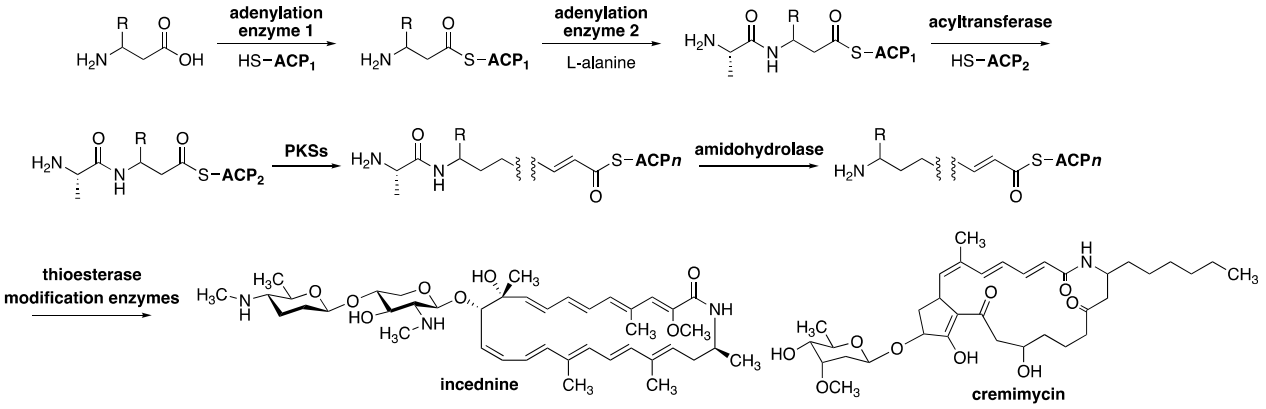
8　合成プローブを用いた天然物生合成酵素の精密解析	工藤　史貴

【目的】微生物が生産する生理活性天然物として多種多様なマクロラクタム抗生物質が知られている。これら抗生物質の生合成酵素遺伝子を基質特異性の異なるものと入れ換えることで、対応する部分構造が変化した新たな抗生物質の生産が期待できる。しかしながら生合成酵素の基質認識機構やタンパク質間相互作用に関する知見は不十分であり、合理的な遺伝子組換えにはさらなる酵素化学的な情報の蓄積が重要である。本研究では、合成分子プローブを用いて、アシルキャリアープロテイン（ACP）が介在するマクロラクタム生合成酵素の基質認識機構を解明することを目的とした。本研究ではまず、β-アミノ酸を選択して活性化し ACP へとロードするアデニル化酵素と ACP との相互作用の解明を目指した。また、ACP 上のアミノアシル基を別の ACP へと転移させるアシル基転移酵素と ACP との相互作用の解明を目指した。

【方法】アデニル化酵素に関してはプローブと反応させるための活性部位情報が不足していたので、まずはいくつかの基質特異性の異なる酵素の結晶構造解析を行った。並行して、ACP 側を修飾するためのパンテテインミミックを分子プローブとして合成した。さらに CoA 合成酵素とホスホパンテテイニル基転移酵素を用いて、分子プローブで修飾された ACP を調製した。この修飾 ACP と変異導入したアデニル化酵素をクロスリンクして複合体化を検討することにした。さらに複合体の結晶化を検討し、結晶構造解析によりタンパク質間相互作用を明らかにする。アシル基転移酵素に関しては、基本的な考え方はアデニル化酵素の場合と同様であるが、β-アミノ酸をスターター部位に有するマクロラクタム抗生物質の生合成酵素に特有と考えられる基質のミミックとなる分子プローブを合成してクロスリンクを検討することにした。

【結果】Incednine 生合成において（*S*）-3-アミノブタン酸を認識する酵素 IdnL1 と cremimycin 生合成において 3-アミノノナン酸を認識する CmiS6 の結晶構造解析に成功し、基質認識に関わる活性部位情報を得ることができた。また、分子プローブとして用いるパンテテインミミックを合成した。現在、修飾 ACP を調製し、アデニル化酵素とのクロスリンク反応を検討している。アシル基転移酵素に関しては、これまでクロスリンク反応に用いてきたビスマレイミドエタンはシステイン変異導入した部位との選択的な反応はせずに、期待とは異なる位置と反応してしまうことがわかった。そこでアデニル化酵素の場合と同様に、パンテテインミミックを分子プローブとして利用したクロスリンク反応を検討することにした。現在までに、2-クロロアセトアミドなどの分子プローブを用いたときにクロスリンク反応が進行することを見出した。

β-アミノ酸をスターター部位に有するマクロラクタム系抗生物質の共通的な生合成経路



8. 合成プローブを用いた天然物生合成酵素の精密解析

工藤　史貴

東京工業大学 理学院 化学系

Key words：マクロラクタム系抗生物質，ポリケチド合成酵素，分子プローブ，酵素構造解析，生合成

緒　言

放線菌や糸状菌などの微生物が生産するマクロライド系抗生物質やマクロラクタム系抗生物質などの大環状ポリケチド化合物は、多種多様な構造と生物活性を有する抗生物質群として知られている。エリスロマイシン、リファマイシン、エバーメクチンなどが有名であり、人類の健康増進に大きく貢献してきた。当然のことながら、これらポリケチド化合物の生合成研究も盛んに行われてきた。現在では生産菌ゲノムを解読することにより、生合成遺伝子クラスターの特定は容易となっている。また生合成酵素の機能解析も精力的に行われ、生合成酵素のアミノ酸配列から触媒能と基質特異性を推定できるようになっている。

本研究で研究対象としているマクロラクタム系抗生物質は、ポリケチド骨格のスターター部位にβ-アミノ酸を有しており、抗腫瘍物質や抗真菌物質など特徴的な生物活性を示すものが多い。様々なβ-アミノ酸をスターターとするマクロラクタム系抗生物質が知られており、それら生合成マシナリーを人為的に改変することで生物活性が改良された新規化合物の創製を目指して研究を行っている。ポリケチド合成酵素（PKS）によるポリケチド鎖伸長反応は通常のものと同様と考えられるが、β-アミノ酸スターター部位の取り込み機構には特徴がある（図 1）。まず、それぞれの生合成系に特異なβ-アミノ酸が生合成される。これが、ATP 依存のアデニル化酵素によるアデニル化を経てアシルキャリアープロテイン（ACP_1）へとロードされる。このようにして生成するβ-アミノアシル-ACP_1は、さらにもう一つのアデニル化酵素によりアミノアシル化を受け、ジペプチジル-ACP_1 が生成する。これがアシル基転移酵素（AT）によりローディングモジュールの ACP_2 ドメインへと転移され PKS によるポリケチド鎖伸長が触媒される。ポリケチド鎖末端に付いたアミノアシル基は、アミドヒドロラーゼにより除去され、最後にチオエステラーゼドメインによりマクロラクタム環が形成される。

