

令和 4 年 5 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15746

研究課題名（和文）ポリケチド合成酵素の基質受け渡し機構の解明を目指した高分解能構造解析

研究課題名（英文）Structural study of substrate recognition mechanism of polyketide synthase

研究代表者

永田 隆平（Nagata, Ryuhei）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特別研究員

研究者番号：10836703

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：I型ポリケチド合成酵素のドメインの一つであるチオエステル加水分解酵素ElbBの基質認識機構を結晶構造に基づいて明らかにした。ElbBは他のチオエステル加水分解酵素とよく似た立体構造をもつが、基質結合ポケットにおいて他の酵素のような開口部を持たない完全に閉じた構造をしていることが分かった。一方、ElbB変異体ではポケットが開いた結晶構造が得られた。そのため、基質結合時にはElbBの構造が動いてポケットの開閉が起こると考えられる。また、反応中間体とのドッキングシミュレーションを行うことで基質認識に重要なアミノ酸残基を推定し、これらの残基の重要性を変異型ElbBの活性測定によって確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

I型ポリケチド合成酵素の複数ドメイン間での基質の受け渡し機構については未解明な部分が多い。本研究では、タンパク質の細胞内輸送阻害剤として有名なbrefeldin Aの生合成に関わるチオエステル加水分解酵素ドメインについて、基質結合に伴ってポケットが開閉することを提唱した。また、コンピューターシミュレーションを用いてこの酵素の特異的な基質認識機構を明らかにした。これらの成果は、チオエステル加水分解酵素ドメインにおける基質の受け入れ機構の解明や、酵素改変によるbrefeldin A類縁体の創出につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：We revealed the substrate-binding mechanism of a thioesterase ElbB, which is one of the domains of type I polyketide synthases, based on its crystal structures. Although the overall structure of ElbB is similar to those of other thioesterases, ElbB has no entrance at the substrate-binding pocket observed in other thioesterases. In contrast, the ElbB mutant exhibited an open form in the crystal structure. These observations let us to propose that ElbB will move to open the substrate-binding pocket and accept the substrate. In addition, docking simulation between the reaction intermediate and the ElbB structure estimated residues important for substrate binding, and we confirmed the importance of the residues by mutational analysis.

研究分野：構造生物学

キーワード：X線結晶構造解析 ポリケチド合成酵素

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) I型ポリケタイド合成酵素 (I型PKS) は、酢酸などの開始基質にマロン酸などの伸長基質を次々に重合して、複雑なポリケタイド骨格をつくる。この骨格を修飾してできるポリケタイド化合物は、多様な生理活性をもつものが知られ、上市されている医薬品の3分の1を占めると言われる。また、この酵素を改変して有用物質をつくる研究も盛んである。I型PKSは、異なる役割をもった複数のドメインから構成され、ドメイン間で基質を受け渡して重合反応を行う。1回の重合反応を行うドメインの集まりをモジュールと呼び、モジュールが複数あるものをモジュール型、1つのものを反復型と呼ぶ。モジュール型PKSは各モジュールで1回の重合反応を行い、隣のモジュールに基質を受け渡して生成物をつくっていく。一方、反復型PKSは1つのモジュールを繰り返し使って生成物をつくる。いずれのタイプも、二量体化したモジュール内でドメインを動かして基質を受け渡すと考えられる。基質受け渡しは、モジュールのC末側に存在するアシル基運搬タンパク質 (ACP) ドメインが移動して行う。申請者は、ACPドメインの動きは基質結合や他のドメインの反応と“歯車”のように連動していると予想している。これまで、モジュール型PKSで反応の段階に応じてACPドメインが移動することや、反復型PKSでACPドメインの結合に伴って他のドメインが動くことが観測されている。しかし、これらの構造は、クライオ電子顕微鏡による低分解能 (~7 Å) な構造のため、基質結合やドメイン間相互作用の詳細を観測できず、ACPドメインを動かす分子機構は明らかになっていない。

