

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24810015

研究課題名(和文) 型生合成酵素の触媒ドメイン間相互作用解析を指向したケミカルツールの創製と応用

研究課題名(英文) Mechanism-based crosslinkers of acyl carrier protein dehydratase

研究代表者

石川 文洋 (Ishikawa, Fumihiro)

京都大学・生理化学研究ユニット・助教

研究者番号：50631553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：有用天然有機化合物の多くは脂肪酸合成酵素(FAS)、ポリケチド合成酵素(PKS)および非リボソーム性ペプチド合成酵素(NRPS)と呼ばれる酵素群によって合成される。そのため、これら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るが、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ない。一因として、これら酵素システムの触媒ドメイン間の相互作用に関する構造情報が非常に限られているという事実がある。本研究では触媒ドメイン間の相互作用を解析するための低分子ツールを開発し、この相互作用を分子レベルで明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We reported the design, synthesis, and application of sulfonyl 3-alkynyl pantetheinamides that can cross-link acyl carrier proteins (ACPs) with beta-hydroxy-ACP dehydratase (DH) domains. This cross-linking strategy provides potential to investigate these enzymes in their native binding states by offering easy access to mechanistically cross-linked enzyme species.

研究分野：生物有機化学

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：生合成 脂肪酸合成酵素 ポリケチド合成酵素 パンテテインアナログ タンパク質-タンパク質相互作用

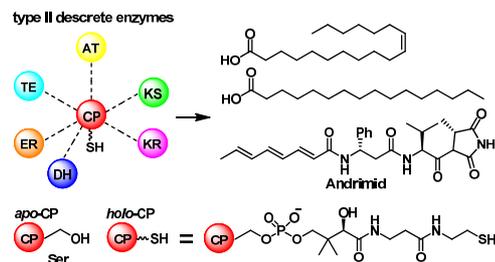
1. 研究開始当初の背景

微生物由来の脂肪酸合成酵素 (FAS)、ポリケチド合成酵素 (PKS) および非リボソーム性ペプチド合成酵素 (NRPS) が合成する天然有機化合物は、構造上極めて多様性に富んだ化合物群であり、それによってもたらされる生物活性の多様性から、将来にわたる医薬品の探索・供給源として有望視されている。さらに、タンパク質工学的手法でテーラーメイドな生合成経路の改変や複雑な骨格をもつ新規非天然化合物の創出が可能となれば、天然物に匹敵する化合物ライブラリーの構築や希少有用物質の安定供給への道が拓かれる。近年それに向けて、II型 FAS や II 型 PKS (サブユニット型) 生合成系を試験管内で再構築する試みが報告されつつある (Yu, X., Liu, T., Zhu, F., Khosla, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, 108, 18643-18648)。再構築が実現すると、ドメインスワッピング法などを利用した生合成工学への展開が可能となってくる。しかし、そのような手法は本来の触媒ドメイン間相互作用を破壊してしまうため、望む化合物ができない、あるいは収量の大幅な低下という結果になることがほとんどである (Doekel, S., Marahiel, M.A. *Chem. Biol.* **2000**, 7, 373-384, Nguyen, K.T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, 103, 17462-17467)。自由自在な生合成工学を達成するためには、まず本来の触媒ドメイン間相互作用を理解することが欠かせない。しかしながら重要な相互作用であるにもかかわらず、その解離定数はわずか 1-10 μM であるため共結晶構造等を解くことは難しく、これら相互作用についての理解はあまり深まっているとはいえない。

ところで、大腸菌 FAS や *Pantoea agglomerans* Eh335 PKS-NRPS hybrid [アンドリミド合成酵素 (Adm)] に代表される II 型生合成酵素は個々の触媒ドメイン (AT: acyltransferase, KS: ketosynthase, DH: dehydratase, KR: ketoreductase, ER: enoylreductase, TE: thioesterase) が独立して存在している (図 1a)。また担体タンパク質 (CP: carrier protein) は基質、中間体および生成物の担体として中心的な役割を担っている。すなわち CP がセリン残基に共有結合したホスホパンテテイン末端にチオエステル結合を解して基質を保持し (図 1a)、他の触媒ドメインすべてと相互作用と化学反応を繰り返すことによって脂肪酸やポリケチドの合成が進行していく (図 1b)。近年、Burkart らによって CP のセリン残基にワンポット化学-酵素合成法を利用することによりあらゆる機能 (蛍光標識やビオチン標識) を有するパンテテインアナログを付加する方法が確立された (Worthington, A.S. *et. al. ACS Chem. Biol.* **2006**, 1, 687-691)。すなわち、パンテテインアナログとして基質を模倣した不可逆的阻害剤が設計できれ

