

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07747

研究課題名(和文) アシル基転移酵素によるキャリアータンパク質認識機構の解明

研究課題名(英文) Recognition mechanism of carrier protein by acyltransferase

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ポリケタイド化合物の生合成において、アシル基転移酵素(AT)はアシル基をキャリアータンパク質(CP)へと受け渡す反応を触媒する。本研究では、ATがアシル基を受け渡す相手であるCPをどのように認識しているかを明らかにするため、ATとCPとの複合体の結晶構造解析を行った。パンテテインアミド型プローブを用いたクロスリンク反応を利用することにより、ジソラゾール合成酵素におけるトランス型ATとCPの複合体などの結晶構造を決定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポリケタイド化合物の生合成において、アシル基転移酵素はポリケタイド骨格の構成単位となるアシル基の種類を決定づける重要な酵素である。本研究では、ポリケタイド合成酵素におけるアシル基転移酵素とキャリアータンパク質の間のタンパク質間相互作用の詳細を明らかにすることに成功した。得られた構造情報を利用することにより、非天然型ポリケタイド化合物の微生物生産を目的とした合理的なポリケタイド合成酵素の改変が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Acyltransferases (ATs) are key determinants of building block specificity in polyketide biosynthesis. Despite the importance of protein-protein interactions between AT and carrier protein (CP) during the acyltransfer reaction, the mechanism of CP recognition by AT had been poorly understood. In this study, we chemically synthesized pantetheineamide-type cross-linking probe to capture transient AT-CP complex in its functional state, and successfully determined the crystal structure of AT-CP complex of disorazole polyketide synthase (PKS). The crystal structure of the disorazole AT-CP complex provides the first detailed insights into the protein-protein interactions between a trans-acting AT and CP in trans-AT PKS assembly lines. We also showed that the pantetheineamide-type cross-linking probe is useful for structural characterization of adenylation domain-CP complexes.

研究分野：応用生物化学

キーワード：結晶構造解析 ポリケタイド 微生物酵素 タンパク質間相互作用 クロスリンク

1. 研究開始当初の背景

微生物が生産するポリケチド化合物は多様な化学構造と生物活性を有しており、医薬品や抗生物質として利用されている。ポリケチド合成酵素 (PKS) の反応では、まず、アシル基転移酵素 (AT) がポリケチド化合物の構成単位となるアシル基質 (開始基質や伸長基質) を認識し、アシル基を対応するキャリアタンパク質 (CP) のホスホパンテテイン鎖上へと受け渡す (図 1)。その後、アシル基は CP に結合した状態で PKS の各機能ドメインや各酵素のもとに運ばれ、縮合反応や種々の修飾反応を受け、炭素鎖が伸長していく。アシル基質として様々な開始基質や伸長基質が利用されることにより、生成するポリケチド化合物の炭素骨格に構造多様性が生まれる。

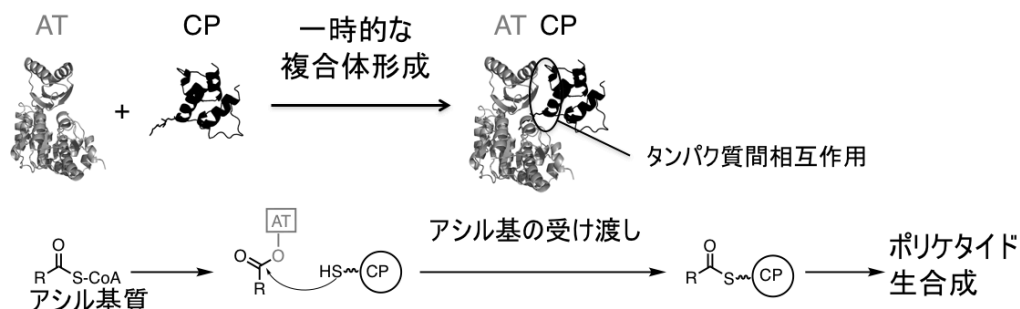


図 1: AT によるアシル基転移反応

AT は特定の CP をタンパク質間相互作用により認識しており (図 1)、本来の相手である CP には効率よくアシル基を受け渡すのに対し、その他の CP に対してはアシル基転移活性が低いことが報告されている。AT が CP をどのように認識しているかに興味を持たれるが、これまでに AT と CP の複合体の結晶構造の報告例はなく、CP の詳細な認識機構は不明であった。最近、我々は 1,2-ビスマレイミドエタンを用いて AT と CP をクロスリンクする手法を開発し、ピセニスタチンの生合成において開始基質の受け渡しを触媒する単独型 AT である VinK と単独型 CP (VinL) との複合体結晶構造を決定することに成功した (Miyana *et al.*, *PNAS*, 2016)。

