

新規な β -アミノ酸生合成酵素の構造機能解析 Structural and functional analysis of β -amino acid biosynthetic enzymes

宮永 颯正^{*}、千菅 太一、工藤 史貴、江口 正

東京工業大学理学院、〒152-8551 東京都目黒区大岡山 2-12-1-E1-1

Akimasa Miyanaga^{*}, Taichi Chisuga, Fumitaka Kudo and Tadashi Eguchi

Tokyo Institute of Technology, 2-12-1-E1-1 Ookayama, Meguro-ku, Tokyo, 152-8551, Japan

1 はじめに

微生物が産生する天然化合物は多様な化学構造と生物活性を有しており、これまでに多くの有用な化合物が単離されてきた。天然化合物は β -アミノ酸に由来する部位を含んでいることがあり、その構造多様性を広げていると共に、その独特な生物活性に貢献している [1]。天然化合物の生合成には様々な β -アミノ酸が利用されることが報告されているが、 β -アミノ酸を生成する酵素はバラエティに富んでいるため、未開拓の部分が多い。

当研究グループでは、これまでに、 β -アミノ酸含有マクロラクタム抗生物質の生合成解析を進めてきた。その過程で、*Streptomyces* sp. MJ635-86F5 株が生産するクレマイシンの生合成において、チオエステラーゼ CmiS1 と酸化酵素 CmiS2 の二つの酵素が働くことにより、 β -アミノ酸である 3-アミノノナン酸が生成することが明らかになった。これらの酵素のうち、CmiS1 は 2-ノネン酸チオエステルの 3 位にグリシンを共役付加させ、その後チオエステルの加水分解反応を行うという二段階反応を触媒することから、その反応機構に興味を持たれた。

この CmiS1 と相同性のある酵素は微生物に広く存在している。そのうち、*Streptomyces avermitilis* 由来の SAV606 の機能解析を行ったところ、短鎖のクロトン酸チオエステルに対し、グリシンを共役付加させ、その後チオエステルの加水分解反応を行うことが分かった (図 1)。このように、SAV606 は CmiS1 とはアシル基質の特異性が異なるものの、同様な二段階反応を触媒することが明らかになった。本研究では、CmiS1 や SAV606 が触媒する二段階反応の構造基盤を明らかにすることを目的として、SAV606 の結晶構造解析を行った。

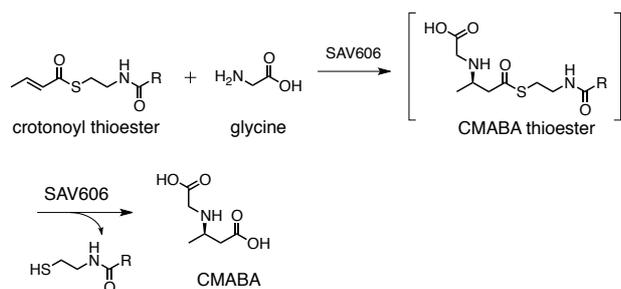


図 1 : SAV606 の反応

2 実験

SAV606 の結晶構造を明らかにするため、精製した SAV606 組換えタンパク質を用いて、結晶化を行った。また、SAV606 の生成物である *N*-カルボキシメチル-3-アミノブタン酸 (CMABA) 存在下においても結晶化を行った。得られた結晶を用いて、KEK-PF の構造生物学ビームラインにおいて、回折測定実験を行い、構造を解析した。

3 結果および考察

まず、SAV606 のアポ型結晶構造を分解能 2.4 Å にて決定した。SAV606 は α/β ホットドックフォールドを有しており、ホモ二量体で存在していた。

次に、SAV606 と生成物 CMABA との複合体の結晶構造を分解能 2.0 Å にて決定した。その結果、SAV606 の二量体界面に CMABA が結合していた (図 2)。アポ型構造と比較して閉じた構造を取っており、アポ型構造ではディスオーダーしていた基質結合ループ (Tyr53 ~ Ser62) のアミノ酸残基が CMABA のグリシン部位と相互作用していた。また、CMABA のブタン酸部位の末端メチル基は Met73 と疎水性相互作用を形成していた。CmiS1 ではこの残基は Ala に置換されていたことから、この位置のアミノ酸残基の違いが鎖長選択性に影響していると考えられた。

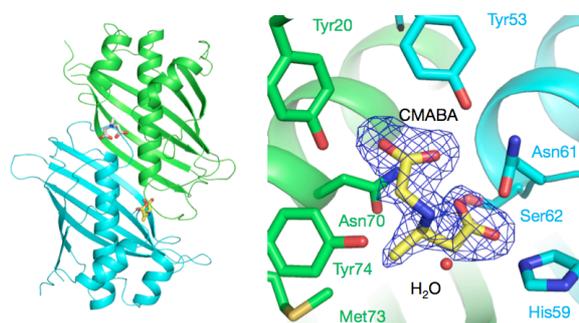


図 2 : SAV606 複合体の結晶構造

活性中心のアミノ酸の役割を評価するため、部位特異的変異解析を行った。その結果、His59 の変異体は共役付加反応と加水分解反応のどちらの活性も完全に失った。His59 は CMABA のブタン酸部位の α 位近傍に存在する水分子と水素結合を形成しており、この水分子を介して反応に関わっていると考えられた。

これらの結果に基づき、以下のように SAV606 の反応機構を推定した。すなわち、SAV606 の基質結合ループが閉じることにより、グリシンがクロトン酸チオエステルの β 位近傍に運ばれる。その際、His59 が水分子を介してグリシンアミノ基の脱プロトン化を行うことで、クロトン酸チオエステルへの共役付加反応を誘起する。生じたアニオンは水分子からプロトンを奪って CMABA チオエステル中間体が生成する。続いて、His59 により脱プロトン化された水分子が中間体のチオエステルを攻撃することで加水分解反応が触媒される。

4 まとめ

SAV606 と生成物 CMABA の複合体構造を決定し、基質の認識機構、二段階反応の機構を明らかにすることに成功した。本研究成果は *J. Biol. Chem.*誌に掲載された [2]。

謝辞

実験をサポートしてくださった PF スタッフの方々に感謝いたします。

参考文献

- [1] F. Kudo *et al.*, Biosynthesis of natural products containing β -amino acids. *Nat. Prod. Rep.* **31**, 1056–1073. (2014).
- [2] T. Chisuga *et al.*, Structural analysis of the dual-function thioesterase SAV606 unravels the mechanism of Michael addition of glycine to an α,β -unsaturated thioester. *J. Biol. Chem.* **292**, 10926–10937. (2017).

成果

学会発表

千菅太一、宮永顕正、工藤史貴、江口正
Ⅲ型チオエステラーゼ SAV606 の構造機能解析
2016 年度量子ビームサイエンスフェスタ
2017 年 3 月

* miyanaga.a.aa@m.titech.ac.jp