

令和元年6月2日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18501

研究課題名(和文) サステイナブルな物質生産を目指したプレニル基転移酵素の構造・機能解析

研究課題名(英文) Structure and functional analyses of novel prenyltransferase to produce novel compounds.

研究代表者

松井 崇 (Matsui, Takashi)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：30463582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：放線菌由来抗生物質の生合成に関与する本酵素はアミノ酸配列相同性解析からプレニル基合成酵素ファミリーに属する蛋白質であると示唆されたが、基質や触媒残基、触媒反応機構は不明であった。そこで、本酵素遺伝子を大腸菌異種発現系に導入し大量発現させた。また、単離精製した酵素を結晶化し、また、基質と推定される化合物と混合し酵素反応させLC-MSで解析することで機能解析を実施した。その結果、結晶化により本酵素の低分解能な回折像を得ることに成功し、さらに、機能解析の結果、インドール環を持ついくつかの化合物に対し、ファルネシル基を付加可能な基質寛容性を持つプレニル基転移酵素であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では抗生物質生産に関与する生合成酵素のうち、遺伝子解析から抗生物質の基本骨格を形成すると予想された酵素をターゲットとした。本酵素を精製して実際に基本骨格を形成する酵素であることを立証したのは本研究がはじめてである。また、本研究から、本酵素は一つの化合物のみを限定して化学変換する酵素ではなく、受け入れる化合物には一定の許容範囲が存在することが立証された。今後、この基質認識機構の特徴を活かし、本酵素の機能を改変することで全く新規な骨格を有する有用化合物を創出する応用研究へと発展させることで、社会問題である感染症やガンなどに対する医薬品等への展開を目指す。

研究成果の概要(英文)：Although the enzyme derived from an antibiotics gene cluster in *Streptomyces* was predicted a prenyltransferase, it had unclear how the enzyme catalyzes its substrate, and where the catalytic residues locate on as well. In this study, the enzyme was over expressed using *E. coli* system, and C-terminal His-tag fused enzyme was purified as soluble fraction.

The enzyme was mixed with compounds that were substrate candidates. LC-MS analyses suggested that the enzyme accommodated some indole compounds as acceptor substrate and released the prenylated indole products.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：プレニル基転移酵素 LC-MS 機能解析 生合成酵素

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プレニル基転移酵素 (PT) によって修飾された天然化合物は母骨格の化合物に比べ強力な生物活性 (抗菌, 抗酸化, 抗腫瘍等) を獲得することがある. これらのプレニル化合物には抗不整脈薬アジュマリン, 抗高血圧薬レセルピンや鎮痛薬エルゴタミンなど医薬品に利用されている化合物が多く存在する. このように PT が産生する化合物は非常に有益な化合物が多く存在するため, PT の機能解析や構造解析から機能改変した酵素を用いた新規化合物生産の研究が進められている. 一方, PT のうちインドールに対してプレニル基を転移する酵素 (IPT) は, 非天然型化合物への変換に向けた応用研究が進められているが, IPT の立体構造情報を基にした合理的な機能改変研究は進んでいなかった.

2. 研究の目的

本研究では, IPT のなかでも異なる基質特異性を持つ複数の IPT の機能・構造解析から, IPT の持つ普遍的な基質認識機構と, 個々の IPT が持つ基質特異性に関与する構造的特徴を明らかにすることで, 効率的に有益物質を生産可能な変異型 IPT の創出を目指した.

3. 研究の方法

上記目的を達成するために, 以下に示す方法により研究を進めた.

(1) IPT 候補遺伝子の発現

IPT 候補遺伝子は *E. coli* 発現系で発現するために大腸菌のコドンに最適化した二本鎖 DNA の合成を依頼購入した. 購入した二本鎖 DNA は Clontech 社の InFusion により pQE80L, pET22b または pGEX6P-1 プラスミドベクター中のマルチクローニングサイトにそれぞれ N 末端 His タグ, C 末端 His タグおよび N 末端 GST タグになるように組み込み, *E. coli* BL21 (DE3) によって発現させた. 得られた融合タンパク質はアフィニティカラムとゲルろ過カラムおよび陰イオン交換カラムを用いて高純度に精製した.