I 型 PKS は複数の触媒ドメインからなる巨大タンパク質であり、PKS の大部分がこの I 型 PKS に分類される。I 型 PKS の炭素鎖伸長反応における必要な触媒ドメインのセットはモジュールと定義されている。I 型 PKS は以下の二つに大別することができる。

- (i) AT や CP など全ての機能ドメインが同一モジュール内に含まれている *cis*-AT 型 PKS
 - (ii) AT がモジュール内に含まれず単独で存在する *trans*-AT 型 PKS
- である。

これらの I 型 PKS の AT が VinK と共通の CP 認識機構を有しているのか、それとも別の CP 認識機構を有するのかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、PKS の様々な AT を対象に CP との複合体の結晶構造解析を行い、それぞれの CP 認識機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

ジソラゾールの生合成に関わる *trans*-AT や CP など各種タンパク質を大腸菌の系を用いて組換えタンパク質として発現させた。なお、AT については Cys 変異を導入した変異体も調製した。次に、パンテテインアミド型プローブを用いて CP を修飾した後に、クロスリンク反応を行った。得られたクロスリンク複合体を精製し、結晶化を検討した。結晶が得られた場合は、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、結晶構造を元に、CP 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) ジソラゾール生合成に関わる *trans*-AT と CP との複合体の構造解析

代表的な *trans*-AT 型 PKS として、ジソラゾール合成酵素 (DSZS) を挙げることができる。DSZS PKS は、7 つの PKS モジュールから構成されているが、AT ドメインは各モジュール内に

含まれず、*trans*-AT である DisD として存在している (図 2)。DisD AT は、DSZS PKS のモジュール 1 からモジュール 7 に存在する 7 つの CP ドメインにそれぞれマロニル基を受け渡す反応を触媒する。DisD AT はこれら CP ドメインをタンパク質間相互作用によって認識していると考えられ、その認識機構に興味を持たれた。7 つの CP ドメインをそれぞれ組換えタンパク質として発現させたところ、モジュール 1 の CP ドメイン (CP1) の発現量が高かったことから、これを DisD AT との複合体構造解析に用いることとした。

