

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850050

研究課題名(和文) 有用物質産生へ向けたATP依存型リガーゼの構造機能研究

研究課題名(英文) Structural and functional analysis of ATP-dependent ligases in macrolactam biosynthesis

研究代表者

宮永 顕正 (Miyanaga, Akimasa)

東京工業大学・理工学研究科・助教

研究者番号：10623126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ATP依存型リガーゼは、放線菌が生産するマクロラクタム抗生物質のβ-アミノ酸部位の多様性を生み出す鍵となる酵素である。本研究では、ビセニスタチン生合成に関わるVinNやクレミマイシン生合成に関わるCmiS6など、様々な基質特異性を示すATP依存型リガーゼの変異体解析とX線結晶構造解析を行い、それぞれのβ-アミノ酸選択機構を解明した。また、ヒタチマイシンの生合成遺伝子クラスターを同定し、ヒタチマイシンの生合成機構に関する知見を得た。さらに、その生合成系を利用することにより、非天然型ヒタチマイシンの生産にも成功した。

研究成果の概要(英文)：Macrolactam antibiotics such as vicenistatin and cremimycin contain various beta-amino acids at the starter position of the polyketide backbone. In their biosynthesis, a standalone ATP-dependent ligase serves as a gatekeeper for a specific beta-amino acid recognition and activation. However, the beta-amino acid recognition mechanism of ATP-dependent ligases remains elusive. To elucidate the beta-amino acid recognition mechanism, we carried out the structural and mutational studies of the ATP-dependent ligases including VinN, which activates 3-methylaspartate in vicenistatin biosynthesis and CmiS6, which activates 3-aminononanoate in cremimycin biosynthesis. The VinN structure complexed with 3-methylaspartate provides detail mechanistic insights into the selective recognition of beta-amino acids in this family of enzymes. We also identified the biosynthetic gene cluster of hitachimycin, which is another macrolactam compound.

研究分野：農学

キーワード：生合成 マクロラクタム抗生物質 β-アミノ酸 ATP依存型リガーゼ X線結晶構造解析 ポリケチド

1. 研究開始当初の背景

マクロラクタム化合物はポリケチド鎖伸長の開始基質としてβ-アミノ酸を利用して形成され、様々な抗菌性や抗腫瘍性を有する化合物が多数知られている (図 1)。放線菌 *Streptomyces halstedii* HC34 株が生産するビセニスタチン (vicenistatin) は、ヒト大腸がん細胞に強い細胞毒性を示す有望なマクロラクタム化合物である。ビセニスタチンのβ-アミノ酸開始基質部位を生合成工学的的手法を用いて改変させることにより、生物活性が改善した類縁体の創製が期待できる。そのような観点から、ビセニスタチンの生合成機構を調べた結果、2種類の ATP 依存型リガーゼ VinN と VinM が関わるユニークな開始基質組込み系を有していることを見いだした (Shinohara et al., JACS, 2011)。

VinN はビセニスタチン生合成におけるゲートキーパーの役割をしており、β-アミノ酸である 3-メチルアスパラギン酸を厳密に認識して、アシルキャリアータンパク質 (ACP) である VinL 上にロードする反応を触媒する (図 2)。この酵素の基質特異性を改変させることができれば、天然型とは異なるβ-アミノ酸を取り込ませて、新たなマクロラクタム化合物の創製も期待できる。しかし、これまでに、β-アミノ酸を認識する ATP 依存型リガーゼの結晶構造の報告例はなく、β-アミノ酸の認識機構は明らかになっていない。

また、VinM は ACP にロードされたβ-アミノ酸の末端アミノ基に L-アラニンが付加する反応を触媒する。この VinM はチオエステル結合形成ではなくアミド結合形成を触媒するという点で既知の ATP 依存型リガーゼにはない特異的な性質を示しており、その機構は不明である。この反応機構を知ることは学術的に興味深い。

