T2R2 東京工業大学リサーチリポジトリ
Tokyo Tech Research Repository

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	I型ポリケチド合成酵素におけるケト合成酵素およびケト合成酵素様脱炭酸酵素の機能解析
Title(English)	
著者(和文)	千菅太一
Author(English)	Taichi Chisuga
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12165号, 授与年月日:2022年9月22日, 学位の種別:課程博士, 審査員:江口 正,工藤 史貴,豊田 真司,後藤 敬,大森 建
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12165号, Conferred date:2022/9/22, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

Powered by T2R2 (Tokyo Institute Research Repository)

I 型ポリケチド合成酵素におけるケト合成酵素
およびケト合成酵素様脱炭酸酵素の機能解析

I 型ポリケチド合成酵素 (PKS) に属するモジュール型 PKS はポリケチド天然物の炭素骨格形成反応に関わり、1 回の炭素鎖伸長に関わる触媒ドメインのまとまりであるモジュールが 1 つ以上連なった巨大タンパク質である。モジュール型 PKS の反応において、アシルキャリアタンパク質 (ACP) に結合したポリケチド中間体に対してモジュール内の各触媒ドメインがそれぞれ変換反応を触媒した後に、次のモジュールにポリケチド中間体を受け渡すことを繰り返すことでポリケチド鎖が伸長していく。N 番目のモジュール中のケト合成酵素 (KS_N) ドメインは、その前のモジュールの ACP_{N-1} からポリケチド中間体を触媒残基 Cys 上に受け取った後に、モジュール内のマロン酸類縁体-ACP_N との間で脱炭酸を伴うクライゼン型縮合反応を触媒する。KS ドメインは炭素-炭素結合形成反応を触媒するだけでなくモジュール順番制御を担うと考えられる主要触媒ドメインである。しかし、モジュール順番制御に関わると考えられる ACP_{N-1}–KS_N 間相互作用の詳細と、脱炭酸を伴うクライゼン型縮合の反応機構は未解明である。そこで本研究では、モジュール順番制御に関わる KS ドメインのアシル基転移反応の解析と、脱炭酸過程の反応機構解明に向けてケト合成酵素様脱炭酸酵素 (KS_Q ドメイン) の機能構造解析を行った。

1. KS ドメインのモジュール間アシル基転移反応に関わるタンパク質間相互作用の解析

KS_N ドメインは ACP_{N-1} からのみポリケチド中間体を受け取ることでモジュールの順番を制御していると考えられる。N–1, N 番モジュール間の境界が別々のポリペプチドに分断されている場合、モジュール間アシル基転移反応にはドッキングドメイン (DD) 間の相互作用が重要であるという報告例が複数あるが、ACP_{N-1}–KS_N 間相互作用の重要性を示した研究は一例のみであり一般性があるか不明であった。そこでこの 2 つのタンパク質間相互作用がモジュール間アシル基転移反応に与える影響を評価するため、抗生物質ビセニスタチンの生合成に関わるモジュール型 PKS VinP2 モジュール 4 の KS (KS_4) ドメインを機能解析の対象とした。VinP2 KS_4 ドメインは VinP1 モジュール 3 の ACP (ACP_3) からポリケチド鎖を受け取ると考えられ、VinP2 KS_4 ドメインはその N 末端にドッキングドメイン NDD_4 を、VinP1 ACP_3 は C 末端にドッキングドメイン CDD_3 をそれぞれ有する。まず、VinP1 ACP_3CDD_3 から VinP2 NDD_4KS_4 ドメインへのアシル基転移反応の検出を試みた。

ビセニスタチン生合成において VinP2 KS_4 ドメインが受け取るポリケチド中間体を模したチグリン酸を代替アシル基とし、チグリル-VinP1 ACP_3CDD_3 から VinP2 NDD_4KS_4 へのアシル基転移反応を検出することができた。VinP2 NDD_4KS_4 のアシル基転移反応におけるタンパク質間相互作用について評価するため、VinP1 ACP_3CDD_3 の CDD_3 をなくしたタンパク質や ACP 部分を他のモジュールの ACP に変えたキメラタンパク質でアシル基転移反応を試みた。その結果、VinP2 NDD_4KS_4 は CDD_3 を欠いたチグリル-VinP1 ACP_3 からはアシル基を受け取らず、ACP を変えたキメラタンパク質でもチグリル-VinP1 ACP_3CDD_3 と比べて大幅にアシル基転移活性が低下した。これらの結果は VinP2 KS_4 ドメインのアシル基転移反応において、VinP1 CDD_3–VinP2 NDD_4 間相互作用と VinP1 ACP_3–VinP2 KS_4 ドメイン間相互作用のどちらも重要であることを示唆する。モジュール間アシル基転移反応におけるタンパク質間相互作用の重要性を示した他の報告例と本研究の結果と合わせ、一般にモジュール間アシル基転移反応には 2 つのタンパク質間相互作用である、ACP_{N-1}–KS_N ドメイン間相互作用および CDD_{N-1}–NDD_N 間相互作用が重要であることを示すことができた。

2. ケト合成酵素様脱炭酸酵素 (KS_Q) ドメインの機能構造解析

KS_Q ドメインは KS ドメインとアミノ酸一次配列の高い同一性を有するものの触媒残基 Cys が Gln に置き換わっており、KS ドメイン触媒反応のうちのマロン酸類縁体-ACP の脱炭酸反応のみを触媒すると予想されていた。当研究室では、抗生物質 FD-891 の生合成に関わるモジュール型 PKS GfsA KS_Q ドメインがマロニル-GfsA ACP_L の脱炭酸活性を有することを明らかとしていたが、その反応機構と基質認識機構は未解明であったため GfsA KS_Q ドメインの機能構造解析に取り組んだ。GfsA KS_Q ドメインの X 線結晶構造解析を検討した結果、基質のマロン酸パンテテインチオエステル部を模したリガンドが活性中心に結合した複合体構造の決定に成功した。このリガンドの結合様式をもとに GfsA KS_Q ドメインの反応機構を以下のように推定した。基質のマロン酸チオエステル部分は Gln197, His332, Thr334, Thr336, His370 との水素結合により脱炭酸に適した配座で固定され、脱炭酸反応が促される。生じたエノラートは Thr334 と Thr336 の側鎖水酸基との水素結合で安定化され、His332 からプロトンを奪うことで生成物となる。KS ドメインでは、これらアミノ酸残基のうち KS 触媒残基 Cys が置き換わった Gln197 を除いて全て保存されており、本推定反応機構と類似した機構で KS ドメインの脱炭酸過程が触媒されることが示唆される。

次に基質マロニル-GfsA ACP_L の ACP_L 部分に対する基質認識について知るため、GfsA KS_Q ドメイン–ACP_L クロスリンク複合体の構造解析を試みた。クロロアセチルパンテテインアミドプローブで修飾した *crypto*-GfsA ACP_L と、GfsA KS_Q ドメインの Q197C 変異体を反応させて得られたクロスリンク複合体の結晶構造解析に成功し、GfsA ACP_L はその Helix 2 と Loop 1 が GfsA KS_Q ドメインおよび KS_Q–隣接ドメイン間のリンカー領域と相互作用することで認識されることが示唆された。

以上本研究では、VinP2 KS_4 ドメインの機能解析によりモジュール間アシル基転移反応におけるタンパク質間相互作用の重要性を示した。さらに GfsA KS_Q ドメインの機能構造解析によりその基質認識機構を詳細に解明し、KS ドメインにも通ずると期待される推定反応機構を提唱した。これらの知見はモジュール型 PKS KS ドメインの完全な機能解明に繋がる重要な知見となると考えられる。