ば、クロスリンク反応を指標とし触媒ドメイン間相互作用を解析することが可能であると期待して以下の研究を計画している。

(a)



(b)

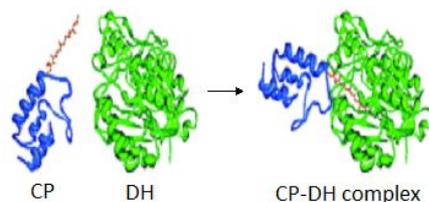


図 1 (a) II 型 FAS および PKS. (b) 触媒ドメイン間相互作用。

2. 研究の目的

微生物が産生する二次代謝産物は、その生物活性の多様性から生物学において重要な研究ツールとなり創薬シーズとなってきたことは疑う余地のない事実である。そのような天然物の多くは FAS, PKS および NRPS と呼ばれる酵素群によって合成される。そのため、これら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るが、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ない。一因として、これら酵素システムの触媒ドメイン間相互作用に関する構造情報が非常に限られているという事実がある。本研究では触媒ドメイン間の相互作用を解析するためのケミカルツールを開発し、この相互作用を分子レベルで解明することを目的とする。さらに、取得したデータをもとに、X 線結晶構造解析や生合成工学への展開を目指す。

3. 研究の方法

(i) DH に対する触媒機構に基づく不可逆的阻害剤の設計および合成

E. coli FAS の脱水酵素 (FabA, DH) は基質である 3-hydroxydecanoyl-S-CP の脱水反応および異性化反応を触媒する (図 2a)。また申請者は、以前 FAS および PKS の DH に対する特異的ラベル化剤を報告した。これら知見に基づき、プロパルギルスルホン scaffold とするパンテテインアナログ 1 および 2 を設計した (図 2b)。1 の不可逆的阻害機構は DH の触媒残基であるヒスチジン

クロスリンク反応を基盤に非天然型 CP-DH 相互作用の解析を行う。大腸菌 FAS や *P. agglomerans* Adm (PKS-NRPS) に代表される II 型生合成酵素は各触媒ドメインが独立して存在している。そのため、ドメインスワッピング法などを利用した生合成工学へと展開が比較的容易な系である。しかしながら、そのような手法は本来の触媒ドメイン間相互作用を破壊してしまうため、望む化合物ができない、あるいは収量の大幅な低下という結果になることがほとんどである。これは、脂肪酸やアンドリミドが合成される過程は精密なタンパク質-タンパク質相互作用によって制御されているためである。そこで、CP-DH 相互作用をモデルとし、クロスリンク剤を組み合わせることで、非天然型 CP-DH 相互作用の理解に迫ることを目指した。*S. roseofulvus* 由来の FrenACP (PKS), *S. colicolor* 由来の ActACP (PKS), *S. rimosus* 由来の OtcACP (PKS) および *V. cholerae* 由来の VibB (CP, NRPS), *E. coli* 由来の EntB (CP, NRPS) と *E. coli* 由来の FabA (DH, FAS) との非天然相互作用と *E. coli* 由来の AcpP (CP, FAS) および FabA (DH, FAS) の天然相互作用の比較をクロスリンク反応を指標に試みた。Apo-FrenACP, apo-ActACP, apo-OtcACP, apo-VibB, および apo-EntB をワンポット化学-酵素合成法によりパンテテインアナログ 1 をそのセリン残基に担持した crypt-CP をそれぞれ作製した。次に、FabA を添加し、37 で 12 時間クロスリンク反応を行った。FabA とのクロスリンク反応は FrenACP, ActACP, OtcACP で観測された。天然相互作用 AcpP-FabA のバンド強度に対して、非天然相互作用 FrenACP-FabA, ActACP-FabA, および OtcACP-FabA のバンド強度はそれぞれ、41%, 28%, 9% であった。一方、VibB および EntB を用いた場合、クロスリンク反応は全く進行しなかった。これは、II 型 FAS ACP と II 型 PKS ACPs のアミノ酸配列の相溶性および構造的類似性に起因すると推察される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Kengo Miyamoto, Fumihiko Ishikawa, Shinya Nakamura, Yutaka Hayashi, Isao Nakanishi, Hideaki Kakeya*, A 7-dimethylallyl tryptophan synthase from a fungal *Neosartorya* sp.: biochemical characterization and structural insight into the regioselective prenylation, *Bioorg. Med. Chem.*, 22, 2517-2528 (2014). doi: 10.1016/j.bmc.2014.02.031 査読有。
Fumihiko Ishikawa,* Hideaki Kakeya*, Specific enrichment of nonribosomal peptide synthetase module by an

affinity probe for adenylation domains, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 24, 865-869 (2014). doi:

10.1016/j.bmcl.2013.12.082 査読有。

Chi Nguyen, Robert W. Haushalter, D. John Lee, Phineus R. L. Markwick, Joel Bruegger, Grace Caldara-Festin, Kara Finzel, David R. Jackson, Fumihiko Ishikawa, Bing O' Dowd, J. Andrew McCammon, Stanley J. Opella, Shiou-Chuan Tsai,* Michael D. Burkart*, Trapping the dynamic acyl carrier protein in fatty acid biosynthesis, *Nature*, 505, 427-431 (2014). doi: 10.1038/nature12810 査読有。

・Highlighted: "How Acyl Carrier Proteins Work." Borman, S. *Chemical and Engineering News*, 92 (3), January 20, 2014; p 36-37.

Fumihiko Ishikawa, Robert W. Haushalter, D. John Lee, Kara Finzel, and Michael D. Burkart*, Sulfonyl 3-alkynyl pantetheinamides as mechanism-based crosslinkers of ACP dehydratase, *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 8846-8849 (2013). doi: 10.1021/ja4042059 査読有。

・Highlighted in JACS Spotlights, *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 9959 (2013).

[学会発表](計 10 件)

今野 翔, 石川 文洋, 掛谷 秀昭
光親和性プローブを利用したアデニレーションドメインに対するリガンド依存的標識化, 日本薬学会 第 134 年会, 2014 年 3 月, 熊本。

宮本 健吾, 石川 文洋, 林 豊, 掛谷秀昭, 糸状菌 *Neosartorya* 属由来プレニル基転移酵素に関する研究, 第 5 回食品薬学シンポジウム, 2013 年 11 月, 京都。

石川 文洋, アデニレーションドメインに対する高親和性プローブ開発を基盤とした二次代謝産物合成酵素およびその遺伝子クラスターの同定法の確立, 平成 25 年度 日本薬学会 生薬天然物部会 奨励研究賞 受賞講演, 第 5 回食品薬学シンポジウム, 2013 年 11 月, 京都。

杉本 泰康, 石川 文洋, 宮本 健吾, 栗田 雅史, 今野 翔, 掛谷 秀昭, Andrimid の生合成酵素の機能解析, 第 7 回バイオ関連化学シンポジウム, 2013 年 9 月, 愛知。

今野 翔, 石川 文洋, 掛谷 秀昭, アデニレーションドメインを標的とした光親和性プローブの開発, 第 7 回バイオ関連化学シンポジウム, 2013 年 9 月,

愛知.

石川 文洋, 掛谷 秀昭, Adenylation
ドメインを標的とした高親和性プロー
ブの開発, 日本ケミカルバイオロジー
学会第8回年会, 2013年6月, 東京

宮本 健吾, 石川 文洋, 林 豊, 掛
谷 秀昭, 糸状菌 *Neosartorya* sp. 由来
プレニル基転移酵素の機能解析, 日本
ケミカルバイオロジー学会第8回年会,
2013年6月, 東京.

石川 文洋, 掛谷 秀昭, LC-MS/MSを用
いた低分子プローブに対する標的タン
パク質の同定 第13回日本蛋白質科学
会年会, 2013年6月, 鳥取.

宮本 健吾, 石川 文洋, 林 豊, 掛
谷 秀昭, 分子機能変換を指向した糸
状菌 *Neosartorya* sp. 由来プレニル基転
移酵素の機能解析, 日本薬学会 第133
年会, 2013年3月, 横浜.

石川 文洋, 掛谷 秀昭, 有用生合成酵
素の同定・機能解析を指向した化学ツ
ールの開発 - adenylation ドメインを標
的とした高親和性プローブの開発 - ,
日本薬学会 第133年会, 2013年3月, 横
浜.

〔図書〕(計 1 件)

石川 文洋, 荒木 通啓, 掛谷 秀昭,
天然物創薬とケモインフォマティクス,
ファルマシア, 48, 658-662 (2012), 査
読無.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp//sc-mols
ci/](http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp//sc-mols
ci/)

6. 研究組織

(1)研究代表者

石川 文洋 (ISHIKAWA FUMIHIRO)

京都大学・生理化学研究ユニット・助教

研究者番号: 50631553