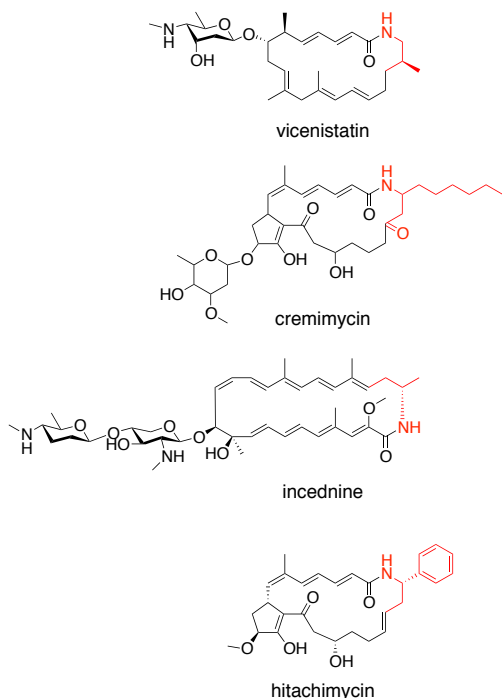


図 1 各マクロラクタム化合物の化学構造

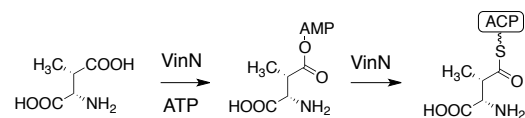


図 2 VinN の反応

2. 研究の目的

本研究課題では、マクロラクタム化合物生合成に関わる VinN 型と VinM 型の二種類の ATP 依存型リガーゼを対象とし、結晶構造解析や機能解析により、これら ATP 依存型リガーゼのβ-アミノ酸認識機構やアミド結合形成機構を明らかにすることを目的とした。また、ATP 依存型リガーゼの基質特異性に関する知見を広げるため、β-フェニルアラニンを開始基質部位に有するヒタチマイシンの生合成解析も行った。

3. 研究の方法

大腸菌の系を用いて、VinN や VinM などの組み換え酵素を発現させた。その精製酵素を用いて、結晶化条件の探索を行った。結晶が得られたものについては、放射光施設にて X 線回折データを収集した。さらに、得られた結晶構造を元に、部位特異的変異導入を行い、得られた変異体の反応解析を行った。一方、ヒタチマイシン生合成遺伝子クラスターの解析については、情報に従ってゲノム DNA を取得した後、シーケンス解析を外部機関に委託した。また、ヒタチマイシン生合成遺伝子破壊株に関しては、λ-Red 系相同組換え機構を利用して構築したプラスミドを接合法によって宿主に導入し、ゲノム DNA と相同組み換えを起こさせることで取得した。

4. 研究成果

本研究課題で得られた成果を 4 つの項目に分け、以下に記載する。

(1) VinN の結晶構造解析と機能解析

VinN のβ-アミノ酸認識機構を明らかにすべく、結晶構造解析を行った。最初に、VinN の全長配列を用いて結晶化を行ったが、結晶は得られなかった。100 残基程度からなる C 末ドメインが定まった構造を取っていないため、結晶化が阻害されていると考え、基質結合ポケットを含む N 末ドメインのみの結晶化を試みた。その結果、良質な結晶が得られたため、結晶構造解析を行い、基質非結合型の構造を分解能 2.15 Å にて決定した。また、3-メチルアスパラギン酸を結晶に浸透させることにより、3-メチルアスパラギン酸との複合体構造も分解能 2.20 Å にて決定した (図 3)。複合体構造において、3-メチルアスパラギン酸の 1 位のカルボキシ基は Lys330 と Arg331 の 2 つの塩基性残基により厳密に認識されていた。K330A、R331A 変異体は 3-メチルアスパラギン酸に対し、ほとんど活性を示さなかったことから、これら 2 つの塩基性残基は 3-メチルアスパラギン酸の認識に重要であることが分かった。

また、 β -アミノ基は Asp230 により認識されていた。 α -アミノ酸を認識する ATP 依存型リガーゼ GrsA では、 α -アミノ基は Asp235 により認識されていることが報告されており、基質のアミノ基の認識にはアミノ基の位置の違いに関わらず、保存されている Asp 残基が関わるということが分かった。さらに詳細に GrsA の構造と比較した結果、Asp 残基の隣に位置する残基が GrsA では Ala236 と小さな残基であったのに対し、VinN ではかさ高い Phe231 残基が存在していた。また Lys330 と Arg331 を有する基質結合ループが GrsA に比べ 1 残基短くなっていた。これらの違いにより、VinN は特徴的な基質結合ポケットを形成しており、これにより β -アミノ酸に対する選択性が生み出されていることが分かった。