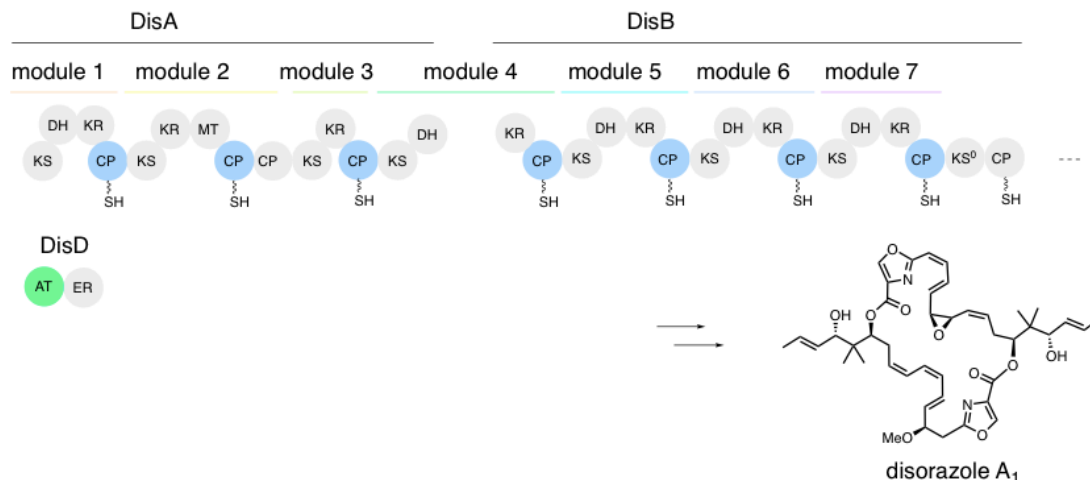


図 2: ジソラゾール生合成に関わる DSZS PKS

AT と CP とのタンパク質間相互作用は一時的で弱く、混合しただけでは安定な複合体を形成しないため、そのままでは AT と CP の複合体の結晶構造解析が困難である。そこで、クロスリンク反応により AT と CP との複合体の状態をトラップした後、結晶構造解析を行う方法を検討した。まず、VinK-VinL 複合体の結晶構造解析の時と同様に、1,2-ビスマレイミドエタンを用いたクロスリンク反応を検討した。しかし、DisD AT と CP1 の場合は、非特異的な反応が進行し、目的のクロスリンク複合体を得ることができなかった。そこで、別のアプローチとして、反応性官能基を先端に有するパンテテインアミド型プローブを用いたクロスリンク反応を検討した (図 3)。数種類のパンテテインアミド型プローブを有機合成し、CoA 合成酵素群を用いた酵素反応によりプローブを CP1 上に担持させることによって、修飾 CP1 をそれぞれ調製した。DisD AT の触媒残基 Ser86 を Cys に変異させ、修飾 CP1 との間でクロスリンク反応を検討したところ、プロモアセトアミド基を有するプローブで修飾した CP1 を用いた際に、特異的にクロスリンク反応が進行した。得られた DisD AT-CP1 のクロスリンク複合体を精製し、結晶化を検討したところ、結晶が得られ、分解能 2.03 Å で結晶構造を決定することができた (Miyana *et al.*, *JACS*, 2018)。

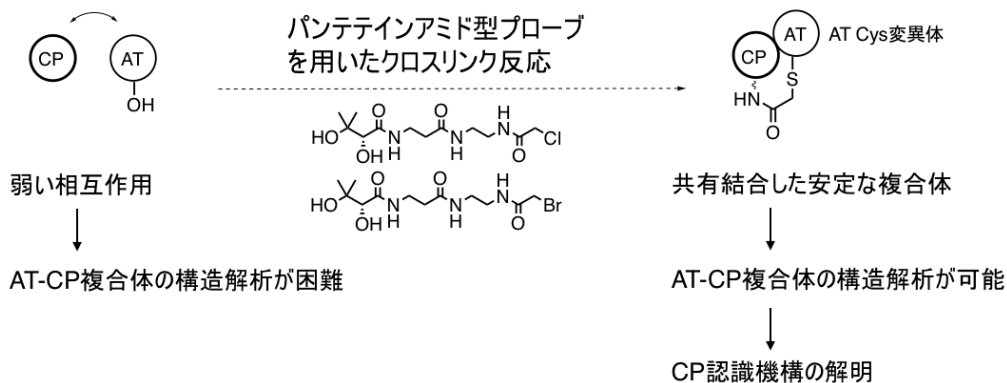


図 3: パンテテインアミド型プローブを用いた AT-CP 複合体の結晶構造解析

DisD AT-CP1 複合体の構造においては、DisD AT は CP1 のループ 1 領域やヘリックス III'領域と相互作用していた (図 4)。ループ 1 領域においては、CP1 の Asp45 が DisD AT の Lys180 と塩橋を形成しており、CP1 の Phe40 が DisD AT の Ile127 と疎水性相互作用を形成していた。ヘリックス III'領域においては、CP1 の Phe69 が DisD AT の Gly272 や Ala275 や Gln276 と疎水性相互作用を形成していた。また、CP1 の Glu70 は DisD AT の Arg279 と塩橋を形成していた。これらの CP1 のアミノ酸残基 (Asp45、Phe69、Glu70) は、DSZS PKS の他の CP ドメインにおいても保存されていたことから、DisD AT は DSZS PKS の 7 つ CP ドメインを共通の機構で認識していることが示唆された。CP1 の Asp45、Phe69、Glu70 をそれぞれ変異させたところ、DisD AT とのクロスリンク反応の効率が有意に低下したことから、これらの残基の重要性が示唆された。

