

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19282

研究課題名(和文)世界初IDP型酵素の存在意義と構造形成機構の解明

研究課題名(英文)Significance of the presence of IDP enzyme and insight into structure for

研究代表者

久米田 博之(Kumeta, Hiroyuki)

北海道大学・先端生命科学研究院・学術専門職

研究者番号：00399966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：イオノフォアポリエーテルモノニンシンの生合成におけるエーテル環化にはエポキシド加水分解酵素様のMonBIとMonBIIが関わっている。これまでMonBIIは単独で構造非形成であり、MonBIとの相互作用により構造形成して触媒活性を発現することから、IDP酵素であることが示唆されていた。本研究ではさらに、MonBIIがIDPであることを証明するため、新たに構築した蛋白質調製系を用い、ゲル濾過クロマトグラフィー、NMR, far & near UV-CD, native-MS, を使用して分析した。活性型MonBIIは単量体であり、モルテン・グロビュール状態のような性質をもつことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

立体構造非形成蛋白質(IDP)はシグナル伝達経路に多く発見されているが、酵素全体がIDPである報告例は無かった。我々は本研究により、ポリエーテル系天然物生合成経路にはIDP酵素(MonBII型酵素)が存在することを世界で初めて提示した。MonBIIがIDP酵素として存在する意義としては、形の異なった基質を認識するためのカメレオンの可塑性を発揮できることが挙げられる。確立した独自の素材・実験系をさらに応用すれば、蛋白質研究の根底命題であるフォールディング過程をNMRを用いてタイムラプス観測できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Ionophore polyethers, which have diverse bioactivities derived from the polyether backbone, are widely used as antibiotics. However, the details of its ether ring formation mechanism were unknown. MonBI and MonBII are responsible for enzymatic ether cyclization in monensin biosynthesis. Previous studies have shown that MonBII, IDP of the catalyst, forms its structure and exerts its function with assistance of the chaperone molecule MonBI. This paired enzyme model has been suggested to be widely conserved in other epoxide hydrolases and may generalize the polyether biosynthesis pathway. In this study, I analyzed the properties of MonBI and MonBII by structural and spectroscopic methods. I have successfully shown that MonBI is highly soluble protein despite with large hydrophobic surface that is indispensable for a role as a chaperone.

研究分野：構造生物学

キーワード：NMR 結晶構造解析 IDP CD Native-MS

1. 研究開始当初の背景

天然物合成経路を担う酵素群は、基質や反応の多様さ故に、有機化学的および蛋白質科学的なタレントの宝庫と考えられる。本研究に関し、天然物合成における重要な領域であるポリエーテル系天然物合成研究に長年取り組んできた。エーテル環化を担っていると予測されていた MonBI, MonBII の2つの蛋白質(それぞれ 17kDa の蛋白質)を用い、酵素反応解析とともに結晶解析, CD, 熱量測定, X線小角散乱により解析された。その結果, MonBI には触媒活性が無いが, MonBII との何らかの相互作用により, MonBII に酵素活性を与えることを報告している (Tetrahedron Letters, 52, 5277 (2011), ACS Chem. Biol. 9, 562 (2014))。その後も MonBI-II 間における相乗効果の実体は謎であったが, NMR を組合せた結果, MonBII は単独で構造をとらない IDP であり, MonBI がケミカルシャペロンの・可逆的に MonBII の構造形成を担っていることを証明できた。立体構造を形成しない Intrinsically Disordered Protein (IDP)として特に研究が進んでいる蛋白質は, 高等生物シグナル伝達系や転写翻訳系に多く含まれ, 他の蛋白質との相互作用時に過渡的部分構造形成をおこなう。それに対し, ポリペプチド鎖の大部分が IDP で構成される酵素はこれまで報告が無い。例えば金属イオン要求性の酵素が, 金属イオン非存在下で部分的に disorder するといった局所的な例(多数)が公知であるのみである。しかし, 私達が研究してきたモネンシン環化酵素 MonBII は, 酵素全体が可逆的 IDP であるデータを蓄積することができた。MonBII はエポキシド骨格を持つポリケタイド鎖のエーテル環化反応を触媒し, モネンシン合成最終経路を担っている酵素である。モネンシンのほか, キジマイシンやナイジェリシン等多数を含む一群のポリエーテル系天然物は精力的に合成経路の研究がなされている。それぞれのエーテル環化酵素を AlphaFold2 で構造予測してみると, 私達のペア型酵素戦略はポリエーテル系天然物で広く保存されていると予測された。

2. 研究の目的

本研究によって世界初の IDP 酵素があることを完全に証明し, ペア蛋白質 (MonBI) が存在する際の MonBII 構造形成過程をアミノ酸残基レベルで追跡し, IDP 酵素の動作機構を解明する。また, 同様のペア型 IDP 酵素はポリエーテル系天然物合成経路に普遍的に存在すると予測されるため, その存在意義を明らかにすることも重要な目的である。

3. 研究の方法

(1) ゲル濾過クロマトグラフィ分析

新規調製法により精製した活性の高い MonBII を使用し, ゲル濾過分析をおこなった。また, 比較のため, MonBI K7A (単量体化変異体), MonBI ホモ二量体, MonBI MonBII 混合溶液を分析した。

(2) 円偏光二色性 (Circular Dichroism) 測定

二次構造を考察するため, ゲル濾過クロマトグラフィの各画分を, CD 測定に供した。

(3) Native-MS

SEC-MALS 法を適用することができないため, ゲル濾過クロマトグラフィの各画分を Native-MS により分析し, オリゴマリゼーションを測定した。MonBII および, MonBI-MonBII 混合溶液が

らの SEC 画分を供した。

(4) NMR

フォールディング活性を測定するため、ゲル濾過クロマトグラフィ画分および各画分と MonBI を混合したサンプルを、 ^1H - ^{15}N HSQC 測定した。

(5) 結晶構造解析

これまでは MonBI ホモ二量体、MonBI-MonBI ヘテロ二量体の結晶構造しかわかっていなかったため、MonBI を単量体化する変異を導入したコンストラクトにより、結晶構造解析をおこなった。

(6) 酵素活性測定

MonBII の SEC 画分を MonBI と混合し、基質としてビスエポキシドエステルアルコールを用い、活性測定をおこなった。生成物ビスエーテルの検出には LC-MS を使用した。

4. 研究成果

(1) ゲル濾過クロマトグラフィ分析

ゲル濾過クロマトグラフィの結果、MonBI wild type では二量体相当、MonBI_K7A 変異体では単量体相当の位置でピークが得られた。MonBII はそれに対し、4つのシグナルとして分画された。それぞれのシグナルを分画したものを F1 - F4 とする。

(2) 円偏光二色性 (Circular Dichroism) 測定

波長スキャン測定の結果から、MonBII 溶出画分 F1, 2, 4 は同様なスペクトルとなり、208nm の極小、および 222nm に緩やかな極小が見られる。それに対し、溶出画分 F3 は 222nm に緩やかな極小が見られるが、これは β -sheet 由来のスペクトル形に類似していること、および HSQC の結果から構造形成能力を持たないことから、アミロイドのように β -sheet の凝集が起きていると考えた。F3 では二次構造の形成を表すシグナルは殆ど見られなかった。

また、単独 MonBII の温度変化測定を MonBI_K7A 変異体と比較した。MonBI_K7A 変異体では 50°C を変曲点として平均モル楕円率が 0 に近づくため、昇温に伴い特異的な二次構造が変性することが分かる。一方、単独 MonBII ではスペクトルの変化は見られず、昇温で変化し得る二次構造を持たないことが分かった。

F1 - F4 の温度上昇に伴う 222 nm におけるモル楕円率を観測したところ、溶出画分 F1-4 のいずれも、昇温に伴う変化は見られない。

(3) Native-MS

SEC により分画した 4 状態の MonBII について、Native MS に供した。F1, 2, 4 は単量体相当のピーク割合が多く見られたが、F3 は多量体相当のピーク割合が多かった。CD の結果と併せて考えると、F1, 2, 4 は局所的に二次構造をもちながらも、全体としては慣性半径の大きな状態（それぞれ慣性半径が異なる）をとっていることがわかった。

(4) NMR

SEC で分画した 4 状態の ^{15}N -MonBII について、単独に測定した ^1H - ^{15}N HSQC と、 ^{14}N -MonBI を混合して測定した ^1H - ^{15}N HSQC をおこなった結果、溶出画分 F1, 2, 4 は構造形成を示すスペクトルが得られ。一方、溶出画分 F3 は典型的な構造非形成領域に集中したシグナルが得られたため、MonBI 存在下でも構造形成しない MonBII であることが分かった。すなわち、本実験からは溶出画分 F1, 2, 4 が構造形成能力を持つ活性型 MonBII であることが示された。

(5) 結晶構造解析

MonBI_K7A 変異体の結晶化を試み、得られた結晶から SPring8 による回折測定の結果、分解能

2.5 Å の疑似二回軸を持つ MonBI_K7A-MonBI_K7A 蛋白質のホモ二量体結晶構造が得られた。MonBI_K7A ドメインは共に β -シートによって形成されるコアを数本の α -ヘリックスで取り囲む構造をしている。MonBI が相互作用相手に対して疎水性に富む界面を提供することから、MonBII との相互作用について考えた。MonBI-MonBII の相互作用には MonBI 同士の界面の解離が起こると考えられるが、その際に露出する疎水性界面が MonBII との接触面となる。このことから、MonBII の構造形成初期段階である MonBI との相互作用開始時点では疎水性相互作用が起こると考えられる。

さらに、MonBI-MonBI wild type (二量体)、MonBI-MonBII wild type (二量体)、MonBI_K7A-MonBI_K7A (結晶中のみ二量体様) の構造について、重ね合わせをおこなった。MonBI 側である A chain はよく重なるが、MonBI の相互作用相手側である B chain はずれが生じていた。このことから、MonBI は構造が異なる相手と相互作用できる寛容な界面を提供することが分かった。この寛容な相互作用を可能にする性質は、IDP という柔軟な構造を持つ MonBII のシャペロン分子として機能するために必要であると考えられる。

(6) 酵素活性測定

一本鎖ペプチドとして共発現させた MonBI-MonBII は、それぞれ別に調製した MonBII と MonBI を混合した酵素よりも同時間における生成物の産生量が多い。すなわち、人工的なリンカーで MonBI と MonBII を一本鎖ペプチド化することで触媒活性が高くなることが明らかになった。これは、リンカーの導入によって MonBI と MonBII が相互作用しやすくなるためであると考えられる。また、新たに確立した MonBII 調製法は、従来法で調製した MonBII よりも、遙かに活性が高いことがわかり、構造形成能力のある MonBII は可逆的であるが、失活したものは不可逆変化により活性体としては復活できないことがわかった。

本研究によりペア型 IDP 酵素戦略を証明することができたが、この意義は以下のように考えた。「1. 長いエポキシド基質を端から順に連鎖的エポキシド開環・エーテル環化をするうえで必要な長大 cavity を小さな蛋白質の内部に設計できる」、「2. 連鎖反応における各段階の基質構造は部分的に異なっているが、可塑性が MonBII に与えられるため、多様な基質構造に対応できる」。私達のバイオフィーマティクス解析も踏まえると、MonBI と MonBII は共通の祖先から進化し、MonBI には剛体としての性質が与えられ、MonBII には自立できない構造柔軟性が与えられた。両者がペアとなり、MonBI は MonBII 構造を横で保持するケミカルシャペロンとして働くことで、MonBII は大きなキャピティとカメレオンの可塑性を獲得できたと考えている。長い基質の連鎖的・立体特異的な酵素反応を可能にする蛋白質戦略を詳細に明らかにし、既存概念とは全く異なった蛋白質の能力を見いだすことができた。

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 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大和田ゆうき, 澤田光平, 荒井彩花, 田所高志, 南篤志, 前仲勝実, 久米田博之, 姚閔, 及川英秋, 尾瀬農之
2. 発表標題 世界初IDP酵素の検証
3. 学会等名 令和4年度日本結晶学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nana Yabuno, Yuki Owada, Ayaka Arai, Min Yao, Hiroyuki Kumeta, Toyoyuki Ose
2. 発表標題 Implication of IDR for the biosynthesis of polyether ionophore antibiotics
3. 学会等名 29th Pharmascience Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024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
研究分担者	姚 閔 (Min Yao) (40311518)	北海道大学・先端生命科学研究院・名誉教授 (10101)	
研究分担者	尾瀬 農之 (Ose Toyoyuki) (80380525)	北海道大学・先端生命科学研究院・教授 (10101)	

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
---------	---------