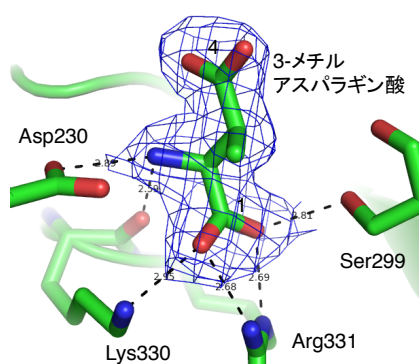


図 3 VinN の基質結合ポケットの構造

(2) クレマイシン生合成に関わる CmiS6 とインセドニン生合成に関わる IdnL1 の解析

次に、異なる β -アミノ酸を開始基質部位に有するクレマイシンやインセドニンの VinN 型 ATP 依存型リガーゼの解析を行った。まず、クレマイシン生合成に関わる CmiS6 の基質特異性を解析したところ、3-アミノノナン酸や 3-アミノヘプタン酸などの鎖長の長い 3-アミノ脂肪酸や β -フェニルアラニンなどに活性を示し、比較的寛容な基質特異性を示すことが分かった。次に、インセドニン生合成に関わる IdnL1 の基質特異性を解析した。その結果、鎖長の短い 3-アミノブタン酸に活性を示した一方で、3-アミノノナン酸などの鎖長の長い 3-アミノ脂肪酸には活性を示さなかった。ここで、VinN との配列比較を行ったところ、 β -アミノ基の認識に関わるアミノ酸残基は保存されており、共通的な β -アミノ酸認識機構が推定された。一方、 β 位の置換基の認識に関わるアミノ酸残基に違いが見られ、その結果として各生合成経路に特異的な β -アミノ酸を認識していることが分かった。

次に、CmiS6 の基質認識機構に関する知見を更に得るため、CmiS6 の結晶構造解析を行った。その結果、基質非結合型の構造を分解能 2.20 Å にて決定することに成功した。CmiS6 は疎水的な基質結合ポケットを有し

ており、これが 3-アミノノナン酸の疎水的なアルキル鎖の認識に関わると考えられた。ここで、CmiS6 と IdnL1 はアミノ酸配列の同一性が 60% と高いにも関わらず、異なる基質特異性を示すことから、その基質認識機構の違いに興味を持たれた。CmiS6 と IdnL1 の配列比較を行った結果、CmiS6 の疎水的な基質結合ポケットの形成に関わる Gly220 残基が IdnL1 ではかさ高い Leu へと置き換わっていた。この違いにより、基質特異性の違いが生まれている可能性が考えられた。そこで、CmiS6 の G220L 変異体を作製し、機能解析を行ったところ、3-アミノノナン酸への活性が顕著に低下し、3-アミノブタン酸など短い鎖長の 3-アミノ脂肪酸を基質として好むことが分かった。このように、CmiS6 にわずか 1 アミノ酸残基の変異を導入することにより、IdnL1 型酵素へと変換することに成功した。

(3) VinM の結晶構造解析

VinM の特異なアミド形成機構に関する知見を得るため、結晶化を行った。しかし、解析に適した結晶を得ることができなかった。さらに結晶化条件を探索するため、中間体アナログである 5'-O-[N-(alanyl)sulfamoyl]adenosine を合成し、これとの共結晶化を試みることにした。この中間体アナログは強い VinM 活性阻害能を示したことから、VinM に強固に結合し、結晶化に適したコンフォメーションの安定化をするのではないかと期待された。しかし、この中間体アナログ存在下でも結晶は得られなかった。このことから、別のマクロラクタム生合成に関わる VinM 型酵素を結晶化のターゲットとして選定した方が良いと考えられた。

(4) ヒタチマイシン生合成解析とその生合成に関わる HitB の解析

ATP 依存型リガーゼの基質特異性に関する知見を拓げるため、 β -フェニルアラニンを開始基質部位に有するヒタチマイシンの生合成解析を行った。生産菌のゲノム解読によりヒタチマイシンの生合成遺伝子クラスターを特定した結果、フェニルアラニン-2,3-アミノムターゼ遺伝子 *hitA* が含まれていたことから、HitA がヒタチマイシンが用いる開始基質である β -フェニルアラニンの生成に関わると考えられた。この *hitA* 遺伝子の破壊株を作製し、培養したところ、ヒタチマイシン生産能を失った。また、この遺伝子破壊株に外部から β -フェニルアラニンを投与して培養したところ、ヒタチマイシン生産能を回復した。このことから、*hitA* 遺伝子がヒタチマイシン生合成に関わることが裏付けられた。

次に、VinN 型 ATP 依存型リガーゼである HitB の基質特異性に関する知見を得るため、機能解析を行った。その結果、HitB は本来の基質である β -フェニルアラニンに加え、3-ア

