

末端ヒドロキサム酸基を合成する酵素の基質認識機構の解明 Substrate recognition mechanism of hydroxyamidotransferase

永田隆平^{1,*}, 葛山智久^{2,*}

¹ 東京大学大学院理学系研究科, 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

² 東京大学大学院農学生命科学研究科, 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

Ryuhei NAGATA^{1,*} and Tomohisa KUZUYAMA^{2,*}

¹Graduate School of Science, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

²Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

1 はじめに

トリコスタチン A (TSA) は、放線菌が生産するポリケタイド化合物で、エピジェネティックな抗がん剤の標的分子であるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の阻害剤として知られる [1]。TSA は、その末端ヒドロキサム酸基を介して活性中心にある亜鉛イオンをキレートすることで、HDAC の働きを阻害する。実際、ボリノスタットやパノビノスタット、ベリノスタットといった抗がん剤にも末端ヒドロキサム酸基は使用されており、最近では末端ヒドロキサム酸基をもつペプチドを使った特定の HDAC のみに働く阻害剤の開発も行われている。

TsnB9 は、放線菌 *Streptomyces* sp. RM72 における TSA 生合成の最後の反応を担う酵素である。この反応では、基質の trichostatic acid (TS acid) のカルボキシ基を ATP 依存的にヒドロキサム酸基に変換する [2]。そのメカニズムはアスパラギン合成酵素の反応とよく似ていると考えられるが、TsnB9 における基質の認識機構は謎のままであった。そこで、本研究では TsnB9 の結晶構造解析を行い、その基質認識機構を明らかにすることを目指した。

2 実験

TsnB9 は C 末端に His タグを付けた形で放線菌 *Streptomyces albus* G153 にて異種発現させ、Ni カラムとゲルろ過カラムによって精製した。タンパク質溶液 [5 mg/mL TsnB9, 2 mM TS acid, 2 mM ATP, 4 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, and 10% (v/v) glycerol] とリザーバー溶液 [30% (w/v) PEG 8,000, 0.2 M ammonium sulfate, 0.1 M sodium cacodylate trihydrate (pH 6.5)] を 1 : 1 で混合し、20°C にてシッティングドロップ蒸気拡散法で結晶化させた (図 1)。得られた結晶を液体窒素で凍結し、Photon Factory AR-NE3A のラピッドアクセスビームタイムを利用して回折データを収集した。

位相の決定は、AlphaFold [3] で作成した TsnB9 の予測構造を用いた分子置換法によって行った。

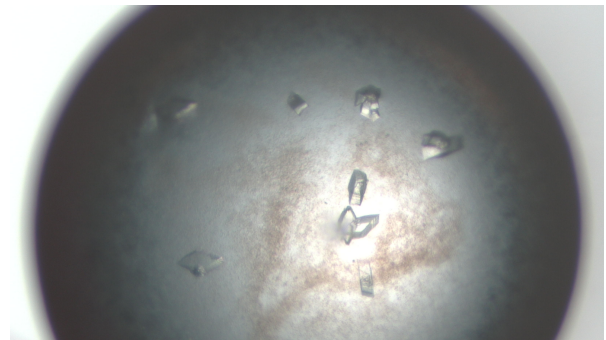


図 1 : TsnB9 結晶の写真。

3 結果および考察

TsnB9 の構造を 2.72 Å 分解能で決定することに成功した。TsnB9 の全体構造は N 末の glutaminase domain と C 末の synthetase domain に分けられ、synthetase domain の一部は結晶構造中ではディスオーダーしていた。また、結晶化は基質の存在下で行ったが、結晶構造では基質 TS acid の電子密度は観察されなかった。

TsnB9 の構造は大腸菌由来のアスパラギン合成酵素 AsnB [4] とよく似ているが (RMSD 2.8 Å)、TsnB9 は AsnB にはない 3 つの挿入領域を有している。挿入領域 I は glutaminase domain にあるが、立体構造的には synthetase domain の一部を形成している。挿入領域 II と III は synthetase domain があり、synthetase domain の一部を形成している。よって、3 つの挿入領域は、TsnB9 の大きな synthetase domain を形作っている。

さらなる詳細な構造比較より、AsnB の synthetase domain における基質結合部位が溶媒に大きく露出しているのに対して、TsnB9 の同じ部位

には挿入領域 I と III によって大きな疎水性ポケットが形成されていることを見出した。この疎水性ポケットの奥には 5 つの芳香族性アミノ酸残基 Phe187, Phe188, Trp351, Trp407, Phe466 が位置しており、基質 TS acid のジメチルアニリン部位を認識すると予想された (図 2)。

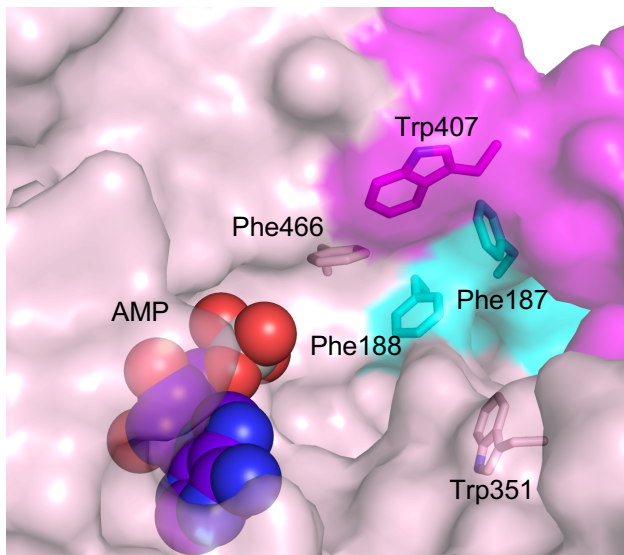


図 2 : TsnB9 の疎水性ポケットの構造。挿入領域 I と III をそれぞれシアンとマゼンタで示す。AMP は AsnB 構造から重ね合わせたものを表示した。

我々は、5 つの芳香族性アミノ酸残基の変異体解析や TsnB9 と基質 TS acid とのドッキングシミュレーションを行い、その結果からこれらの残基が基質認識に重要な残基だと結論づけた。BLAST 検索で見つかる TsnB9 のホモログは、3 つの挿入領域を持つものの、5 つの芳香族性アミノ酸残基を保存していない。そのため、今後ゲノマイニングによって TSA とは異なる HDAC 阻害剤を合成する酵素が見つかる可能性がある。

4 まとめ

本研究では、末端ヒドロキサム酸の合成を担う酵素 TsnB9 の結晶構造を決定し、類縁酵素にはない挿入領域によって大きな疎水性ポケットが形成されていることを明らかにした。そこに位置する 5 つの芳香族性アミノ酸残基は基質の TS acid のジメチルアニリン部位の認識に重要であるため、これらの残基を持たない TsnB9 のホモログ酵素が TSA 以外の HDAC 阻害剤を合成する可能性が示唆された。これらの成果は、*Biochemistry* にて 2023 年に誌上発表した [5]。

謝辞

回折実験でお世話になった Photon Factory のチームラインスタッフの皆様に感謝申し上げます。

参考文献

- [1] Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T. *J. Biol. Chem.*, **265**, 17174-17179 (1990).
- [2] K. Kudo, T. Ozaki, K. Shin-ya, M. Nishiyama, T. Kuzuyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 6799-6802 (2017).
- [3] J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Židek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S. A. A. Kohl, A. J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T. Berghammer, S. Bodenstein, D. Silver, O. Vinyals, A. W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohli, D. Hassabis, *Nature*, **596**, 583-589 (2021).
- [4] T. M. Larsen, S. K. Boehlein, S. M. Schuster, N. G. Richards, J. B. Thoden, H. M. Holden, I. Rayment, *Biochemistry*, **38**, 16146-16157 (1999).
- [5] R. Nagata, M. Nishiyama, T. Kuzuyama, *Biochemistry*, **62**, 1833-1837 (2023).

* unagata.ryuhei@g.ecc.u-tokyo.ac.jp,
utkuz@g.ecc.u-tokyo.ac.jp