

アサ由来ポリケタイド合成酵素のX線結晶構造

岡崎 伸生¹、田口 千穂²、田浦 太志²、玉田 太郎¹、新井 栄揮¹、
正山 祥生¹、正山 征洋²、田中 宏幸²、黒木 良太¹、森元 聡²
(¹原子力機構量子ビーム、²九大薬院)

アサはカンナビノイドと称する特異な二次代謝化合物を生産することが知られている。カンナビノイドに関しては化学的研究や薬理学的研究が詳細に行われる一方、生合成経路についても多くの研究がなされており、ポリケタイドの一種である olivetolic acid (OLA)が、各種カンナビノイドの前駆体であることが報告されている。我々は、アサから2つの新規ポリケタイド合成酵素(Polyketide synthase: PKS)の cDNA クローニングに成功し、各々PKS-1、PKS-2と名付けた。このうちPKS-1は既知の植物PKSと一定のアミノ酸相同性を示したものの、活性部位中に保存されていない残基が存在し、新規なPKS活性を有することが示唆された。よって、アサ由来PKS-1の機能を原子レベルで解明することを目的として、PKS-1のX線結晶構造解析を実施した。

大腸菌を用いた組換えPKS-1の大量発現系を構築した後に精製条件を確立し、最終的に1L培養から約5mgの精製サンプルを得た。引き続き、結晶化スクリーニングおよび条件最適化を行い、異なる2つの晶系の単結晶を得た[1]。放射光施設 Photon Factory BL5A および SPring-8 BL41XU にて回折実験を行い、引き続き既知のPKSの座標を用いた分子置換法による解析の結果、1.55Åの分解能の立体構造解析に成功した。PKS-1は二量体構造を形成しており(図1)、その全体構造は他の構造既知の植物PKSと非常によく似ていた。ところが局所構造に目を転ずると、PKS-1では、植物PKSの活性発現に深く関与することが知られる領域AおよびBのループ構造が他のPKSと比べて大きく変化していることがわかった。

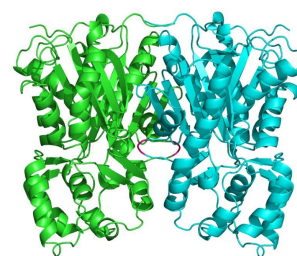


図1 PKS-1の立体構造

また、浸漬法を用いて、PKS-1と基質及び生成物(hexanoyl CoA, malonyl CoA, hexanoyl triacetic acid lactone; HTAL, およびOLA)との複合体4種類の結晶を作製することにも成功し、各々放射光施設において回折実験を行った結果、いずれの結晶についても2.5Åを超える分解能の回折像を得ることができ、このうちPKS-1とhexanoyl CoA, malonyl CoAとの複合体結晶について、結晶構造解析に成功した。その結果、PKS-1は、構造変化した領域Aによって、開始基質であるhexanoyl CoAを認識していることがわかった。またPKS-1の活性部位近辺の空隙には、Ala125、Met187、Leu190、Leu261、Lys301が存在し、その空隙を空間的に狭めていた。この構造的特徴がPKS-1の基質特異性をより厳密にしているのだと考えられた。

[1]. Taguchi, C., Taura, F., Tamada, T., Shoyama, Y., Shoyama, Y., Kuroki, R., Morimoto, S. *Acta Cryst F64*, 217-220 (2008).