

タンパク質間相互作用機構を考慮した酵素改変による 新規ポリケチド化合物の発酵生産研究

工藤 史貴

東京科学大学 理学院化学系

(現所属：神奈川大学 化学生命学部)

研究の目的

抗菌活性や抗腫瘍性を有するマクロライドやマクロラクタムなどのポリケチド化合物は、ポリケチド合成酵素 (PKS) によって基本炭素骨格が構築される。PKS は複数の触媒ドメインから構成され、ポリケチド鎖はチオエステル結合を介してキャリアープロテイン (CP) ドメインに結合した形で形成される (Fig. 1)。PKS のアシル基転移酵素 (AT) ドメインは、ポリケチド鎖伸長ユニット

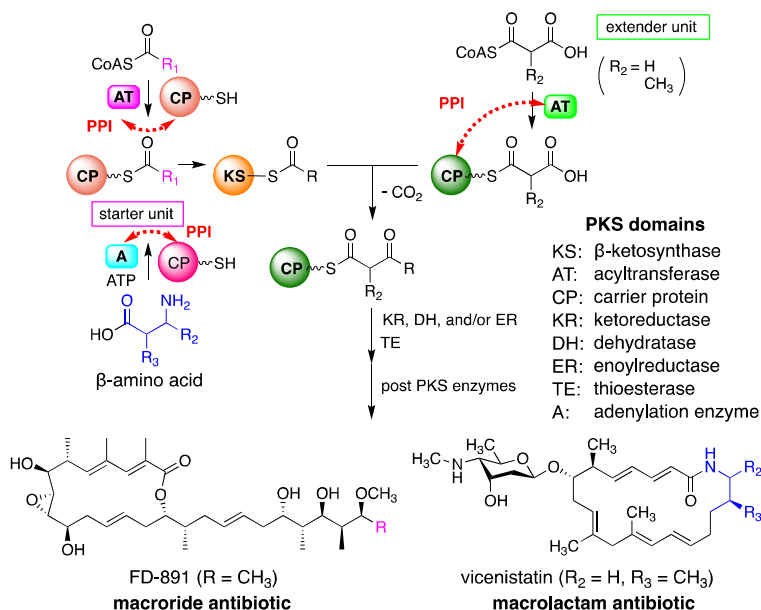


Fig. 1. Summary of polyketide biosynthesis

であるマロニル CoA やメチルマロニル CoA を認識して、マロニル基やメチルマロニル基をパートナーとなる CP ドメインに転移する。そして β -ケト合成酵素 (KS) ドメインは、上流の CP に結合したポリケチド鎖と下流の CP に結合したアルキルマロニル基を認識して Claisen 型縮合を触媒し、ポリケチド鎖を伸長する。そのようにして生じた β -ケトアシル中間体は、 β -ケト還元酵素 (KR) ドメインにより還元されたり、さらに脱水酵素 (DH) ドメインにより脱水されたり、エノイル還元酵素 (ER) ドメインにより還元されたりすることで、様々な還元度からなるポリケチド鎖が形成される。また、開始基質はアセチル基やプロピオニル基だけではなく、アミノアシル基であることもあり、アミノアシル基のアミノ基が環状アミド化に使われる場合にマクロラクタムが形成される。アミノアシル基が開始基質となる場合には、アデニル化酵素が開始基質となるアミノ酸を認識して、パートナーとなる CP ドメインに結合させることが多い。すなわち、ポリケチドの基本炭素ユニット構造は、伸長基質と開始基質を認識する AT ドメインとアデニル化酵素などの基質特異性によって決定づけられる。従って、天然型とは異なるポリケチド類縁体を生産するために、基質特異性の異なる AT ドメインやアデニル化酵素を遺伝子組換えで取り換える研究は

古くから行われてきた。しかしながら、その成功例は限られており、その一因として、天然型の AT ドメインやアデニル化酵素と CP ドメインとのタンパク質間相互作用 (PPI) が、ドメインの取り換えにより担保されないことが懸念されていた。そこで天然型の PPI について *in vitro* にて検証し、天然型の PPI を損なわないようにドメイン交換することで、デザイン通りのポリケチド類縁体を発酵生産することができると期待された。本研究では、AT ドメインやアデニル化酵素と CP ドメインとの PPI の知見を蓄積することを目的とした。

方法

我々はこれまでに、二つのマクロライド FD-891 と *virustomycin A* を生産する放線菌を用いて AT ドメイン交換により FD-891 類縁体生産に成功している。また、 β -アミノ酸を開始基質部位に有する複数のマクロラクタム生産菌を活用して、特異な β -アミノ酸の生合成遺伝子を破壊した株に非天然型の β -アミノ酸を投与することで、非天然型マクロラクタムの生産に成功している。そこで、これら生合成における AT ドメインやアデニル化酵素と CP との天然型の PPI の知見を蓄積することにした。

各酵素と CP との PPI の強弱を評価するために、独自に開発してきたクロスリンク法を用いた (Fig. 2)。この方法ではまず、求電子性官能基を有するパンテテイン類縁体をアポ型の CP に結合させることで、通称 *crypto-CP* と呼ばれる修飾型 CP を調製する。パンテテイン類縁体は、独自にデザインして有機合成して調製する。そして、補酵素 A 生合成酵素と寛容な基質特異性を有するホスホパンテテニル基転移酵素を用いて、大腸菌にて発現・精製したアポ型の CP を修飾することで、様々な *crypto-CP* を調製できる。また、AT ドメインやアデニル化酵素の活性部位のアミノ酸残基をシステインに変異して求核基であるチオールを導入することで、適切な PPI が存在する場合に効率的なクロスリンク反応が起こる。

