

非リボソームペプチド合成酵素 FmoA3 の X 線結晶構造解析 X-ray Crystallographic Analysis of the Nonribosomal Peptide Synthetase FmoA3

曾根薫¹、原田彩佳²、勝山陽平^{1,3}、千田美紀²、千田俊哉²、大西康夫^{1,3}

¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科, 応用生命工学専攻,

〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

² 高エネルギー加速器研究機構 (KEK), 物質構造科学研究所, 構造生物学研究センター,

〒305-0801 つくば市大穂 1-1

³ 微生物科学イノベーション連携研究機構, 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

Kaoru Sone¹, Ayaka Harada², Yohei Katsuyama^{1,3}, Miki Senda¹, Miki Senda², Toshiya Senda², Yasuo Ohnishi^{1,3}

¹Department of Biotechnology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences,
The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

²Structural Biology Research Center, Institute of Materials Structure Science, High Energy
Accelerator Research Organization (KEK), Tsukuba 305-0801, Japan

³Collaborative Research Institute for Innovative Microbiology, The University of Tokyo, 1-1-1
Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

1 はじめに

非リボソームペプチドは様々な微生物が生産する生理活性物質の一群であり、医薬品としても利用されている化合物が存在することから極めて重要な化合物群である。非リボソームペプチドは非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) により生合成される[1]。NRPS は多くの場合、複数のモジュールと呼ばれる構成単位からなる巨大なタンパク質である。1 つのモジュールは 1 つのペプチド結合の形成を担う。モジュールはドメインと呼ばれる機能単位に分けることができ、各ドメインはペプチド結合の合成において異なる役割を持つ。一般的な NRPS のモジュールはアミノ酸を選択するためのアデニレーション (A) ドメイン、アミノ酸やペプチドを運搬するキャリアータンパク質 (CP, もしくはチオレーション, T) ドメイン、ペプチド結合を形成する縮合 (C) ドメインから構成される。また、これら以外にも様々な修飾ドメインを持つ場合がある。ヘテロ環化 (Cy) ドメインはシステイン、セリン、スレオニンペプチド鎖伸長に用いる際に C ドメインの代わりに存在することがあるドメインであり、ペプチド結合の形成とヘテロ環化反応の両方を触媒することが知られている。

NRPS はペプチド結合形成において大きく構造を変化させることが明らかになっている。また、有用な医薬品資源の生合成に関わることから、酵素改変の研究対象として魅力的である。NRPS の構造解析は様々な研究者によって行われているが、その多くが個々のドメインの構造解析を行ったものである。NRPS の触媒機構を理解するためにはモジュール全体の構造を明らかにするとともに、その構造変化の

メカニズムを解明することが重要であるが、そのような研究はほとんど行われていない。

そこで、本研究では NRPS の触媒機構をより深く理解するために、Cy-A-T の 3 つのドメインから構成される NRPS である FmoA3 の構造解析を試みることにした[2]。

2 実験

まず、N 末端に His-tag、C 末端に Strep-tag を融合した FmoA3 の組換えタンパク質を大腸菌 BL21 (DE3) と pCold システムを用いて調製した。得られた組換えタンパク質を Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィー、Strep-tag/Strep-Tactin アフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。得られたタンパク質を結晶化スクリーニングに供し、いくつか良質な結晶が得られる条件を見出した。これらの結晶化条件をもとにさらに最適な結晶化条件を探索した結果、0.1 M MgCl₂, 0.1 M HEPES pH 8.0, 25% polyacrylic acid sodium salt 5,100 (PAA) をリザーバーとして用いた条件より得られた結晶で高分解能のデータを得ることができた。分子置換により位相を決定した結果、2.48 Å の分解能で FmoA3 の構造を解くことに成功した。また、ソーキングにより ATP のアナログである AMP-PNP との共結晶の構造の取得を試みた結果、AMP-PNP との複合体の構造を 3.10 Å の分解能で解くことも成功した。

次に、反応中間体である α -methyl-L-serinyl-AMP との複合体の構造解析を試みた。FmoA3 を α -methyl-L-serine と ATP と反応させたのちに、結晶化スクリーニングに供した結果、異なる条件で結晶が得られた。この条件をもとに最適な結晶化条件を探索した結果、0.5 M LiSO₄, 0.1 M HEPES pH 7.5, 10% PEG8000 を