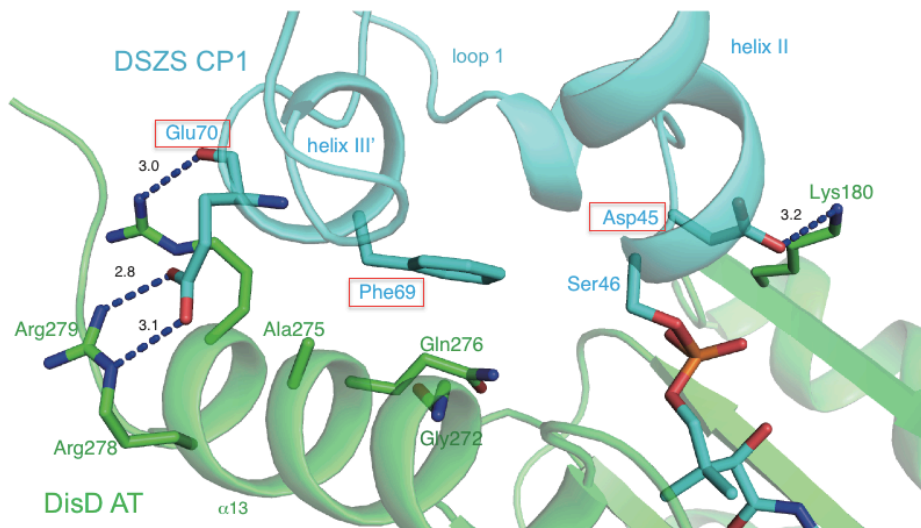


図 4: DisD AT-CP1 複合体の結晶構造

今回決定した DisD AT-CP1 の複合体構造を以前に決定した VinK-VinL 複合体構造と比較したところ、CP の結合様式が異なっていることが明らかになった。VinK-VinL 複合体構造においては、VinK は VinL のヘリックス II 領域を主に認識していたのに対し、DisD AT-CP1 の複合体構造では CP1 のヘリックス II 領域はほとんど相互作用に関わっていなかった。このことから、AT と CP との間の相互作用には多様性があり、AT と CP の種類によって様々な結合様式が存在することが示唆された。

(2) ビセニスタチン生成に関わる VinK と VinP1LdCP との複合体の構造解析

ビセニスタチン生成において、単独型 AT である VinK は、ジペプチジル基を単独型 CP である VinL から受け取り、VinP1 PKS のローディングモジュールの CP ドメイン (LdCP) へと受け渡す反応を触媒する。VinK はアシル基供与体として VinL を、アシル基受容体として LdCP を認識していると考えられ、それぞれの CP 認識機構に興味もたれる。以前に 1,2-ビスマレイミドエタンを用いたクロスリンク反応によって、VinK-VinL の複合体構造解析に成功した (Miyanaga *et al.*, *PNAS*, 2016)。一方で、VinK-LdCP の複合体構造は未決定であり、VinK が LdCP をどのように認識してジペプチジル基を受け渡しているかは分かっていなかった。

そこで、パンテテインアミド型プローブを用いたクロスリンク反応によって VinK-LdCP の複合体の結晶構造解析を試みた。VinK の触媒残基 Ser106 を Cys に変異させ、修飾 LdCP との間でクロスリンク反応を検討したところ、特異的にクロスリンク反応が進行した。得られた VinK-LdCP のクロスリンク複合体を精製し、結晶化を検討したところ、結晶が得られ、分解能 3.0 Å で結晶構造を決定することができた。さらに、変異体解析により、相互作用に重要なアミノ酸残基を明らかにすることができた。

