

アミノグリコシド抗生物質カナマイシン生合成酵素の構造解析 Structural analysis of kanamycin biosynthetic enzymes

宮永顕正*, 北山幸延, 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*, Yukinobu Kitayama, 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

アミノグリコシド抗生物質は、カナマイシンやストレプトマイシンなどが知られており、古くから重要な抗生物質として使用されてきた。その化学構造は、アミノサイクリトール骨格にアミノ糖やデオキシ糖が複数連結した擬似オリゴアミノ糖であり、組み合わせにより多種多様なアミノグリコシド抗生物質が知られている。アミノグリコシド抗生物質の大多数は、アミノサイクリトール部位に 2-デオキシストレプトタミン (2-DOS) を有している。これら 2-DOS 含有型アミノグリコシド抗生物質の生合成においては、パロマミンやネアミンを共通中間体として生成した後、糖転移やアミノ化などそれぞれの生合成経路に特徴的な修飾反応を受け、多種多様な構造を有するアミノグリコシド抗生物質が構築されると考えられている。

当研究グループでは、これまでに放線菌 *Streptomyces kanamyceticus* が生産するアミノグリコシド抗生物質カナマイシンの生合成研究を進めてきた。その生合成経路においては、糖転移酵素 KanM2 が UDP-グルコースを糖供与体として、パロマミンやネアミンを配糖化し擬似三糖骨格を形成する [1]。次に、酸化酵素 KanD2 とアミノ基転移酵素 KanS2 が、KanM2 によって導入されたグルコース部位の 3"位水酸基をアミノ基へと変換する (図 1)。KanD2 は単糖類であるグルコースや UDP-グルコースには作用しないことから、擬似三糖骨格を認識していると考えられるが、その認識機構は不明であった。そこで、本研究では、KanD2 の基質認識機構を明らかにすることを目的として KanD2 の結晶構造解析を行った。

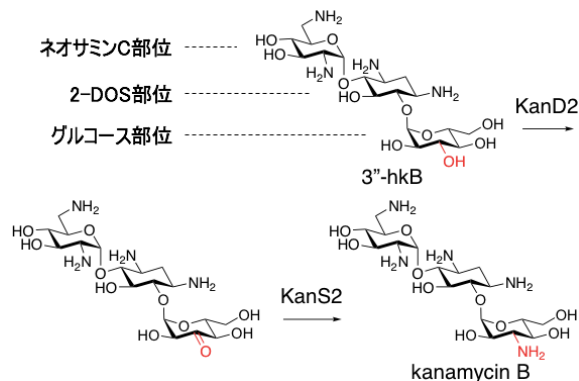


図 1 : KanD2 と KanS2 の反応

2 実験

KanD2 の結晶構造を明らかにするため、精製した KanD2 の組換えタンパク質を用いて、結晶化を行った。また、KanD2 の結晶に、基質である 3"-デアミノ-3"-ヒドロキシカナマイシン B (3"-hkB) を soaking することにより、3"-hkB との複合体結晶を調製した。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、KanD2 と NAD⁺ との複合体構造を分解能 2.8 Å で決定した。KanD2 は N 末ドメインと C 末ドメインから構成されており、NAD⁺ は N 末ドメイン側に結合していた。

次に、KanD2 と NADH と 3"-hkB との複合体構造を分解能 2.4 Å で決定した (図 2)。3"-hkB は NADH の近傍に結合していた。3"-hkB のグルコース部位 C3"位は NADH のニコチンアミド部位 C4 位と 3.6 Å の距離にあり、酸化を受けるのに適した位置に存在していた。3"-hkB の C3"水酸基は His182 と水素結合 (2.8 Å) を形成していた。His182 の変異体を作製したところ、活性を完全に失ったことから、His182 が触媒残基であることが示唆された。

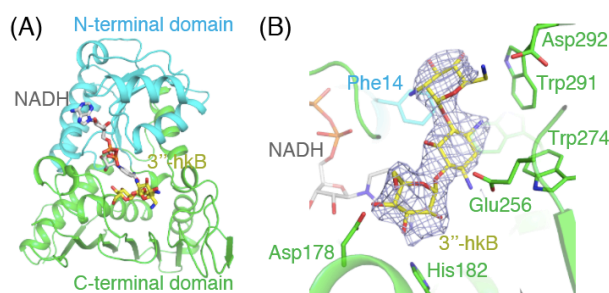


図 2 : KanD2 と 3"-hkB との複合体構造
(A) 全体構造、(B) 基質結合部位の構造

3"-hkB のグルコース部位の水酸基は Asn157 や Asp178 と水素結合を形成していた。また、2-DOS 部位のアミノ基は Glu256 と塩橋を形成していた。また、Phe14、Trp274、Trp291、Trp304 は 2-DOS 部位の炭素六員環やネオサミン C 部位のピラノース環を CH- π 相互作用によって認識していた。これらのア

ミノ酸残基の変異体を作製したところ、大半の変異体で活性が失われたことから、これらの残基が基質の認識に関わっていることが確かめられた。以上の結果から、KanD2は3"-hkBの擬似三糖骨格全体を水素結合やCH- π 相互作用によって認識していることが明らかになった。

4 まとめ

KanD2と基質との複合体構造を決定し、基質の認識機構を明らかにすることができた。本研究成果はBiochemistry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.*, *Chem. Rec.* **16**, 4-18 (2016).
- [2] F. Kudo *et al.*, *Biochemistry* (2020) doi: 10.1021/acs.biochem.0c00204.

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