

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05404

研究課題名（和文）非大腸菌タンパク質生産系を併用したモジュラーポリケチド合成酵素の試験管内再構成

研究課題名（英文）In vitro reconstitution of modular polyketide synthases using E. coli and non-E. coli protein production systems

研究代表者

湯澤 賢（Yuzawa, Satoshi）

慶應義塾大学・政策・メディア研究科（藤沢）・特任講師

研究者番号：20843890

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）：ポリケチド合成酵素（PKS）や非リボソームペプチド合成酵素（NRPS）は現在広く普及している薬の生合成に関わっているが、kcatやKMなど生化学的なデータに関してはほとんど知見がない。本研究では2つのPKSと1つのPKS-NRPSハイブリッドを研究対象とした。その結果、1つのPKSに関しては大腸菌と放線菌を併用して必要なタンパク質の生産・精製に成功し生化学的データの取得に成功したものの、その他の酵素に関しては必要なタンパク質を全て取得することは困難であった。今後も大腸菌と放線菌を併用しPKSやNRPSの生化学的知見を蓄積することで新規薬剤の開発に役立てたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポリケチド合成酵素（PKS）や非リボソームペプチド合成酵素（NRPS）は現在広く普及している多様な抗生物質の生合成に関わっている。一方で近年新規抗生物質の発見速度は著しく低下しており新たな戦略が求められている。我々は既存のPKSの機能改変により抗生物質様の化合物を生産する取り組みを行っており、それら研究においてkcatやKMのような生化学的データは重要な要素の1つである。本研究によって新たに1つのPKSの生化学的データの取得に成功したものの、当該分野全体でも数種類のPKSの生化学的データしかないのが現状である。引き続き研究に邁進し、当該分野の発展に貢献したい。

研究成果の概要（英文）：Polyketide synthases (PKS) and nonribosomal peptide synthetases (NRPS) are involved in the biosynthesis of many widely used drugs, but there is little biochemical data such as kcat and KM values. In this study, we focused on two PKSs and one PKS-NRPS hybrid. As a result, for one PKS, we successfully produced and purified the necessary protein using a combination of Escherichia coli and Streptomyces albus and obtained biochemical data, but it was difficult to obtain all the necessary proteins for the other enzymes. In the future, we aim to contribute to the development of new drugs by accumulating biochemical knowledge of PKS and NRPS using these protein production systems.

研究分野：生化学

キーワード：試験管内再構成 放線菌 大腸菌 ポリケチド合成酵素 タンパク質生産

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究では、モジュラーポリケチド合成酵素 (モジュラーPKS) の至適温度、至適 pH、 k_{cat} 、 K_M 等の生化学的データを取得して比較解析することで、当該酵素の理解をより一層深めていく。モジュラーPKS は現在広く普及している複数の薬剤の生合成に関わっており、機能改変により各種医薬品アナログの生産も可能なため、本研究が成果に至れば新規医薬品の開発も加速されると期待される。

2. 研究の目的

モジュラーポリケチド合成酵素 (モジュラーPKS) は多様な薬剤の基本骨格の生合成を担う巨大なマルチドメイン酵素であり、その機能や構造の解析が盛んに試みられている。しかし野生型モジュラーPKS の試験管内再構成を達成した例は世界で 1 例しかなく、至適温度、至適 pH、至適イオン強度、 k_{cat} 、 K_M 等の基本情報が一般にどんな分布を示すかは明らかにされていない。そこで本研究では、これまで利用されていない非大腸菌タンパク質生産系も併用し、新たに 2 種類の野生型モジュラーPKS の試験管内再構成およびそれらの生化学的解析を実施する。当該酵素の理解がより一層進めば、モジュラーPKS の機能改変による医薬品アナログの開発も飛躍的に進展すると考えられるため、新たな薬剤の創出が期待できる。

3. 研究の方法

本研究ではトリコスタチン PKS、コリバクチン PKS-NRPS ハイブリッド、エリスロマイシン PKS の試験管内再構成を試み、至適温度、至適 pH、 k_{cat} 、 K_M 等を *in vitro* で測定し比較解析を行う。

トリコスタチン PKS: トリコスタチン PKS を構成する 3 つの野生型タンパク質、TsnB1 (151 kDa)、TsnB2 (192 kDa)、TsnB3 (211 kDa)のうち TsnB1 と TsnB3 に関しては大腸菌からタンパク質を精製することに成功したが、TsnB2 に関しては大腸菌内で不溶となり取得に至らなかった。一方で、最近になって放線菌を活用した系で発現条件を詳細に検討した結果、TsnB2 を十分量精製することに成功した。さらには His タグを利用した一次精製後の TsnB1 (大腸菌で生産)、TsnB2 (放線菌で生産)、TsnB3 (大腸菌で生産) を用いて野生型トリコスタチン PKS の試験管内再構成も達成し、およそ 1 min^{-1} の k_{cat} を記録した (未発表)。当該システムに関しては、各タンパク質の二次精製後 (ゲルろ過で活性体のホモダイマーのみを精製する)、各種生化学的データの取得を行う。

コリバクチン PKS-NRPS: コリバクチン PKS-NRPS を構成する 10 種類のタンパク質、ClbB (353 kDa)、ClbC (95 kDa)、ClbH (177 kDa)、ClbI (108 kDa)、ClbJ (243 kDa)、ClbK (238 kDa)、ClbL (53 kDa)、ClbN (162 kDa)、ClbO (90 kDa)、ClbQ (27 kDa)のうち、ClbJ に関しては大腸菌における生産が困難であることが先行研究により示されている。そこで TsnB2 の精製における申請者の経験を活かし、ClbJ を上記放線菌を利用した系により取得することを目指す。His タグを利用した ClbJ の一次精製が成功に至れば、そのたタンパク質の二次精製を行い、各種生化学的データの取得を行う。

エリスロマイシン PKS: エリスロマイシン PKS を構成する 3 つのタンパク質、EryAI (371 kDa)、EryAII (374 kDa)、EryAIII (332 kDa)のうち、EryAI に関しては大腸菌における生産が困難である

ことが先行研究により示されている。そこで TsnB2 の精製における申請者の経験を活かし、EryAI を上記放線菌を利用した系により取得することを目指す。His タグを利用した EryAI の一次精製が成功に至れば、EryAI、EryAII、EryAIII の二次精製を行い、各種生化学的データの取得を行う。

4. 研究成果

トリコスタチン PKS に関しては、現在論文執筆に向けて実験データを取得中であるため、一般公開される本報告書には研究成果を記載しない方針とした。

コリバクチン PKS-NRPS に関して研究成果を以下に報告する。前述したようにコリバクチン PKS-NRPS を構成する 10 種類のタンパク質のうち ClbJ のみがこれまでタンパク質生産が報告されていない(表 1)。そこで ClbJ の遺伝子をコードする大腸菌用と放線菌用の発現ベクターを構築した。興味深いことに大腸菌においてタンパク質は生産されたものの、放線菌においては当該タンパク質の生産は確認できなかった。トリコスタチン PKS における TsnB2 と全く逆の結果となった。一方、大腸菌内で生産可能とされていた ClbB に関しては、各種発現条件を検討したが我々の研究室では大腸菌でも放線菌でも取得できなかった。結果として全てのタンパク質を精製することができず試験管内再構成を断念した。

表 1 コリバクチン PKS-NRPS を構成するタンパク質の大腸菌における生産の可否

タンパク質の名前	大腸菌での生産の可否 (報告済)	大腸菌での生産の可否 (湯澤研究室)	放線菌での生産の可否 (湯澤研究室)
ClbB	可 (PMID = 28805802)	不可	不可
ClbC	可 (PMID = 26890481)	可	
ClbH	可 (PMID = 28805802)	可	
ClbI	可 (PMID = 26890481)	可	
ClbJ	不可	可	不可
ClbK	可 (PMID = 26890481)	可	
ClbL	可 (PMID = 31251062)	可	
ClbN	可 (PMID = 23406518)	可	
ClbO	可 (PMID = 26890481)	可	
ClbQ	可 (PMID = 27547923)	可	

エリスロマイシン PKS に関して研究成果を以下に報告する。前述したようにエリスロマイシン PKS を構成する 3 種類のタンパク質のうち EryAI のみがこれまでタンパク質生産が報告されていない(表 2)。そこで EryAI の遺伝子をコードする大腸菌用と放線菌用の発現ベクターを構築した。残念ながら大腸菌においても放線菌においては当該タンパク質の生産は確認できなかった。結果として全てのタンパク質を精製することができず試験管内再構成を断念した。

表 2 エリスロマイシン PKS を構成するタンパク質の大腸菌における生産の可否

タンパク質の名前	大腸菌での生産の可否 (報告済)	大腸菌での生産の可否 (湯澤研究室)	放線菌での生産の可否 (湯澤研究室)
EryAI	不可	不可	不可
EryAII	可 (PMID = 24161212)	可	
EryAIII	可 (PMID = 24161212)	可	

以上の結果をまとめる。トリコスタチン PKS を構成する 3 種類のタンパク質のうち TsnB2 は放線菌のみでタンパク質生産が可能であった。PKS や NRPS の多くが放線菌由来であるため、放線菌をタンパク質生産ホストとして使用することで多様な PKS や NRPS の試験管内再構成が可能であると考え本研究を行なった。一方で、エリスロマイシンの系では放線菌を使用しても EryAI は取得できなかった。したがって、放線菌由来のタンパク質の生産に放線菌が優位であるという結論は得られなかった。コリバクチン PKS-NRPS は大腸菌に由来する。したがって、放線菌ではなく、大腸菌の方がタンパク質生産に適していると考えた。これまでタンパク質生産が報告されていない ClbJ に関してはタンパク質の生産温度を 15 °C まで下げることでタンパク質の生産が可能となった(放線菌では取得できなかった)。しかしながら、大腸菌で生産可能と報告されていた ClbB がどのような条件でも取得できず、残念ながら試験管内再構成には至らなかった。今後も引き続き各種 PKS や NRPS のタンパク質生産方法を模索し、当該分野の生化学的知見の蓄積に貢献したい。

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
研究協力者	葛山 智久 (Kuzuyama Tomohisa)	東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授 (12601)	

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