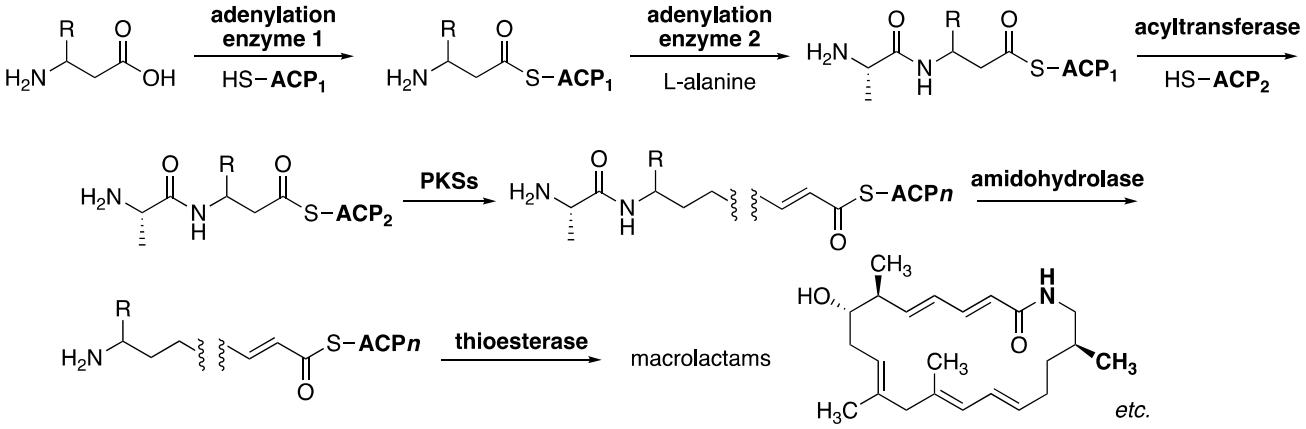


図 1. β-アミノ酸をスターターとするマクロラクタム系抗生物質の生合成経路

これまでに vicenistatin、incednine、cremimycin、hitachimycin、fluvirucin B2 生合成遺伝子クラスターを特定し、前述のβ-アミノ酸の取り込み機構は共通していることを明らかにしてきた（図 2）[1]。それぞれの生合成で用いられるβ-アミノ酸は異なるので、それぞれの生合成酵素の基質特異性は異なると考えられる。そこで、基質特異性の異な

る酵素どうしを入れ換えることでβ-アミノ酸部位が入れ換わったマクロラクタム化合物の生産が期待できる。しかしながら、β-アミノ酸を選択的に認識して経路特異的なACPへとロードするアデニル化酵素や、アミノアシル基をPKSのACPドメインへロードする酵素の基質認識機構は不明であり、単なる生合成酵素遺伝子の入れ換えだけで実現可能か懸念された。特にACPの認識機構は重要であるにも関わらず、ACPの高いフレキシビリティーのために生合成酵素との相互作用機構に関する知見はほとんどない。そこで本研究では、生合成中間体をミミックした分子プローブを用いて生合成酵素の基質認識機構を原子レベルで解明することを目指した。