(2) 反復型PKSによって合成される brefeldin A はタンパク質の細胞内輸送阻害剤として知られていたが、最近になって共同研究者らによりこの生合成遺伝子が初めて明らかになった。この生合成経路では、反復型PKSである ElbA がポリケタイド鎖を合成し、次にシトクロム P450 である ElbF がポリケタイド鎖を修飾して五員環と水酸基を形成する。そこに、チオエステル加水分解酵素である ElbB が作用することで環化と切り離しが起こり、最後にシトクロム P450 である ElbD によって水酸基が付加されて brefeldin A が生合成される。ここで、ElbF による修飾が起きなければ、ElbB はポリケタイド鎖を正しく認識できず、環化反応は起こらない。そのため、ElbB は修飾によって形成される五員環と水酸基を特異的に認識していると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、I型PKSの基質受け渡し機構の解明を目的に、I型PKSの全長での結晶構造解析に取り組むことにした。

(2) また、ElbBの特異的な基質認識機構を明らかにすることを目指して、ElbBの結晶構造解析に取り組むこととした。

3. 研究の方法

(1) 典型的なモジュール型PKSであるDEBS1と炭素数34の大型ポリケタイド化合物をつくる新規の反復型PKSであるkPKS [1] を研究対象とし、それぞれの酵素の全長遺伝子を大腸菌で異種発現させた。可溶性タンパク質として得られた場合に、X線結晶構造解析による構造解析を行うために、精製と結晶化を進めることにした。

(2) 大腸菌で異種発現させたElbBの結晶を作製し、X線結晶構造解析法によってその結晶構造を決定した。基質の認識に重要なアミノ酸残基を特定するために、反応中間体とElbBとのドッキングシミュレーションや変異型酵素の活性測定を行った。

4. 研究成果

(1) DEBS1については共同研究者から供与されたプラスミドを用いて、大腸菌での異種発現を行った。その結果、大腸菌破碎後の可溶性画分にDEBS1と思われるタンパク質がSDS-PAGEによって確認できた。しかし、Niカラムによるアフィニティー精製を行ったが、DEBS1はカラムに吸着せず、正しくフォールディングしていないことが示唆された。一方のkPKSは、共同研究者から供与されたcDNAから、大腸菌異種発現用のプラスミドを構築した。しかし、大腸菌での様々な培養条件や発現誘導条件を試みても目的タンパク質の発現は確認できなかった。また、kPKSに似た反復型PKSについても同様に大腸菌異種発現系を構築したが、こちらについても大腸菌での発現は確認できなかった。以上のことから、本研究で対象とした全長のI型PKSについては、適切にはたらく発現系が構築できず、構造解析へ着手するに至らなかった。

(2) ElbBの大腸菌での異種発現系は共同研究者によって確立されていたため、発現させたElbBをNiカラムとゲルろ過カラムによって精製し、結晶化スクリーニングに供した。その結果、Bis-TrisとPolyethylene glycol monomethyl etherを含む結晶化条件で結晶が得られた。得られた結晶を用いてPhoton FactoryにてX線回折実験を行い、分解能1.52 Åのフルデータを取得することに成功した。ElbBは、研究開始当初に構造が報告されていた他のチオエステル加水分解酵素とはアミノ酸配列相同性が低く、それらの構造を用いた分子置換法による構造決定は困難であった。そこで、タンパク質中の硫黄原子の異常散乱効果を利用したNative-SAD法や、重原子誘導体結晶を用いたSAD法による位相決定に取り組んだ。しかし、使用した結晶が双晶であったため、これ

らの方法では位相決定に至らなかった。2021年1月に E1bB と 53.9%のアミノ酸配列相同性を示すチオエステル加水分解酵素 DcsB の結晶構造が報告された [2]。そこで、この構造を用いた分子置換を行ったところ、E1bB の結晶構造を決定することができた。

E1bB は DcsB と同様に結晶中で二量体を形成しており、このことはゲルろ過クロマトグラフィーによる溶液中での分子量の測定結果と合致する。E1bB の全体構造は DcsB とよく似ていたが (RMSD 1.5 Å)、E1bB の G188-F204 の α ヘリックスの構造が DcsB の構造とは大きく異なっていた (図 1)。またこの α ヘリックスは、E1bB の他の領域と比べて温度因子が高いことから、基質結合などに伴って構造変化する可能性が示唆された。DEBS-TE [3] などのよく研究されているチオエステル加水分解酵素は、2つの開口部をもつ貫通した基質結合ポケットを有する (図 2)。また、DcsB のポケットは1つの開口部のみをもつ。一方、今回決定した構造では E1bB のポケットは完全に閉じた形状をとっていた (図 2)。DcsB と比べると E1bB ではフェニルアラニンが開口部を塞いでいることが分かった。このフェニルアラニンをアラニンに置換した変異体では、基質の加水分解のみが起こり環化は起こらなかった。そのため、フェニルアラニンによって完全に閉じられたポケットをもつことが、E1bB による環化反応に必須だと思われる。また、E1bB の変異体の結晶構造では、上記 α ヘリックスがディスオーダーしている開いた構造が得られた。そのため、基質の出入りの際にはこの α ヘリックスが構造変化してポケットが開閉することで基質の出入りが可能になると考えられる。