(2) IPT 候補蛋白質の酵素反応試験

100 μ g IPT 候補蛋白質は 1 mM フェルネシルピロリン酸と 1 mM プレニル基受容基質 (インドール等) と混合し, 20°C で 16 時間反応させた. その後, 反応溶液と当量の *n*-ヘキサンと混合して有機層のみを抽出し, 30% から 100% アセトニトリル (0.08% トリフルオロ酢酸) の直線勾配を駆けた C18 逆相 HPLC により生成化合物を分析した.

(3) IPT 酵素反応生成物の同定

酵素反応試験で検出された生成化合物を分取し, EASY-nLC 1000 HPLC を接続した Q-Exactive を装備した orbitrap MS を用いて質量分析を行った.

(4) IPT の結晶化と X 線結晶構造解析

高純度精製した IPT は市販のスクリーニングキットを用いて結晶化を行った. 得られた単結晶は高エネルギー加速器研究機構の PF-1A, 17A, NW12 を用いて回折像を取得した.

4. 研究成果

次世代ゲノムシーケンサーおよびデータベースを用いて放線菌数種類から IPT 候補遺伝子を探索し, 4 種類の IPT 候補遺伝子はそれぞれ個別に大腸菌異種発現用プラスミドへ組み込んだ. 4 種類の候補遺伝子のうち, オリダマイシン生合成遺伝子クラスターと推定されるクラスターに存在した遺伝子について大腸菌による発現条件の検討と, 安定な精製条件の検討を行った. 安定な精製条件の検討には精製用タグ (N 末端 His タグ, C 末端 His タグおよび N 末端 GST タグ) や精製用タグの切断のための TEV プロテアーゼ認識配列を付加し, これらの各種精製タグ等を付加した候補蛋白質を大腸菌により発現させた.

その結果, 2 種類の IPT において (IPT1, IPT2 と明記する), N 末端 His タグおよび C 末端 His タグを付加した試料で LB 培地 1 L 当たり 5 mg 以上の発現量で試料を調製可能となった. しかし, IPT1 および IPT2 に精製タグを融合した試料は白濁沈殿を生じないものの溶液中で soluble aggregation 状態として存在し, プレニル基転移活性を示さなかった. そこで, 各精製タグ融合試料について, 精製条件を検討した結果, 4°C 条件下で数日間単量体状態を保持した IPT1 の調製に成功した.

単量体化した IPT1 についてプレニル基転移活性を解析した. LC-MS 測定の結果, IPT1 はフェルネシルピロリン酸をプレニル基供与基質, インドールをプレニル基受容基質として受け入れることでインドールにフェルネシル基が付加された分子と一致した m/z が観測され, IPT1 がプレニル基を転移可能なプレニル基転移酵素であることを明らかにした (図 1). さらに, インドールの 3 位にエチルアミンが付加されたトリプタミンについても同様に LC-MS で解析した結果, IPT1 はインドールだけではなくトリプタミンに対してもフェルネシル基を付加できるプレニル基転移酵素であることを明らかにした (図 2). インドールはオリダマイシン生合成におけるスタート基質であると考えられている. しかし, 本知見から酵素単独の機能として考えると, IPT1 はインドール環を有するトリプタミンに対しても基質触媒反応を示すことが可能であり, オリダマイシン生合成機構において, オリダマイシン以外の複雑な化合物も産生している

可能性も示唆された。

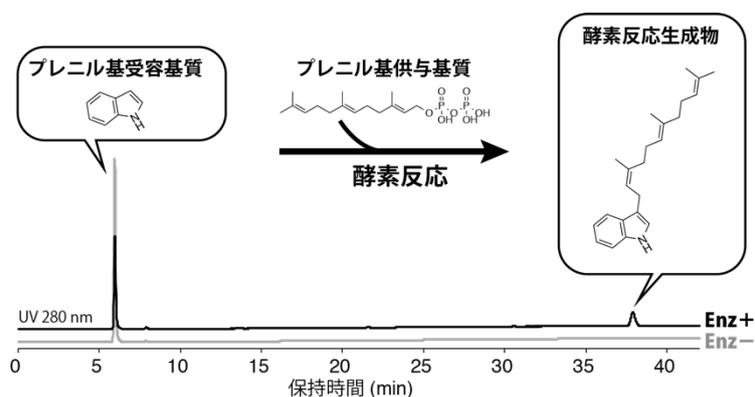


図 1. IPT1 による酵素反応. IPT 付加 (Enz+) とコントロール (Enz-) での 280 nm の吸光度に対するクロマトグラム.