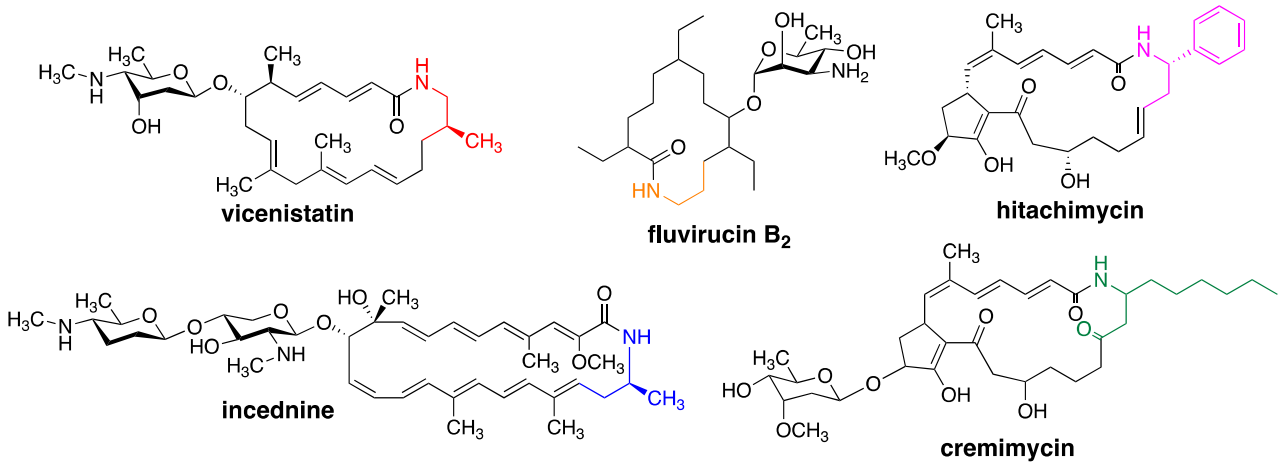


図2. これまでに生合成遺伝子クラスターを特定したマクロラクタム系抗生物質
色をつけた部分がβ-アミノ酸スターター部位である

方法および結果

1. アデニル化酵素とACPの相互作用解明に向けた研究

L-α-アミノ酸のアデニル化酵素の基質認識機構に関しては、非リボソーム性ペプチド合成酵素（NRPS）のアデニル化酵素に関する研究が進んでいる。環状ペプチド抗生物質であるグラミシジン生合成におけるL-α-フェニルアラニンを選択的に認識するアデニル化酵素の結晶構造解析に基づき様々なアデニル化酵素のシークエンスのアラインメント解析が行われ、10箇所のアミノ酸情報を比較することで、どのL-α-アミノ酸に対する基質特異性を有するかを精度高く予想することができる。すなわちこのNRPSコードから、どのようなペプチド化合物が生合成されるか推定可能である。一方、β-アミノ酸を認識するアデニル化酵素に関する知見は限られている。そこで、研究対象としているマクロラクタム系抗生物質の生合成におけるアデニル化酵素の結晶構造解析を行った。

本研究では、vicenistain生合成における3-メチルアスパラギン酸を認識するアデニル化酵素VinNの結晶構造［2］に加えて、incednine生合成において3-アミノブタン酸を認識するアデニル化酵素IdnL1、cremimycin生合成において3-アミノノナン酸を認識するアデニル化酵素CmiS6の結晶構造解析を行った（図3）。IdnL1については、3-アミノブタン酸とATP存在下で結晶化を行った結果、アデニレート中間体がトラップされた結晶構造を解くことができた［3］。IdnL1、CmiS6、VinNの全体構造は非常によく似ており、β-アミノ酸を選択的に認識するために重要と考えられる共通的な構造を見出すことができた。また、天然型基質と類似したサイズのβ位アルキル側鎖であれば天然型と同程度に認識されることもわかった。