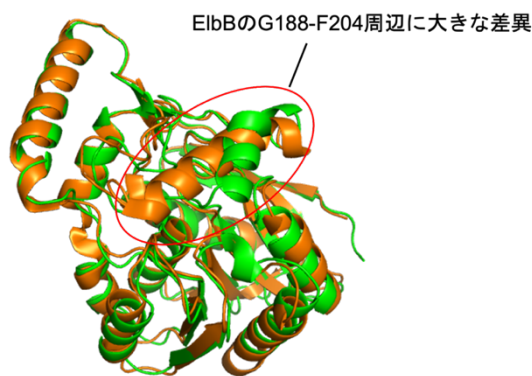


図 1. E1bB (緑) と DcsB (橙) との構造比較

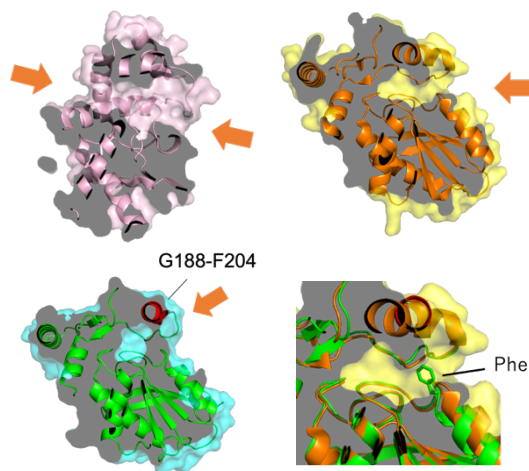


図 2. DEBS-TE (桃) と DcsB (橙) と E1bB (緑) とのポケットの比較

また、DEBS-TE との構造比較から、チオエステル加水分解酵素がもつ触媒三残基 (セリン・ヒスチジン・アスパラギン酸) が E1bB にも保存されていることが分かった。しかし、E1bB のアスパラギン酸の位置は DEBS-TE とは異なっていたため、それぞれの残基をアラニンに置換した変異体の活性を調べた。その結果、いずれの変異体も活性が失われ、この3残基が触媒三残基であることが確かめられた。今回の解析では基質との複合体構造が得られなかったため、E1bB の触媒三残基のセリンの側鎖と反応中間体とがエステル結合した状態でドッキングシミュレーションを行い、基質の五員環と水酸基の認識に重要なアミノ酸残基を調べた (図 3)。その結果、五員環はバリン・ロイシン・メチオニンなどの疎水性残基でできたポケットに認識され、水酸基はシステインの側鎖によって認識されると示唆された。

ここまでの結果から、E1bB の反応機構は図 4 のように推定される。PKS の ACP ドメインに結合した修飾済みの基質は、E1bB の α ヘリックス (G188-F204) の動きを伴って基質結合ポケットに侵入する。この際、バリン・ロイシン・メチオニンからなる疎水性ポケットに基質の五員環が認識され、システインによって水酸基が認識される。そして、触媒三残基のヒスチジンとアスパラギン酸によって活性化されたセリン残基が基質のチオエステル結合の炭素原子を求核攻撃し、ACP ドメインから基質が切り離されてセリン残基とエステル結合をつくる。その後、基質の他端の水酸基がヒスチジンによる活性化を受けて、エステル結合の炭素原子を求核攻撃する。この際、フェニルアラニンによって完全に閉じられたポケットをもつことで、基質の両端を近づける効果と外からの水分子などの侵入を防ぐ効果があると考えられる。最後に、基質がセリン残基から切り離されると同時に環化され、生成物 brefeldin C ができる。

