

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K14898

研究課題名(和文)炭素間三重結合導入酵素の探索と反応機構解明

研究課題名(英文) Search for enzymes that introduce a triple bond between two carbon atoms and elucidation of their reaction mechanisms

研究代表者

田中 俊之 (TANAKA, Toshiyuki)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：10217052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：主に植物と微生物を対象として、炭素間三重結合を形成する酵素(アセチレナーゼ)と推測されるタンパク質のクローニング及び発現系や精製法の検討を試みた。その結果、18種類のタンパク質のクローニングに成功し、そのうち9種類については、純度の高いタンパク質を得ることが出来た。これら精製タンパク質を用いて結晶化を行ったが、構造解析に適した結晶はまだ得られていない。今後も、結晶化などの検討を続け、立体構造の解析や反応機構の解明を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炭素間三重結合を有する天然有機化合物は反応性が高く、強力な抗菌活性を示すものも多い。しかし、この炭素間三重結合を形成する酵素(アセチレナーゼ)は数種類しか同定されておらず、反応機構についても全くわかっていない。今回の研究で、18種類のアセチレナーゼと推測されるあるいは関連するタンパク質のクローニングに成功した。継続して研究を続け、反応機構が原子レベルで解明出来れば、酵素の工業的利用、酵素の改変や微生物利用により、新しい抗菌剤などの生産が可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We tried to clone the genes of proteins that is likely to be involved in forming a carbon-carbon triple bond from mainly plants and microorganisms, and to establish their expression systems and purification methods. As a result, 18 kinds of proteins were successfully cloned, and for 9 of them we were able to obtain highly pure proteins. Crystallization was performed using these purified proteins, but crystals suitable for structural analysis have not yet been obtained. To analyze their three-dimensional structures and elucidate their reaction mechanisms, we will continue experiments such as crystallization.

研究分野：構造生物学、生物有機化学

キーワード：アセチレナーゼ様酵素 クローニング タンパク質発現

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

放線菌由来のクロモプロテイン系抗生物質は、ラジカルを発生し DNA 切断活性を示す非常に不安定なクロモフォア(9員環エンジン骨格を有する)と、これを特異的に結合して安定化するアポタンパク(アミノ酸約110残基)から構成される複合体であり、強力な抗菌・抗腫瘍活性を示す。私達は、構造生物学的手法により、代表的なクロモプロテインであるネオカルチノスタチン(NCS)と C-1027 の詳細な三次元構造を世界で初めて決定し(Tanaka *et al.*, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1205 (1993); *J. Mol. Biol.*, **309**, 267 (2001))、活性本体のエンジン骨格がどのように守られ安定化されているかを明らかにした。一方、このエンジン骨格がどのように合成されるか(炭素間三重結合が形成されるか)については、解明されていなかった。9員環エンジン型クロモフォアや、アポタンパクの助けを借りずに安定に存在する10員環エンジン型クロモフォアの生合成に関与すると考えられる一連の酵素の遺伝子クラスターが見出されているだけであった(*Science*, **297**, 1170 (2002); *Science*, **297**, 1173 (2002))。また、炭素間三重結合を形成する酵素は、脂肪酸に三重結合を導入する酵素が植物などで一部同定されているものの、その反応機構は明らかになっていなかった。

### 2. 研究の目的

炭素間三重結合を有する天然有機化合物は反応性が高く、強力な抗菌活性を示すものも多い。しかし、この炭素間三重結合を形成する酵素(アセチレナーゼ)は数種類しか同定されておらず、反応機構についても全くわかっていない。そこで、微生物や植物から新規アセチレナーゼを単離・同定し、構造生物学・生化学的解析を行って、反応機構を原子レベルで解明することを、本研究の目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 植物の育成

一年草の一部植物については、種子から育てた。適当な時期に、専用培養土を入れた36穴タネまきトレーに各穴3~4粒ずつ播種し、発芽して本葉が2~3枚になった頃に栄養分の高い土を入れた鉢に植え替えた。

