

ポリケタイド合成酵素におけるケト合成酵素様脱炭酸酵素ドメインの構造解析 Structural analysis of ketosynthase-like decarboxylase domain of polyketide synthase

千菅太一, 永井瑛, 宮永顕正*, 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

Taichi CHISUGA, Akira NAGAI, Akimasa MIYANAGA*, 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

微生物が生産するポリケタイド化合物は多様な化学構造と生物活性を有している。ポリケタイド化合物の炭素骨格はポリケタイド合成酵素 (PKS) によって構築される。PKS の大部分を占める I 型 PKS は複数の触媒ドメインからなる巨大タンパク質である。1 回のポリケタイド鎖伸長反応に必要な触媒ドメインのセットはモジュールと定義されている。アシル基転移酵素 (AT) ドメインとケト合成酵素 (KS) ドメインは PKS の反応において中心的な役割を担う触媒ドメインである。AT ドメインはキャリアタンパク質 (CP) ドメインにマロニル型伸長基質を受け渡す反応を触媒する。KS ドメインは上流モジュールからアシル基を触媒残基であるシステイン上に受け取った後に、CP ドメイン上のマロニル型伸長基質との間で脱炭酸を伴った縮合反応を触媒することによりポリケタイド鎖を伸長する。

ケト合成酵素用脱炭酸酵素 (KS_Q) ドメインは I 型 PKS の開始モジュールに広く存在する触媒ドメインであり、KS ドメインと高い相同性を示す。KS_Q ドメインでは、KS ドメインの触媒残基であるシステインがグルタミンに置き換わっていることから、CP に結合したマロニル型基質の脱炭酸反応を触媒すると考えられてきたが、その詳細な機能解析や構造はこれまでに報告されていなかった。

当研究グループでは、放線菌 *Streptomyces graminofaciens* A-8890 が生産するマクロライド系抗生物質 FD-891 の生合成研究を進めてきた。その過程で、I 型 PKS である GfsA の開始モジュールに存在する KS_Q ドメインが CP に結合したマロニル基の脱炭酸反応を触媒することを見出した (図 1) [1]。本研究では、KS_Q ドメインの反応機構に関する知見を得るため、KS_Q ドメインの結晶構造を決定することを目的とした。

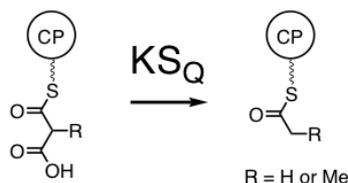


図 1: KS_Q ドメインの反応

2 実験

まず、GfsA KS_Q ドメインと隣接する AT ドメインとの二ドメインの組換えタンパク質を大腸菌にて異種発現させ、精製タンパク質を用いて結晶化を検討した。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、X 線回折測定実験を行った。また、KS_Q ドメインの結晶に、基質アナログであるニトロアセチルパンテテインアミドを浸透させ、ニトロアセチルパンテテインアミドとの複合体結晶を得たのち、同様に X 線回折測定実験を行った。これらの測定データについて、それぞれ分子置換法により位相を決定し、構造を解析した。

3 結果および考察

まず、GfsA KS_Q-AT 二ドメインタンパク質の結晶構造を分解能 2.55 Å にて決定した。KS_Q ドメインはホモ二量体で存在しており、その全体構造は KS ドメインとほぼ同様であった。

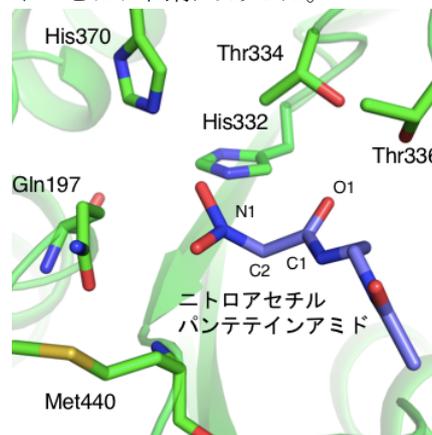


図 2: KS_Q の活性部位の構造

次に、基質アナログであるニトロアセチルパンテテインアミドとの複合体構造を分解能 2.65 Å にて決定した。複合体構造において、ニトロアセチルパンテテインアミドは KS_Q ドメインの活性部位に結合していた (図 2)。ニトロアセチルパンテテインアミドのニトロ基は Gln197、His332、His370 と水素結合を形成しており、アミドカルボニル酸素は Thr334、Thr336 と水素結合を形成していた。これらの相互作用

用によって、ニトロアセチルパンテテインアミド N1-C2-C1-O1 の二面角がほぼ 90° になるように配座が固定されていた。一般に β -ケト酸の脱炭酸反応は、該当する二面角が 90° のときに最大の速度を有することが知られており、基質アナログが脱炭酸反応が進行しやすい配座で結合していることが示唆された。Gln197、His332、His370、Thr334、Thr336 の変異体をそれぞれ作製したところ、脱炭酸活性が完全に消失、あるいは大幅に低下したことから、これらの5つのアミノ酸残基の重要性が示された。

以上の結果から、GfsA KS_Q は活性中心において Gln197、His332、His370、Thr334、Thr336 が基質マロン酸チオエステルの配座を脱炭酸反応が進行しやすい配座で固定することによって、脱炭酸反応を引き起こしていると考えられる。

次に、KS ドメインの反応機構に関して知見を得るため、KS ドメインの構造と比較した。その結果、GfsA KS_Q の Gln197 の側鎖カルボニル酸素は KS 構造中におけるアシル化されたシステイン残基のアシル基カルボニル酸素とほとんど同じ位置にあったことから、GfsA KS_Q の Gln197 は KS ドメインのアシル化されたシステインを模していることが示唆された。その他の活性中心残基 (His332、His370、Thr334、Thr336) についても KS ドメインにおいて高度に保存されており、位置もほとんど一致した。これらのことから、KS ドメインにおいてもほぼ共通の機構で脱炭酸反応が進行している可能性が示唆された。

4 まとめ

I 型 PKS の開始モジュールに広く存在する KS_Q ドメインの結晶構造解析を行った。基質アナログとの複合体構造を決定し、KS_Q ドメインの反応機構に関する知見を得た。本研究成果は *ACS Chem. Biol.* 誌に掲載された [1]。

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] T. Chisuga *et al.*, *ACS Chem. Biol.* 17, 198–206 (2022).

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