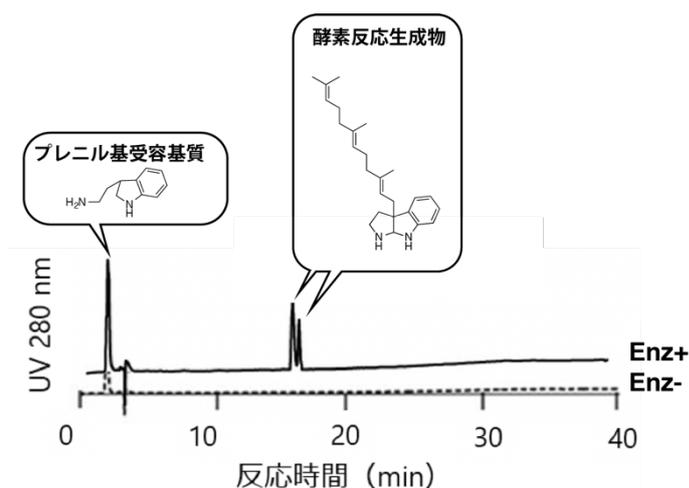


図 2. IPT1 による酵素反応. IPT 付加 (Enz+) とコントロール (Enz-) での 280 nm の吸光度に対するクロマトグラム.

プレニル基転移酵素であることが確定した IPT1 についてはさらに結晶化スクリーニングキットを用いて初期結晶の結晶化条件を探索した。その結果、1 辺が 10 μm 程度の微小結晶を得ることができたが、良好な回折像が得られる結晶化条件ではなかった。さらなる結晶化条件の最適化を行っているが、立体構造は現在までのところ得られていない。そこで、既に構造解析されている類縁酵素の立体構造を基にモデル構造を構築した。現在は、このモデル構造から基質結合・触媒残基を推定し、変異酵素を作成中である。

今後は、さらなる結晶化条件の探索と、モデル構造から得られた変異酵素による機能解析を進め、また、生合成遺伝子クラスターの構成から他の基質を受け入れると推定される酵素との機能・構造比較を進めることで、人工的な新規 IPT 酵素の創出を目指す。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕 (計 9 件)

1. Hashimoto T., Ye Y., Ui M., Ogawa T., **Matsui T.**, Tanaka Y.: Protein encapsulation in the hollow space of hemocyanin crystals containing a covalently conjugated ligand. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 514:31-36, 2019, 査読有.
2. Tanaka Y., Kato S., Stabrin M., Raunser S., **Matsui T.**, Gatsogiannis C.: CryoEM reveals the asymmetric assembly of squid hemocyanin. *IUCrJ*, 6:426-437, 2019, 査読有.
3. **Matsui T.**, Kamata S., Ishii K., Maruno T., Ghanem N., Uchiyama S., Kato K., Suzuki A., Oda-Ueda N., Ogawa T., Tanaka Y.: SDS-induced oligomerization of Lys49-phospholipase A₂ from snake venom. *Sci. Rep.*, 9:2330, 2019, 査読有.
4. Hashimoto T., Ye Y., Matsuno A., Ohnishi Y., Kitamura A., Kinjo M., Abe S., Ueno T., Yao M., Ogawa T., **Matsui T.**, Tanaka Y.: Encapsulation of biomacromolecules by soaking and

co-crystallization into porous protein crystals of hemocyanin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 509(2):577-584, 2019, 査読有.