#### (2) 植物体からのクローニング

一年草の場合は頂芽に近い葉、多年草あるいは樹木の場合には若葉を採取した。採取後なるべく時間を置かず、Milli-Q水で洗浄した後、適当な大きさに裁断し、乳鉢と乳棒を用いて液体窒素中で粉末状にした。これを材料として、DNeasy Plant Mini Kit 外を用いてゲノム DNA を抽出した。このゲノム DNA を用い、既に知られている数種のアセチレナーゼの DNA 配列に基づき設計したプライマーを用いて PCR を行った。得られた PCR 産物から、TA クローニング等により目的物と考えられるタンパク質をクローニングした。

#### (3) 微生物からのクローニング

培養した NCS 産生放線菌 *Streptomyces carzinostaticus* から、ISOPLANT を用いてゲノム DNA を抽出した。このゲノム DNA を用い、各酵素の DNA 配列に基づき設計したプライマーを用いて PCR を行った。得られた PCR 産物から、TA クローニング等により目的とするタンパク質をクローニングした。

#### (4) 発現系の構築

クローニングした遺伝子を、タンパク質の発現に用いるベクター数種(pET など)に入れ替え、それぞれ適当な大腸菌数種に導入した後、該当するインダクション法により、タンパク質を誘導発現させた。また、結晶化に必要なタンパク量を発現する条件等を検討した。

#### (5) 精製法の確立と結晶化

発現タンパク質の性質(タグや分子量、等電点や疎水性など)に応じ、純度の高いタンパク質を精製する方法を検討した。また、得られたタンパク質を用い、ハンギングドロップ法外で、結晶化の条件検討を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 環状エンジン骨格アセチレナーゼ

放線菌由来の抗腫瘍性抗生物質ネオカルチノスタチン(NCS)の活性本体であるクロモフォアの9員環エンジン骨格には炭素間三重結合が2つあり、その生合成には、12種類の酵素が関与すると考えられている。これらの酵素の性質と構造を解析するために、まず、NCS 産生放線菌 *Streptomyces carzinostaticus* のゲノム DNA から、目的とするタンパク質全てをクローニングした。次に、大腸菌などを用いた発現系の構築を検討した結果、可溶化しない、あるいは大腸菌の増殖を阻害するといった性質をもつ5種類を除き、一定量のタンパク質を発現させることに成功した。純度の高いタンパク質を得ることが出来たこれら7種類に関して、結晶化の検討を行ったが、構造解析に適した結晶を得ることが出来なかった。

#### (2) クレベニン酸合成アセチレナーゼ

潤滑剤や樹脂、金属顔料や粘着シートなどに幅広く利用されるクレベニン酸は、炭素間三重結合を有する不飽和脂肪酸である。このクレベニン酸の合成に関わる植物由来のアセチレナーゼの遺伝子は既にクローニングされ、酵母を用いた発現系で、その活性が保持されていることも確認されているが、その反応機構については明らかとなっていない。そこで、クレベニン酸を産生

する植物のゲノム DNA から、アセチレナーゼと推測されるタンパク質 2 種類をクローニングした。次に、大腸菌などを用いた発現系の構築を検討し、一定量のタンパク質を発現させることに成功した。純度の高いタンパク質を得ることが出来たこれらの酵素に関して、構造解析に適した結晶を得るための予備検討を行った。

( 3 ) 新奇アセチレナーゼの探索

関東地方に生育する複数種の植物体から抽出したゲノム DNA を用い、アセチレナーゼと推測されるタンパク質を 4 種類クローニングした。うち 1 種類について、大腸菌などを用いた発現系の構築を検討した結果、一定量のタンパク質を発現させることに成功した。

( 4 ) 今後について

現時点においても、アセチレナーゼの反応機構については何も報告されていない。今後も、引き続き、結晶化などの検討を続け、立体構造の解析や反応機構の解明を目指す予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----