(3) ヒタチマイシン生成に関わるアデニル化酵素 HitB と CP との複合体の構造解析

次に、(1) において合成したパンテテインアミド型プローブが AT 以外の酵素にも適用可能かどうかを調べた。そのターゲットとして、ヒタチマイシン生成に関わる単独型アデニル化酵素 HitB と単独型 CP である HitD を選定した。HitB は基質である β-フェニルアラニン を HitD へと受け渡す反応を触媒するが、その際、基質を受け渡す相手として HitD をタンパク質間相互作用によって認識していると考えられる。HitB の HitD 認識機構を解明すべく、パンテテインアミド型プローブを用いたクロスリンク反応を検討した。HitB の Asp221 を Cys に変異させた変異体を調製し、プロモアセトアミド基を有するプローブで修飾した HitD と混合したところ、期待通りに特異的なクロスリンク反応が進行した。得られたクロスリンク複合体を精製し、結晶化を検討したところ、結晶を得ることができ、その結晶構造を分解能 2.0 Å で決定することができた (Miyanaga *et al.*, *ACS Chem. Biol.*, 2020)。決定した HitB-HitD 複合体の構造において結合界面に存在していたいくつかの HitD 残基を変異させたところ、それぞれ基質の受け渡し効率が低下したことから、決定した複合体構造は実際の受け渡しの際の相互作用を反映していることが示唆された。以上の結果から、パンテテイン型プローブを用いたクロスリンク反応の手法はアデニル化酵素と CP の複合体構造解析においても有用であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyanaga Akimasa, Kurihara Shohei, Chisuga Taichi, Kudo Fumitaka, Eguchi Tadashi	4. 巻 15
2. 論文標題 Structural Characterization of Complex of Adenylation Domain and Carrier Protein by Using Pantetheine Cross-Linking Probe	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1808 ~ 1812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.0c00403	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishikawa Fumihiro, Miyanaga Akimasa, Kitayama Hinano, Nakamura Shinya, Nakanishi Isao, Kudo Fumitaka, Eguchi Tadashi, Tanabe Genzoh	4. 巻 58
2. 論文標題 An Engineered Aryl Acid Adenylation Domain with an Enlarged Substrate Binding Pocket	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 6906 ~ 6910
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201900318	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyanaga Akimasa, Ouchi Risako, Ishikawa Fumihiro, Goto Ena, Tanabe Genzoh, Kudo Fumitaka, Eguchi Tadashi	4. 巻 140
2. 論文標題 Structural Basis of Protein-Protein Interactions between a trans-Acting Acyltransferase and Acyl Carrier Protein in Polyketide Disorazole Biosynthesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 7970 ~ 7978
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.8b04162	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyanaga Akimasa, Kudo Fumitaka, Eguchi Tadashi	4. 巻 35
2. 論文標題 Protein-protein interactions in polyketide synthase-nonribosomal peptide synthetase hybrid assembly lines	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Natural Product Reports	6. 最初と最後の頁 1185 ~ 1209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8np00022k	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyanaga Akimasa	4. 巻 81
2. 論文標題 Structure and function of polyketide biosynthetic enzymes: various strategies for production of structurally diverse polyketides	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2227 ~ 2236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2017.1391687	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計11件(うち招待講演 4件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 千菅太一、宮永顕正、栗原将平、安達成彦、川崎政人、守屋俊夫、千田俊哉、工藤史貴、江口正
2. 発表標題 マクロラクタム抗生物質ヒタチマイシン生合成におけるアデニル化酵素とキャリアタンパク質間相互認識機構
3. 学会等名 2020年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川田浩一、千菅太一、宮永顕正、工藤史貴、江口正
2. 発表標題 ピセニスタチン生合成におけるアシル基転移酵素Vinkとアシルキャリアタンパク質間の相互作用解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗原将平、宮永顕正、工藤史貴、江口正
2. 発表標題 マクロラクタム抗生物質ヒタチマイシン生合成におけるアデニル化酵素とアシルキャリアプロテインの相互作用の解析
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮永顕正
2. 発表標題 ポリケタイド生成におけるアシルキャリアータンパク質認識機構の解析
3. 学会等名 第19回酵素応用シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮永顕正
2. 発表標題 Structural basis of protein-protein interactions between acyltransferase and acyl carrier protein in trans-AT polyketide synthases
3. 学会等名 2nd China-Japan Joint Symposium on Natural Product Biosynthesis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤絵菜、大内理紗子、宮永顕正、工藤史貴、江口正
2. 発表標題 ジソラゾール生成におけるアシル基転移酵素とアシルキャリアプロテイン間の相互作用解析
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤絵菜、大内理紗子、宮永顕正、工藤史貴、江口正
2. 発表標題 Cross-linking reaction to investigate protein-protein interaction in polyketide synthases
3. 学会等名 The 3rd A3 Foresight Symposium on "Chemical & Synthetic Biology of Natural Products" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大内理紗子、石川文洋、後藤絵菜、木村真希、宮永顕正、田邊元三、工藤史貴、江口正
2. 発表標題 ポリケチド生合成におけるアシル基転移酵素とアシルキャリアタンパク質のクロスリンク反応の検討
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮永顕正
2. 発表標題 放線菌が生産するポリケチド化合物のユニークな生合成マシナリー
3. 学会等名 第4回天然物化学研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮永顕正
2. 発表標題 ポリケチ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
3. 学会等名 日本農芸化学会 関東支部2017年度第1回支部例会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮永顕正
2. 発表標題 Structural analysis of macrolactam biosynthetic enzymes
3. 学会等名 The 2nd A3 Foresight Symposium on "Chemical & Synthetic Biology of Natural Products" (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------