1 | | | ✓ | | | |
| AusA2 | ✓ | | | ✓ | | |
| EntE | | | | | ✓ | |
| EntE 変異体 | | | | | | ✓ |