

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 25 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18679

研究課題名(和文)ユニークな基質特異性を持つアシル基転移酵素の構造機能解析

研究課題名(英文)Structural and functional analysis of acyltransferase that possesses a unique substrate specificity

研究代表者

宮永 顕正 (Miyanaga, Akimasa)

東京工業大学・理学院・助教

研究者番号：10623126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マクロラクタム抗生物質ビセニスタチン生合成において、アシル基転移酵素VinKはアシル運搬タンパク質間のジペプチド基質の受け渡し反応を触媒する。その際VinKはアシル運搬タンパク質をタンパク質間相互作用により認識していると考えられる。本研究では、独自に開発したクロスリンク法を用いることによりVinKとアシル運搬タンパク質の複合体の結晶構造を決定することに成功した。これにより、アシル基転移酵素によるアシル運搬タンパク質の認識機構が初めて原子レベルで明らかになった。また、部位特異的変異解析を行うことにより、ジペプチド基質の認識機構に関して知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Acyltransferases are key determinants of building block specificity in polyketide biosynthesis. Despite the importance of protein-protein interactions between acyltransferase and acyl carrier protein (ACP) during the acyltransfer reaction, the mechanism of ACP recognition by acyltransferase had not been understood in detail. An acyltransferase VinK transfers a dipeptide group between two ACPs, VinL and VinP1LdACP, in vicenistatin biosynthesis. In this study, we attempted to crystallize the VinK-ACP complexes. Because transient enzyme-ACP complexes are difficult to crystallize, we developed a covalent cross-linking strategy to trap the VinK-ACP complexes, allowing the determination of the crystal structure of the VinK-VinL complex. The VinK-VinL complex structure allows the first visualization of the interaction between acyltransferase and ACP and provides detailed mechanistic insights into ACP recognition by acyltransferase.

研究分野：農学

キーワード：微生物酵素 スリンク 結晶構造解析 ポリケタイド合成酵素 アシル基転移酵素 タンパク質間相互作用 クロ

## 1. 研究開始当初の背景

マクロラクタム化合物はポリケタイ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知られている。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 (3-アミノイソブタン酸) 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を調べた結果、ユニークな開始基質組み込み系を有していることが明らかになった (Shinohara et al., JACS, 2011)。すなわち、単独のアシルキャリアタンパク質 (ACP) である VinL 上にて 3-アミノイソブタン酸ユニットがアラニル化されジペプチド体となった後、アシル基転移酵素 VinK がジペプチル基をポリケタイド合成酵素 (PKS) である VinP1 のローディングモジュールの ACP ドメイン (VinP1LdACP) へと受け渡し、ポリケタイド鎖伸長反応が進行するというものである (図 1)。

この生合成経路の中で、VinK はアシル基供与体として ACP である VinL を利用する。アシル基転移酵素は CoA をアシル基供与体として利用するものがほとんどであり、VinK がアシル基供与体として VinL をどのように認識しているかに興味を持たれた。また、生体内には他の PKS の ACP や脂肪酸合成酵素の ACP が数多く存在している。この中から、VinK は VinP1LdACP だけを認識してジペプチル基を受け渡していると考えられる。このことから、VinK の VinP1LdACP 認識機構にも興味を持たれた。

ジペプチル基末端のアラニル基は最終生成物には含まれず、ポリケタイド鎖伸長反応中の非酵素的な環化反応を防ぐ役割をしていると考えられる。この非酵素的な環化反応を防ぐために、VinK はアラニル化されたジペプチド体を選択的にポリケタイド合成酵素に受け渡す必要があると考えられる。実際に、VinK は 3-アミノイソブタン酸の転移活性は低いのにに対し、3-アミノイソブタン酸のアミノ基がアラニル化されたジペプチド体の転移活性は高いことから末端のアラニル基を認識していると考えられる。このようなジペプチド選択性は既知のアシル基転移酵素には見られない性質であり、ジペプチル基認識機構に興味を持たれた。

これらの点を明らかにすべく、これまでに VinK の結晶構造解析を行い、リガンド非結合型の結晶構造を得ることに成功した。しかし、詳細な ACP 認識機構やジペプチル基認識機構は依然として不明であった。