ミノノナン酸など 3-アミノ脂肪酸に活性を示した。この HitB の基質特異性の寛容性から、β-フェニルアラニンの類縁体を *hitA* 遺伝子破壊株に投与して培養すれば、これらの類縁体を開始基質部位に取り込んだ非天然化合物の生産が可能であると考えた。その結果、実際に、β-フェニルアラニンの芳香環にフルオロ基が導入された 4F-β-フェニルアラニン、3F-β-フェニルアラニン、2F-β-フェニルアラニンをそれぞれ取り込んだ非天然型ヒタチマイシンの生産に成功した。一方、3-アミノノナン酸を投与した際に、これを取り込んだ非天然型ヒタチマイシンの生産は確認されなかったことから、HitB 以外の下流の生合成酵素の基質特異性も非天然型化合物創製をデザインするためには考慮する必要があると考えられた。

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 5 件)

1. Fumitaka Kudo, Koichi Kawamura, Asuka Uchino, Akimasa Miyanaga, Mario Numakura, Ryuichi Takayanagi and Tadashi Eguchi (2015) Genome mining of the hitachimycin biosynthetic gene cluster: involvement of a phenylalanine-2,3-aminomutase in biosynthesis. *ChemBioChem* 16, 909-914、査読あり
DOI: 10.0002/cbic.201500040

2. 工藤史貴、宮永顕正、江口正 (2014) β-アミノ酸含有マクロラクタム抗生物質の生合成、*化学と生物* 52, 830-835、査読なし
<https://katosei.jsbba.or.jp/index.php?aid=303>

3. Akimasa Miyanaga, Jolanta Cieslak, Yuji Shinohara, Fumitaka Kudo and Tadashi Eguchi (2014) The crystal structure of the adenylation enzyme VinN reveals a unique β-amino acid recognition mechanism. *J. Biol. Chem.* 289, 31448-31457、査読あり
DOI: 10.1074/jbc.M114.602326

4. Fumitaka Kudo, Akimasa Miyanaga and Tadashi Eguchi (2014) Biosynthesis of natural products containing β-amino acids. *Nat. Prod. Rep.* 31, 1056-1073、査読あり
DOI: 10.1039/c4np00007b

5. Yuji Shinohara, Akimasa Miyanaga, Fumitaka Kudo and Tadashi Eguchi (2014) The crystal structure of the amidohydrolase VinJ shows a unique hydrophobic tunnel for its interaction with polyketide substrates. *FEBS Lett.* 588, 995-1000、査読あり
DOI: 10.1016/j.febslet.2014.01.060

[学会発表] (計 8 件)

1. 川村紘一、宮永顕正、工藤史貴、江口正、ポリケチド抗生物質ヒタチマイシンの生合成遺伝子の機能解析、日本化学会第 95 春期年会、2015 年 3 月 29 日、日本大学 (船橋)

2. 早川雄基、川村紘一、宮永顕正、工藤史貴、江口正、非天然型基質投与によるヒタチマイシン類縁体生産、日本化学会第 95 春期年会、2015 年 3 月 29 日、日本大学 (船橋)

3. Jolanta Cieslak, Akimasa Miyanaga, Fumitaka Kudo and Tadashi Eguchi、Structural and functional analysis of ATP-dependent ligase VinN involved in vicenistatin biosynthesis.、BIO2014 Congress、2014 年 9 月 10 日、ワルシャワ (ポーランド)

4. 宮永顕正、ポリケチドの分子多様性を生み出す生合成酵素の構造と機能、日本農芸化学会関東支部シンポジウム、2014 年 5 月 24 日、東京大学 (東京)

5. 内野飛翔、沼倉真理緒、宮永顕正、江口正、工藤史貴、マクロラクタム抗生物質ヒタチマイシンのスターター部位構築に関わる酵素の機能解析、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 28 日、明治大学 (川崎)

6. 宮永顕正、篠原雄治、工藤史貴、江口正、ビセニスタチン生合成における ATP 依存型リガーゼ VinN の結晶構造解析、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 28 日、明治大学 (川崎)

7. Akimasa Miyanaga、Unique enzymes in macrolactam antibiotic biosynthesis.、1st US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products for Young Researcher、2014 年 3 月 2 日、東京工業大学 (東京)

8. 宮永顕正、LC-ESI-MS を用いたアシルキャリアータンパク質上で起こる反応の解析、第 13 回日本蛋白質科学会年会、2013 年 6 月 14 日、とりぎん文化会館 (鳥取)

[図書] (計 0 件)

[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.cms.titech.ac.jp/~eguchi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮永 顕正 (AKIMASA MIYANAGA)

東京工業大学・大学院理工学研究科・助教
研究者番号：10623126