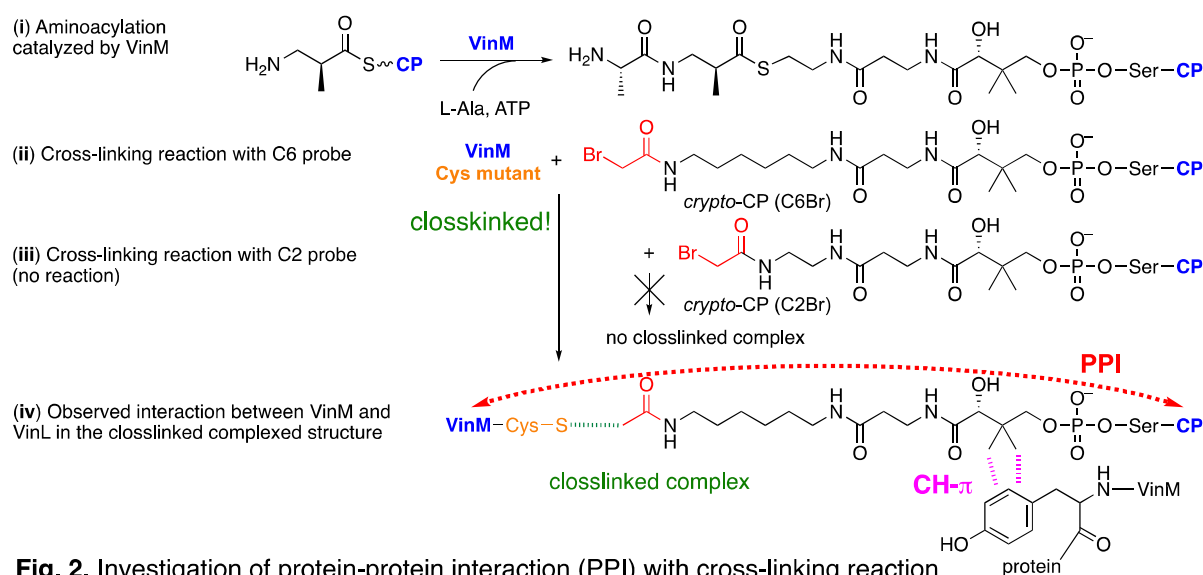


Fig. 2. Investigation of protein-protein interaction (PPI) with cross-linking reaction

結果

種々検討した結果、マクロラクタムの生合成において β -アミノアシル-CP を認識してジペプチジル-CP を形成するアデニル化酵素について興味深い知見を得ることができた (Fig. 2) ¹。

β -アミノ酸を開始基質に有するマクロラクタムの生合成では、 β -アミノアシル-CP の β -アミノ基をアミノアシル化して保護することで生合成が進むことが分かっている (Fig. 2-i)。この反応を触媒するアデニル化酵素は、 β -アミノアシル化されてない CP をアミノアシル化しないため、何らかの識別機構があると予想された。これまで用いてきたパンテテイン類縁体を用いた場合にはクロスリンク反応は起きなかったが、リンカー長を C2 から C6 に長くしたパンテテイン類縁体を用いた場合にクロスリンク反応が起きた (Fig. 2-ii and iii)。このようにして得られたアデニル化酵素と CP のクロスリンク複合体について結晶構造解析した結果、幾つかの疎水性相互作用、塩橋、水素結合からなる PPI を見出すことができた。この PPI については変異解析により生化学的に確認した。また C6 というリンカー長は、 β -アミノアシル-CP をアミノアシル化するアデニル化酵素と CP が PPI するために適切な長さであることも分かった。興味深かったのは、PPI に加えて、アデニル化酵素のチロシン残基とパンテテインのジメチル基が CH- π 相互作用をしていたことである (Fig. 2-iv)。このエキストラとも思える相互作用があることで、基質である β -アミノアシル-CP の β -アミノ基を適切な位置に配置することができると示唆された。

結論

我々はこれまで、複数の天然型の組み合わせの AT ドメインやアデニル化酵素と CP の PPI を解明していた。従って、天然型の PPI を崩さないように変異導入したドメインを交換することにより、デザイン通りのポリケチド類縁体を発酵生産することができると考えていた。本研究結果は、ドメイン交換による類縁体生産を検討する上で、AT ドメインやアデニル化酵素と CP の PPI だけではなく、パンテテイン部位との相互作用も考慮する必要があることを示唆している。すなわち本研究を踏まえ、PPI だけではなく、アシル基の認識機構についても検証する必要があることが分かった。現在、アシル化された CP と各酵素との相互作用のバリエーションについて研究を進めており、酵素改変によるポリケチド類縁体の発酵生産に向けた基礎的な知見を蓄積している。

文献

- (1) Miyanaga, A., Nagata, K., Nakajima, J., Chisuga, T., Kudo, F., and Eguchi, T. (2023) Structural Basis of Amide-Forming Adenylation Enzyme VinM in Vicenistatin Biosynthesis, *ACS Chem. Biol.* **18**: 2343-2348.