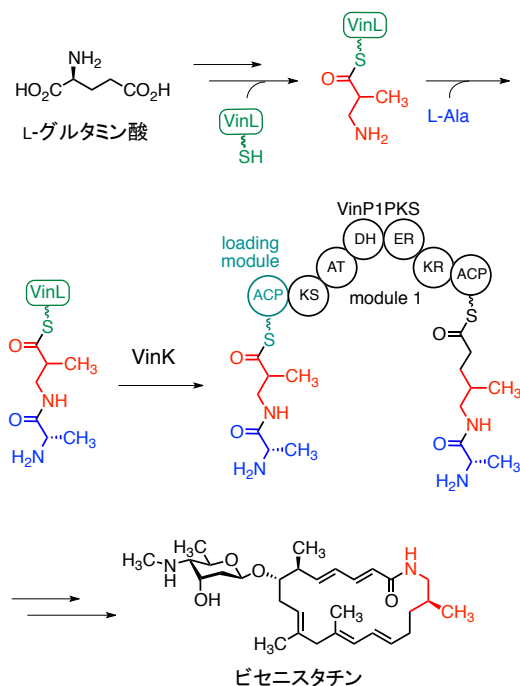


図 1 ビセニスタチン生合成経路

## 2. 研究の目的

本研究課題では、ビセニスタチン生合成に関わるアシル基転移酵素 VinK の構造機能解析を進め、ACP 認識機構とジペプチル基認識機構の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

大腸菌の系を用いて、VinK と VinL と VinP1LdACP の組み換え酵素を発現させた。VinK と VinL、VinK と VinP1LdACP の各複合体の結晶化検討を行い、得られた結晶については、放射光施設にて X 線回折データを収集し、結晶構造を決定した。さらに、得られた結晶構造を元に、ACP 認識やジペプチル基認識に関わると考えられたアミノ酸残基に変異導入を行い、得られた変異体の機能を解析した。

## 4. 研究成果

本研究課題で得られた成果を 3 つの項目に分け、以下に記載する。

## (1) VinK-VinL 複合体の結晶構造解析とそのタンパク質間相互作用の解析

まず、始めに VinK と VinL を混合して、共結晶化を試みた。しかし、共結晶を得ることはできなかった。この原因として、VinK と VinL 間の相互作用があまり強くなく、共結晶化に適した安定な複合体を形成しないためではないかと考えられた。そこで、クロスリンク反応により安定な複合体を得た後、結晶化を検討することにした。

種々条件を検討した結果、VinK の基質結合ポケット内に存在する Ser266 を Cys に置換した S266C 変異体を作製し、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、クロスリンクされた複合体が得られた。この VinK-VinL 複合体の結晶化検討を行い、得られた結晶の X 線回折データを収集し、VinK と VinL の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、VinL の Ser36 に結合しているホスホパンテテイン鎖が VinK の基質結合ポケット内に進入しており、変異を導入した Cys266 と 1,2-ビスマレイミドエタンを介して共有結合を形成していた。また、VinK と VinL の結合面においては、VinK の Arg153 と Arg299 は VinL の Glu47 と Asp35 とそれぞれ塩橋を形成していた (図 2)。また、VinK の Met206 は VinL の疎水性残基である Leu43 などと疎水性相互作用を形成していた。このように、VinK は VinL の helix II の領域を主に認識していると考えられた。VinK と VinL 間の接触面積は比較的小さく、これらの間の一時的な相互作用を反映しているものと考えられた。

次に、VinK のこれら 3 つの残基の変異体 R153A、M206A、R299A をそれぞれ作製し、等温滴定カロリーメトリー測定を行ったところ、これらの変異体は VinL に対する結合親和性が顕著に低下した。また、VinL の D35A、E47A 変異体を作製したところ、VinK の親和性が低下した。これらの結果から、決定した複合体結晶構造が実際の相互作用を反映していることを確認した。これはアシル基転移酵素と ACP の初めての複合体結晶構造であり、他の PKS や脂肪酸合成酵素のアシル基転移酵素と ACP 間の相互作用を予測するモデル構造となり得ると考えられる。

VinK はアシル基供与体として CoA ではなく ACP である VinL を利用する。CoA をアシル基供与体として用いる通常のアシル基転移酵素 FabD と比較を行ったところ、FabD 構造において CoA のリン酸基を認識する Arg190 が VinK では Met206 に置き換わっており、この残基の違いにより、CoA/ACP 選択性の違いが生み出されていると考えられた。

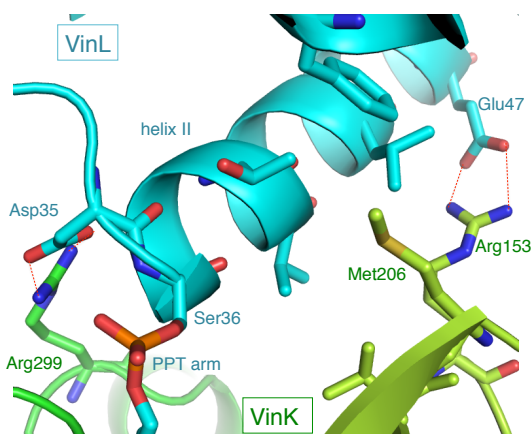


図 2 VinK と VinL の複合体結晶構造

## (2) VinK-VinP1LdACP 複合体の結晶化とそのタンパク質間相互作用の解析

次に、ジペプチジル基を受け渡す相手である VinP1LdACP についても複合体の構造解析を試みた。前項と同様に 1,2-ビスマレイミドエタンを用いたクロスリンク法により、VinK と VinP1LdACP の複合体を調製し、結晶化検討を行った。しかし、結晶を得ることはできなかった。そこで、VinK の R153A、M206A、R299A 変異体を用いて、相互作用の解析を行った。その結果、M206A と R299A は VinP1LdACP との親和性が低下し、これらの残基が VinP1LdACP との相互作用に関わっている可能性が示唆された。一方で、R153A は VinP1LdACP との親和性は変化しなかったことから、Arg153 は VinP1LdACP との相互作用には関わっていないと考えられた。これに加え、VinP1LdACP とのドッキング解析を行い、VinP1LdACP の認識機構に関して知見を得た。

## (3) VinK のジペプチジル基認識機構の解析

VinK のジペプチジル基認識機構を明らかにすべく、VinK とジペプチド体アナログの複合体の結晶構造解析を試みた。しかし、共結晶を得ることはできなかった。そこで、ドッキング解析結果に基づき、ジペプチド末端のアラニル基と相互作用すると考えられたアミノ酸残基の変異体を作製し、ジペプチジル基転移活性を測定した。その結果、Glu109 と Ser266 の変異体では転移活性が低下したことから、これらの残基がアラニル基の認識に関わっていると考えられた。

## 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 4 件)

1. Akimasa Miyanaga, Shohei Iwasawa, Yuji Shinohara, Fumitaka Kudo and Tadashi Eguchi (2016) Structure-based analysis of the molecular interactions between acyltransferase and acyl carrier protein in vicenistatin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113, 1802-1807

査読あり

DOI: 10.1073/pnas.1520042113

2. Akimasa Miyanaga, Yuki Hayakawa, Mario Numakura, Junko Hashimoto, Kuniko Teruya, Takashi Hirano, Kazuo Shin-ya, Fumitaka Kudo and Tadashi Eguchi (2016) Identification of the fluvirucin B2 (Sch 38518) biosynthetic gene cluster from *Actinomadura fulva* subsp. *indica* ATCC 53714: Substrate specificity of  $\beta$ -amino acid selective adenylyating enzyme FlvN. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80, 935-941

査読あり

DOI: 10.1080/09168451.2015.1132155

3. Akimasa Miyanaga, Fumitaka Kudo and Tadashi Eguchi (2016) Mechanisms of  $\beta$ -amino acid incorporation in polyketide macrolactam biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 35, 58-65  
査読あり

DOI: 10.1016/j.cbpa.2016.08.030

4. 宮永顕正、工藤史貴、江口正 (2016) 天然物生合成酵素によるキャリアータンパク質の認識機構、バイオサイエンスとインダストリー 74, 382-387  
査読なし

[http://www.jba.or.jp/pc/archive/2016/vol74\\_no5.html](http://www.jba.or.jp/pc/archive/2016/vol74_no5.html)

[学会発表] (計 7件)

1. 宮永顕正、篠原雄治、岩沢翔平、Jolanta Cieślak、工藤史貴、江口正: マクロラクタム抗生物質ビセニスタチン生合成酵素の構造機能解析に基づく $\beta$ -アミノ酸スターター部位構築機構の解明、第 57 回天然有機化合物討論会、2015 年 9 月 11 日、神奈川県民ホール (横浜)

2. 岩沢翔平、宮永顕正、篠原雄治、工藤史貴、江口正: マクロラクタム抗生物質ビセニスタチン生合成に関わるアシル基転移酵素 VinK の基質認識機構解析、第 5 回 CSJ 化学フェスタ 2015、2015 年 10 月 15 日、タワーホール船堀 (東京)

3. 宮永顕正、工藤史貴、江口正: ポリケタイド生合成酵素の構造機能解析、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 30 日、札幌コンベンションセンター (札幌) (招待講演)

4. 宮永顕正、工藤史貴、江口正: 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、第 60 回日本薬学会関東支部大会シンポジウム、2016 年 9 月 17 日、東京大学 (東京) (招待講演)

5. Akimasa Miyanaga: Unique enzymes in macrolactam antibiotic biosynthesis, 2nd US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products for Young Researcher, 2017 年 3 月 5 日、東京工業大学 (東京)

6. 宮永顕正: ポリケタイド化合物の分子多様性を生み出す生合成酵素の構造機能研究、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 18 日、京都女子大 (京都) (農芸化学奨励賞受

賞講演)

7. Akimasa Miyanaga, Fumitaka Kudo and Tadashi Eguchi: Structural analysis of vicienistatin biosynthetic enzymes for elucidating the  $\beta$ -amino acid incorporation mechanism, Directing Biosynthesis V, 2017 年 3 月 23 日、コベントリー (イギリス)

[その他]

ホームページ等

<http://www.chemistry.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・理学院・助教

研究者番号: 10623126