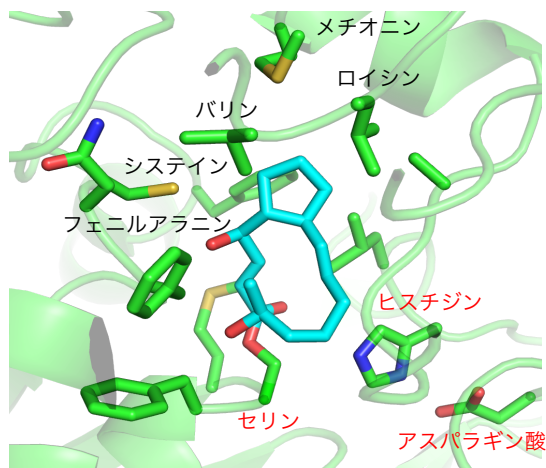


図 3. E1bB と反応中間体（水色）とのドッキングシミュレーション結果のひとつ。触媒三残基は赤字で示す。

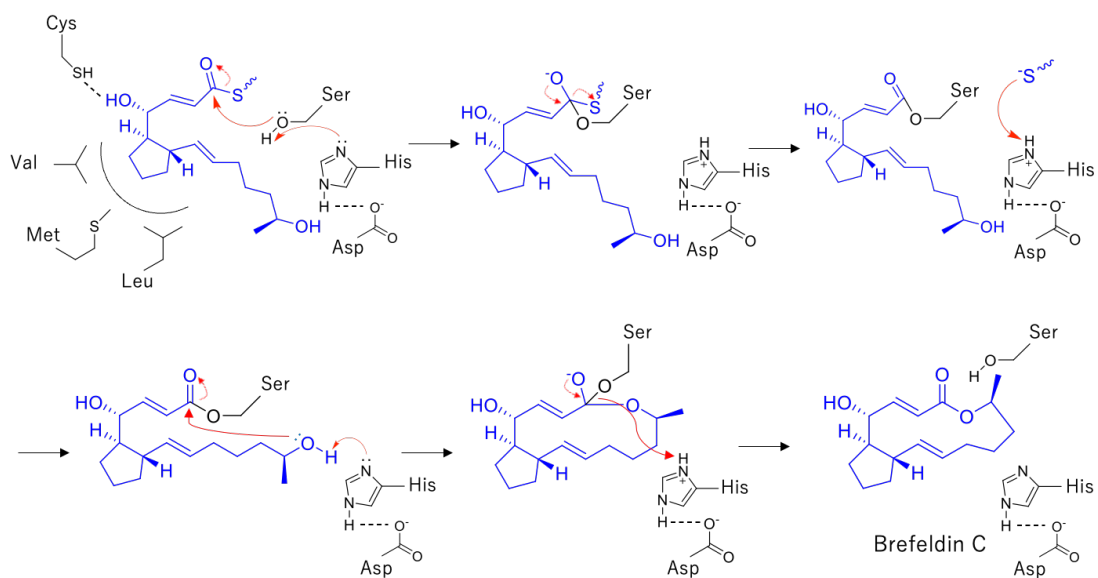


図 4. E1bB の推定反応機構

引用文献

- [1] Y. Morishita, *et al.* The Discovery of Fungal Polyene Macrolides via a Postgenomic Approach Reveals a Polyketide Macrocyclization by *trans*-Acting Thioesterase in Fungi. *Org. Lett.* 4788–92 (2019).
- [2] D. W. Gao, *et al.* A Polyketide Cyclase That Forms Medium-Ring Lactones. *J. Am. Chem. Soc.* **143**, 80–4 (2021).
- [3] S. C. Tsai, *et al.* Crystal structure of the macrocycle-forming thioesterase domain of the erythromycin polyketide synthase: Versatility from a unique substrate channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 14808–13 (2001).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林瑠平、永田隆平、森下陽平、浅井禎吾、葛山智久
2. 発表標題 真菌由来チオエステル加水分解酵素E1bBの結晶構造解析
3. 学会等名 日本結晶学会令和3年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林瑠平、永田隆平、森下陽平、菅原章公、浅井禎吾、葛山智久
2. 発表標題 真菌Eupenicillium ludwigii由来PKSチオエステラーゼE1bBの基質認識機構に関する構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022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
---------	---------