5. 加藤早苗, **松井崇**, 田中良和: 3.8 MDa の超巨大酸素運搬タンパク質へモシアニン会合体の結晶構造. *生化学会誌*, 90(2), 238-243, 2018, 査読有.
6. Kato S., **Matsui T.**, Gatsogiannis C., Tanaka, Y.: Molluscan Hemocyanin: Structure, Evolution, and Physiology, *Biophys. Review*, 10:191-202, 2018, 査読有.
7. **Matsui T.**: Structural basis for the N-terminal capping onto the ribosomal peptide by novel peptide ligase PGM1. *J. Cryst. Soc. JPN*, 59:96-101, 2017, 査読有.
8. **Matsui T.**, Kodama T., Mori T., Tadakoshi T., Noguchi H., Abe I., Morita H.: 2-Alkylquinolone Alkaloid Biosynthesis in the Medicinal Plant *Evodia rutaecarpa* Involves Collaboration of Two Novel Type III Polyketide Synthases. *J. Biol. Chem.*, 292:9117-9135, 2017, 査読有.
9. **Matsui T.**, Lallo S., Nisa K., Morita H.: Filamenting temperature-sensitive mutant Z inhibitors from *Glycyrrhiza glabra* and their inhibitory mode of action. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 27:1420-1424, 2017, 査読有.

[学会発表] (計 8 件)

1. **松井崇**, 鎌田しずか, 石井健太郎, 丸野孝浩, ガーネムノーラン, 内山進, 加藤晃一, 鈴木淳臣, 上田直子, 小川智久, 田中良和: ホスホリパーゼ A2 アナログの立体構造解析と SDS による多量体化. 2018 年度量子ビームサイエンスフェスタ, 2019/3/12, つくば.
2. 橋本翼, **松井崇**, 小川智久, 田中良和: 蛋白質結晶中の巨大な空隙への蛋白質の包摂. 2018 年度量子ビームサイエンスフェスタ, 2019/3/12, つくば.
3. 鎌田しずか, **松井崇**, 小川智久, 鈴木淳臣, 上田直子, 田中良和: ハブ毒菌壊死因子 Lys49-ホスホリパーゼ A₂ の構造解析. 2017 年度量子ビームサイエンスフェスタ, 2018/3/4, 水戸.
4. **松井崇**, 児玉猛, 只腰哲弘, 森貴裕, 野口博司, 阿部郁朗, 森田洋行: 呉茱萸由来 2-アルキルキノロンの生合成機構の解明. 日本生物物理学会東北支部会, 2017/12/22, 仙台. (口頭)
5. 土生津光, 齋藤浩唯, 柴田弘紀, 大野素徳, 服部正策, **松井崇**, 田中良和, 村本光二, 小川智久: ハブゲノム解読から見出された新規 Three-finger toxins の発現と機能解析. ConBio2017, 2017/12/8, 神戸.
6. **松井崇**: 薬剤耐性感染症克服を目指した新規標的蛋白質と抗生物質生合成酵素の構造・機能解析. 和漢医薬学総合研究所東西医薬学交流セミナー, 2017/3/28, 富山. (招聘講演, 口頭)
7. **松井崇**, 児玉猛, 只腰哲弘, 森貴裕, 野口博司, 阿部郁朗, 森田洋行: 漢方生薬由来 III 型ポリケタイド合成酵素の X 線結晶構造解析. 2016 年度量子ビームサイエンスフェスタ, 2017/3/14-15, つくば.
8. **松井崇**, 楊新美, 周曉希, 児玉猛, 森貴裕, 野口博司, 阿部郁朗, 森田洋行: アサ由来ポリケタイド閉環酵素のポリケタイド閉環機構の解明. 平成 28 年度日本結晶学会年会および会員総会, 2016/11/18, 水戸. (口頭)

[その他]

ホームページ等

富山大学和漢医薬学総合研究所天然物化学分野

(<http://www.inm.u-toyama.ac.jp/napc/>)

東北大学生命科学研究科応用生命分子解析分野

(<https://www.lifesci.tohoku.ac.jp/labmos/>)

北里大学理学部物理学科生物物理学講座

(<https://www.kitasato-u.ac.jp/sci/resea/buturi/seitai/matsui/>)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：松井 崇

ローマ字氏名：Takashi Matsui

所属研究機関名：東北大学

部局名：生命科学研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：30463582

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。