リザーバーとして用いた条件より得られた結晶で、高分解能のデータを得ることができ、3.25 Å の分解能で FmoA3 と α -methyl-L-serinyl-AMP の複合体の構造を解くことに成功した。

3 結果および考察

上記の実験により、FmoA3 単独 (図 1)、AMP-PNP との複合体、 α -methyl-L-serinyl-AMP との複合体 (図 2) の 3 つの状態の FmoA3 の構造が明らかになった。興味深いことに FmoA3 はホモダイマーであることが示された。これまで、構造が報告された NRPS の多くはモノマーである。一部ダイマーを形成しているように見えるものもあるが、それらは結晶中という特殊な環境で生じたものであると考えられている。一方、FmoA3 は SEC-MALS の解析からもダイマーであることが示されており、生体内でも同様の構造を取っていると考えられる。

AMP-PNP と FmoA3 の複合体の全体構造は FmoA3 単独の構造とほとんど変わらないものであった。一方、 α -methyl-L-serinyl-AMP と FmoA3 の複合体では大きな構造変化が観測された (図 2)。この構造中では FmoA3 単独の構造では観測されていた CP の電子密度が観測されず、代わりに A ドメインの C 末端に存在するサブドメイン (A_{sub} ドメイン) の電子密度が観測された。これにより、FmoA3 は α -methyl-L-serinyl-AMP の形成過程で大きく構造を変化させることが示された。

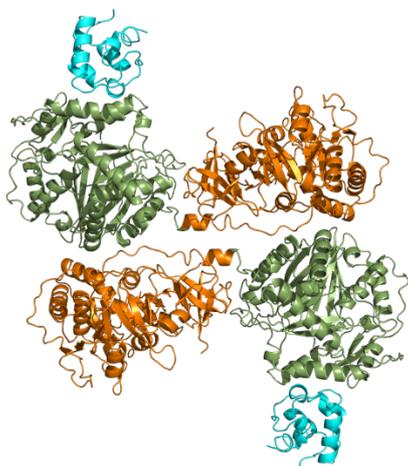


図 1 : FmoA3 の構造。Cy ドメインを緑、A ドメインをオレンジ、CP ドメインをシアンで示した。

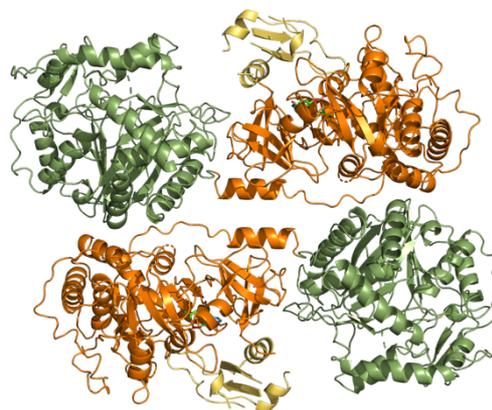


図 2 : FmoA3- α -methyl-L-serinyl-AMP 複合体の構造。Cy ドメインを緑、A ドメインをオレンジ、A_{sub} ドメインを黄色で示した。

4 まとめ

本研究により、単一のモジュールからなる FmoA3 の全体構造の解析に成功した。本研究は Cy-A-T の 3 つのドメインから構成される NRPS の構造を明らかにした初めての研究である。本研究をもとにさらなる解析を行うことで、NRPS の触媒機構に関して重要な知見が得られることが期待される。

参考文献

- [1] R. D. Süßmuth and A. Mainz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **56**, 3770 (2017).
- [2] A. Muliandi *et al.*, *Chem. Biol.* **21**, 923 (2014).

成果

1. JBIR-34, -35 の生合成を担う非リボソームペプチド合成酵素 FmoA3 の X 線結晶構造解析。○曾根 薫、原田 彩佳、勝山 陽平、千田 美紀、新家 一男、千田 俊哉、大西 康夫(口頭発表) 日本農芸化学会 2018 年度 名古屋大会
2. 勝山 陽平 日本農芸化学会 農芸化学奨励賞 「放線菌のもつ多様な二次代謝産物生合成機構の解析」
3. 勝山 陽平 農学会 日本農学進歩賞 二次代謝産物生合成研究を基盤とする有用酵素の探索と機能解析

* aykatsu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp, ayasuo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp