

ポリケタイド生合成における アシルキャリアータンパク質認識機構の解析

東京工業大学理学院 宮永 顕正

【略歴】

2001年3月	東京大学農学部卒業
2006年3月	東京大学大学院農学生命科学研究科博士課程修了 博士(農学)取得
2006年4月	東京大学大学院農学生命科学研究科博士研究員
2009年4月	米国カリフォルニア大学サンディエゴ校博士研究員
2011年6月	東京理科大学理工学部助教
2012年4月	東京工業大学大学院理工学研究科助教
2016年4月	東京工業大学理学院助教(改組)

はじめに

微生物が生産するポリケタイド化合物は多様な化学構造と生物活性を有しており、そのうちのいくつかは抗生物質や医薬品として利用されている。ポリケタイド合成酵素 (PKS) の反応では、まずアシル基転移酵素 (AT) がポリケタイド化合物の構成単位となるアシル基質 (開始基質や伸張基質) を認識し、アシル基を対応するアシルキャリアータンパク質 (ACP) へと受け渡す (図 1)。その後、アシル基は ACP に結合した状態で PKS の各機能ドメインや各酵素のもとに運ばれ、縮合反応や種々の修飾反応を受け、ポリケタイド鎖が伸長していく。PKS の反応においては、開始基質や伸長基質として一次代謝産物由来の低級脂肪酸が用いられる場合に加え、その生合成系に特化した独自の基質を利用する場合があります、ポリケタイド骨格の多様性を広げている。

ポリケタイド生合成経路において、AT を基質特異性の異なる別の AT へと人為的に置換すれば、ポリケタイド構造の一部が変換された新規化合物の生産が期待できる。しかし、実際には望みの化合物を全く生産しない、または収量が大幅に低下してしまう例が多く報告されている。導入した AT が本来の生合成経路の ACP を認識できず、アシル基が受け渡されなくなってしまうことが原因の一つであると考えられる。タンパク質間相互作用を損なうことなく基質特異性の異なる AT へと置換するためには、AT による ACP の認識部位や認識残基に関する知見を得る必要がある。ACP は、AT 以外の PKS 各触媒ドメインとも相互作用してポリケタイド鎖伸長反応に携わるため、AT と ACP 間の相互作用は一時的なものであり比較的弱いと考えられている。したがって、AT と ACP の複合体構造解析が難しく、これまでに ACP の認識機構に関する詳細な知見は得られていなかった。

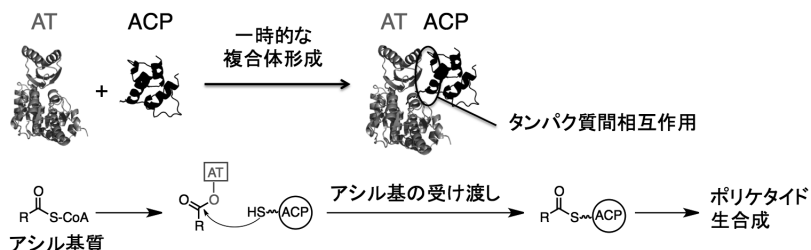


図1: ATによるアシル基転移反応

ビセニスタチン生合成に関わる AT と ACP の複合体構造解析

マクロラクタム抗生物質ビセニスタチンの生合成において、単独型 AT である VinK は、単独型 ACP である VinL に結合したジペプチル基を開始基質として、PKS ローディングモジュールの ACP ドメイン (VinP1LdACP) へと受け渡す反応を触媒する。VinK による ACP の認識機構を明らかにするため、VinK とこれらの ACP の共結晶化を検討した。まず、VinK と VinL を混合し、結晶化を行ったが、VinK と VinL の共結晶を得ることはできなかった。VinK と VinL の間のタンパク質間相互作用が弱く一時的であり、安定な複合体を形成しないことが原因であると考えられた。そこで、共結晶化に適した安定な VinK と VinL の複合体を得るために、これらのタンパク質間で特異的にクロスリンク反応が起こる条件を検討した。VinK の基質結合ポケット内に Cys 残基を導入した変異体を用いて、1,2-ビスマレイミドエタン存在下で VinL と反応させたところ、特異的なクロスリンク反応が進行した。そこで、結晶化を検討したところ、VinK-VinL 複合体の結晶が得られ、複合体の結晶構造を決定することに成功した。決定した複合体構造においては、VinK の Arg153、Met206、Arg299 の 3 つのアミノ酸残基が VinL のアミノ酸残基と相互作用していた。VinK のこれら 3 つの残基の変異体をそれぞれ作製したところ、VinL との間の親和性が低下し、また VinL から VinP1LdACP へのジペプチル基の受け渡し活性が低下したことから、タンパク質間相互作用と触媒活性が密接に関わっていることが確認された。このように、PKS 反応に関わる AT と ACP の複合体の結晶構造を初めて決定し、ACP 認識機構を明らかにすることに成功した。

今後の展望

PKS はモジュール構造の有無や、含まれるドメインの違いなどにより、いくつかのグループに分類できる。例えば、*cis*-AT 型の I 型 PKS は、モジュール内に含まれる AT が同一モジュール内の ACP にアシル基を受け渡す。一方で、*trans*-AT 型の I 型 PKS は、AT がモジュール内に含まれておらず単独で存在しており、PKS モジュール内に含まれる複数の ACP ドメインにそれぞれアシル基を受け渡す。これらの PKS は、AT と ACP が同一のポリペプチド鎖に含まれている、含まれていないなどの点で異なっており、それぞれの AT がどのように ACP を認識しているかは不明である。現在は、これらの AT と ACP の組み合わせについて、複合体の結晶構造解析を検討している。AT による ACP 認識機構を解明することができれば、その情報をもとに、タンパク質間相互作用を損なうことなく、基質特異性の異なる AT へと置換することによって、非天然型ポリケタイド化合物の効率的な生産が可能になると考えられる。

謝辞

本研究は、東京工業大学理学院で行われたものであり、江口正教授、工藤史貴准教授をはじめ、本研究に携わった学生諸氏に深く感謝いたします。

参考文献

1. Miyanaga, A., Iwasawa, S., Shinohara, Y., Kudo, F., and Eguchi, T. (2016) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 1802–1807.
2. Miyanaga, A., Kudo, F., and Eguchi, T. (2016) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **35**, 58–64.
3. Miyanaga, A. (2017) *Biosci. Biotech. Biochem.*, **81**, 2227–2236.
4. 宮永 顕正, 工藤 史貴, 江口 正 (2016) *バイオサイエンスとインダストリー*, **74**, 382–387.