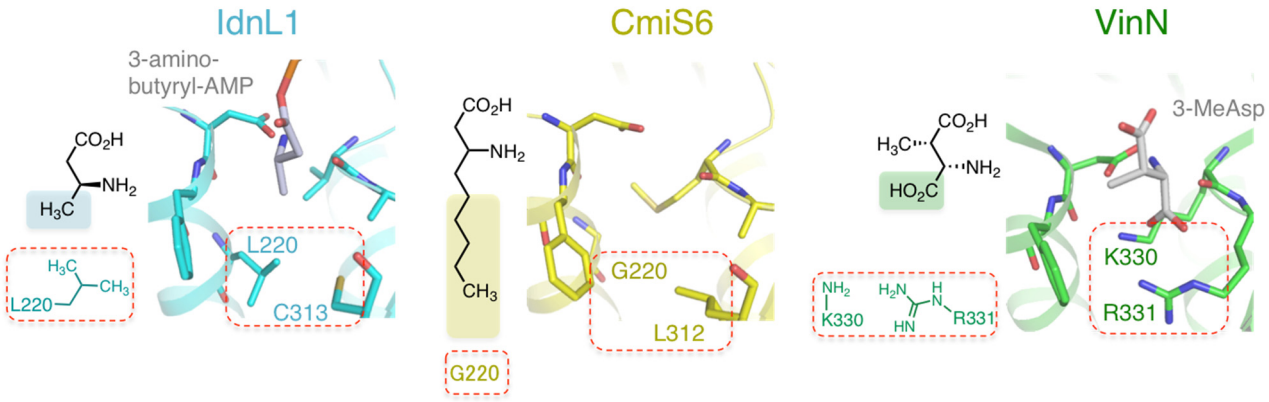


図 3. アデニル化酵素 IdnL1, CmiS6, VinN の結晶構造解析

つぎに、アミノアシル基のアクセプターとなる ACP の認識機構を解明するための研究に着手した。前述のように、ACP のフレキシビリティーが相方となる酵素との複合体化の妨げになっていることが考えられるため、ACP のセリン残基に結合したホスホパンテテインを介してアデニル化酵素とのクロスリンク反応を検討することにした。分子プローブの合成は、UCSD の Burkart らが開発した手法を利用することにした（図 4）。この手法では、ホスホパンテテインのチオールをアミンに変え、アミノアシル化された ACP のミミックとなる分子プローブを調製可能である。具体的には、パンテテインミミックを化学合成しておき、それと基質選択性が寛容な補酵素 A (CoA) 合成酵素を使って CoA ミミックを酵素法により調製し、さらに、ホスホパンテテイニル基転移酵素（PPTase）を用いて、アポ体の ACP を修飾することによりケモエンザイマティックに修飾 ACP を調製するというものである。アシル基のミミックとしては、まずは、2-クロロアセトアミド、2-クロロアクリルアミドを導入した求電子的な分子プローブを利用することにした。一方、アデニル化酵素側については、活性部位の情報が得られたので、分子プローブに対して求核的に反応するシステイン残基を導入することにした。β-アミノ酸のアミノ基の認識に関わる残基に変異を導入することで、分子プローブとクロスリンクすることが期待されるためである。現在までに、クロロアセトアミド、クロロアクリルアミドパンテテインミミックを合成し、さらに CoA 合成酵素と PPTase を用いて修飾 ACP を調製した。

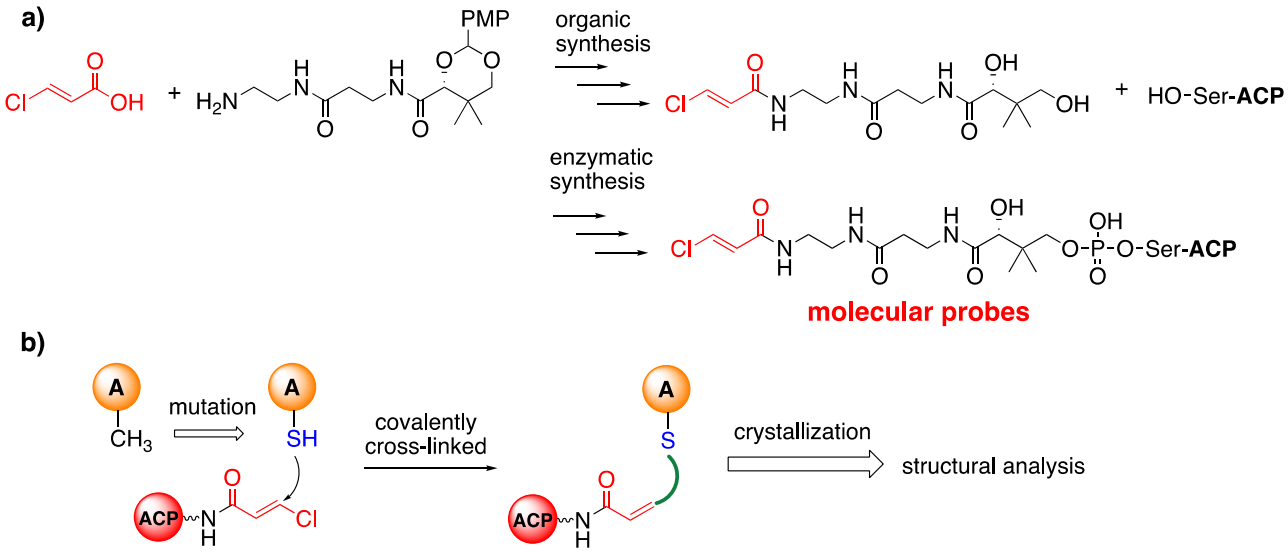


図 4. クロスリンク反応に用いる分子プローブ調製法（a）とクロスリンク反応の模式図（b）

2. アシル基転移酵素と ACP の相互作用解析に向けた研究

ジペプチジル-ACP のジペプチジル基を、PKS のローディングモジュールの ACP ドメインへと転移する AT に関し

ては、vicenistatin 生合成における AT である VinK とジペプチジル基のドナー側 ACP である VinL、ビスマレイミドエタン（BOME）をクロスリンク反応剤として用いたときに複合体を得ることに成功していた［4］。ここでは VinK 側の活性部位の適切な位置にシステイン残基を変異導入することにより、クロスリンク反応が選択的かつ効率よく進行した。

