



Title	A Novel Epimerase Catalyzing Multiple Isomerization of Amino Acid Residues of Ribosomal Peptide [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	肖, 宛璐
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第15640号
Issue Date	2023-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90815
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	XIAO_Wanlu_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（工学） 氏名 ショウ エンロ

審査担当者	主査	教授	松本 謙一郎
	副査	教授	渡慶次 学
	副査	教授	大利 徹
	副査	准教授	小笠原 泰志
	副査	准教授	南 篤志

学 位 論 文 題 名

A Novel Epimerase Catalyzing Multiple Isomerization of Amino Acid Residues of Ribosomal Peptide
(リボソームペプチドの複数アミノ酸残基を異性化する新規エピメラーゼ)

一般にリボソームで合成されたペプチドや蛋白質を構成するアミノ酸はL体であるが、これらをD体に異性化する機構もわずかではあるが知られている。例えば、ラジカル反応でエピメリ化を触媒するPoyDや、当研究室で見出した放線菌 *Streptomyces* sp. M-271 が生産するラッソペプチド天然物 MS-271 のC末 Trp を異性化する MslH21 などが知られている。近年、リボソーム翻訳後修飾ペプチド (RiPPs) 天然物の一種であるサリニペプチンが22アミノ酸残基の内、9残基がD体であることが報告され、上記とは異なる機構でD体アミノ酸が生成すると考えられたことから、本学位論文では、その生合成機構の解析を行った。

第一章でこれまで知られている異性化酵素について述べたのち、第二章では、報告されていたサリニペプチン生合成遺伝子クラスター (sin) を詳細に解析し、既知のエピメラーゼ遺伝子が存在しないことを確認した。また、機能が予測可能な、前駆体ペプチド (SinA)、デヒドロアミノ酸とアミノビニルシステイン (aviCys) の生合成にそれぞれ必要な SinH、SinD、メチル基転移酵素 SinM に加え、機能未知酵素 (SinL) の遺伝子が存在したことから、SinL が新規なエピメラーゼと予測した。興味深いことに、サリニペプチンと同様にデヒドロアミノ酸と aviCys を部分骨格に持つ、グリセマイシンとシペマイシンの生合成遺伝子クラスターも sin クラスターと全く同じ遺伝子構成であり、機能未知の sinL 相同遺伝子も持つことから、グリセマイシンとシペマイシンもサリニペプチンと同様に複数のD-アミノ酸残基を有し、それらの生成には唯一の機能未知酵素である SinL 様酵素が関与すると予想した。そこで検証のため、グリセマイシンの遺伝子クラスター (grm) を *S. lividans* で異種発現させた結果、特異的な代謝産物が得られ、MS と各種 NMR 解析でグリセマイシンであることを確認した。また、加水分解後のキラルアミノ酸分析で、グリセマイシンが予想通りD体アミノ酸残基を複数含むことも明らかとした。また、ゲノムデータベースから見出した sinL 相同遺伝子含有生合成遺伝子クラスター2つについても異種宿主発現させ、代謝産物 (サリニペプチンおよびシペマイシン様リナリジン) が複数のD-アミノ酸を含むことも明らかとした。次に、各遺伝子の機能を検証するため、grm クラスター中の grmH, grmD, grmM, grmL をそれぞれ in-frame で欠失したプラスミドを構築し、*S. lividans* で異種発現した結果、いずれの場合もグリセマイシンの生産が消失したことから、grmL を含めて4つの遺伝子が生合成に必須であることが明らかとなった。このうち、grmH と grmL を欠失した場合には中間体の蓄積は見られなかったが、grmM と grmD を欠失した場合には、それぞれ N,N-ジメチル基と aviCys 部を持たないグリセマイシン類縁体が見られ、これらがメチル基転移と aviCys 形成に関わることを明らかとした。また、これらの類縁体をキラルアミノ酸分析した結果、いずれもグリセマイシンと同様に複数のD-アミノ酸残基を含んでいたことから、エピメリ化酵素はメチル化と aviCys 形成より前の生合成段階、すなわち、前駆体ペプチド、あるいは GrmH により生成したデヒドロアミノ酸を含む前駆体ペプチドに作用すると考えられた。

第三章では、GrmL が実際にエピメリ化酵素であることの証明を試みた。In vitro 解析のため、基質となる前駆体ペプチド (GrmA) は N 末に His-Tag を付けた状態で発現できたが、エピメラーゼと予想した GrmL は種々条件を検討したが組換え酵素が得られなかったため in vitro 解析を断念した。次に、grmA と grmL を前駆体ペプチド (GrmA) 認識蛋白質 GrmH をコードする grmH とともに大腸菌に導入した。この場合は、GrmAHL の発現が SDS-PAGE 確認されたことから、GrmA を精製しキラル解析したが D 体アミノ酸は検出されなかった。GrmL が触媒する異性化には放線菌のみに存在する補酵素が必要である可能性が示唆された。そこで、宿主を *S. lividans* に変え GrmAHL の共発現を行った。先と同様に、His-tag-GrmA 単独発現株、GrmAL 共発現、GrmAH 共発現、GrmAHL の共発現株を培養し細胞破碎後、Ni-NTA を用いて His-tag GrmA を精製し SDS-PAGE で分析した。その結果、GrmA に対応するバンドは GrmA 単独発現、GrmAL 共発現、GrmAH 共発現株において検出されたが、GrmALH の共発現株では検出できなかった。GrmA 単独発現、GrmAL 共発現、GrmAH 共発現株で検出できた GrmA を精製後、キラル解析を行ったが D 体のアミノ酸は検出されなかった。次に、GrmAHL の共発現で GrmA が検出できなかったのは、脱水や異性化反応が進行し His-tag を含む N 末側のリーダーペプチドとコアペプチドが切り離された可能性を考え、発現株をアセトン処理、濃縮後、LC-MS 分析した。その結果、脱水したコアペプチドに対応する 2 価イオンの m/z が観測され、キラル分析した結果、グリセマイシンと同様に D 体のアミノ酸が確認できた。これらの結果より、GrmH と L を共発現することが脱水と異性化反応に重要であることがわかった。

これを要するに、リボソームで翻訳されたペプチドの複数アミノ酸残基を異性化する全く新規な GrmL を見出し、その活性発現にはデヒドロアミノ酸を生成する脱水酵素 GrmH との共発現が重要であることを見出しており、異性化酵素の知見拡充に貢献するところ大なるものがある。

よって、著者は、北海道大学博士（工学）の学位を授与される資格あるものと認める。