本研究では、VinK とジペプチジル基のアクセプター側 ACP であるモジュラー型 PKS のローディングモジュールにある VinP1_ACP との複合体化を検討することにした。VinL の場合と同様に BOME をクロスリンク反応剤として用いると、VinK とクロスリンクされた複合体を得ることに成功した。しかしながら、VinK-VinP1_ACP の複合体化の効率は悪く、結晶化には至っていない。そこで、前述したパンテテインミミックを利用した修飾 ACP を調製してクロスリンク反応の効率化を図ることにした。ここでは、研究対象としている生合成系に特徴的なジペプチド中間体をミミックした分子プローブも検討することにした。現在、デザインした分子プローブの合成を行っている。また、VinK-VinP1_ACP の組み合わせだけでなく、VinK-VinL の組み合わせも含め、様々な AT と ACP とのクロスリンク反応を検討することにした。現在までに、2-クロロアセトアミドなどの分子プローブを用いたときに、AT と ACP のクロスリンク反応が進行することが分かってきた。現在、反応条件の最適化を検討して、結晶化に耐えうる量の複合体を得るべく検討している。

考　察

本研究では、まず、3-アミノブタン酸と 3-アミノノナン酸を認識するアデニル化酵素の結晶構造解析から、それぞれの β-アミノ酸認識機構を解明することができた。これら β-アミノ酸を受け取る ACP との相互作用解析に向けて、変異導入可能なアミノ酸残基を見いだすことができた。いくつかの分子プローブは合成できているので、アデニル化酵素と ACP の複合体化に向けた基盤を構築することができた。今後は、分子プローブを用いたクロスリンク反応の効率を定量的に評価しつつ、複合体化を最適化して結晶構造解析につなげて行きたいと考えている。

アシル基転移酵素と ACP との相互作用解析に関しては、BMOE をクロスリンク剤として用いた場合に複合体化と結晶構造解析に成功していたが、BMOE は万能ではなく、研究対象としているアシル基転移酵素と ACP に合わせた分子プローブが有効であることが分かってきた。今後は、アシル基転移酵素への変異導入部位を検討しつつ、分子プローブを工夫することで、結晶化に耐えうる複合体を得るべく研究を推進していく。

謝　辞

本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1）Miyanaga A, Kudo F, Eguchi T. Mechanisms of β-amino acid incorporation in polyketide macrolactam biosynthesis. Curr. Opin. Chem. Biol. 2016 Dec;35:58-64. DOI: 10.1016/j.cbpa.2016.08.030

2）Miyanaga A, Cieslak J, Shinohara Y, Kudo F, Eguchi T. The crystal structure of the adenylation enzyme VinN reveals a unique β-amino acid recognition mechanism. J. Biol. Chem. 2014 Nov 7;289(45):31448-31457. DOI: 10.1074/jbc.M114.602326

3）Cieslak J, Miyanaga A, Takaku R, Takaishi M, Amagai K, Kudo F, Eguchi T. Biochemical characterization and structural insight into aliphatic β-amino acid adenylation enzymes IdnL1 and CmiS6. Proteins. 2017 Jul; 85(7):1238-1247. DOI: 10.1002/prot.25284

4）Miyanaga A, Iwasawa S, Shinohara Y, Kudo F, Eguchi T. Structure-based analysis of the molecular interactions between acyltransferase and acyl carrier protein in vicenistatin biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2016 Feb 16;113(7):1802-1807. DOI: 10.1073/pnas.1520042113