慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

| | |
|---|---|
| Title | ポリケチド合成酵素の動的構造と機能相関の解明 |
| Sub Title | Structural analysis of a modular polyketide synthase module |
| Author | 湯澤, 賢(Yuzawa, Satoshi)<br>葛山, 智久( Kuzuyama, Tomohisa)<br>新家, 一男( Shin'ya, Kazuo)<br>藤吉, 好則( Fujiyoshi, Yoshinori)<br>清水, 伸隆( Shimizu, Nobutaka) |
| Publisher | |
| Publication year | 2021 |
| Jtitle | 科学研究費補助金研究成果報告書 (2020. ) |
| JaLC DOI | |
| Abstract | 本研究では、小角X線散乱法（SAXS）やクライオ電顕顕微鏡を利用したモジュラーポリケチド合成酵素（モジュラーPKS）の構造解析に加えて、生化学をベースにした新たな構造解析手法の開発を試みた。生化学的な構造解析手法に関しては現在まだ開発中であるものの、SAXS解析によってNature誌に発表されたアーチ型の構造モデルとは異なるX型の構造を支持する結果が得られた。今後も多角的な視点から引き続き本研究を進め、信頼できるモジュラーPKSの構造を世界に先駆けて提示したい。<br>Here we proposed to characterize a protein shape(s) of modular polyketide synthases using small-angle X-ray scattering (SAXS), cryo-electron microscopy, and a biochemical assay that has not been applied to modular PKSs. Although biochemical characterization of the structure is still ongoing, our SAXS data indicates that each module of modular PKSs forms a X-shape structure, which challenges the current arched shape model reported in Nature. We will continue to analyze a PKS structure to provide an accurate structural model to our research community. |
| Notes | 研究種目：研究活動スタート支援<br>研究期間：2019～2020<br>課題番号：19K23659<br>研究分野：生化学、合成生物学、構造生物学 |
| Genre | Research Paper |
| URL | https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_19K23659seika |

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　 ６ 月 １０ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2019～2020
課題番号：１９Ｋ２３６５９

研究課題名（和文）ポリケチド合成酵素の動的構造と機能相関の解明

研究課題名（英文）Structural analysis of a modular polyketide synthase module

研究代表者
湯澤　賢（YUZAWA, Satoshi）

慶應義塾大学・政策・メディア研究科（藤沢）・特任講師

研究者番号：２０８４３８９０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、小角X線散乱法（SAXS）やクライオ電顕顕微鏡を利用したモジュラーポリケチド合成酵素（モジュラーPKS）の構造解析に加えて、生化学をベースにした新たな構造解析手法の開発を試みた。生化学的な構造解析手法に関しては現在まだ開発中であるものの、SAXS解析によってNature誌に発表されたアーチ型の構造モデルとは異なるX型の構造を支持する結果が得られた。今後も多角的な視点から引き続き本研究を進め、信頼できるモジュラーPKSの構造を世界に先駆けて提示したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義
モジュラーポリケチド合成酵素（モジュラーPKS）は現在広く普及している抗生物質や免疫抑制剤の生合成に関わっているが、そのタンパク質構造に関しては未解明な部分が多い。本研究では、様々な構造解析手法によってモジュラーPKSのタンパク質構造を明らかにすることを目的とした。本研究期間ではモジュラーPKSの立体構造を紐解くヒントとなるような成果が得られた。今後もさらに解析を続け、我が国から革新的な成果を発信したい。

研究成果の概要（英文）：Here we proposed to characterize a protein shape(s) of modular polyketide synthases using small-angle X-ray scattering (SAXS), cryo-electron microscopy, and a biochemical assay that has not been applied to modular PKSs. Although biochemical characterization of the structure is still ongoing, our SAXS data indicates that each module of modular PKSs forms a X-shape structure, which challenges the current arched shape model reported in Nature. We will continue to analyze a PKS structure to provide an accurate structural model to our research community.

研究分野：生化学、合成生物学、構造生物学

キーワード：ポリケチド合成酵素　X線小角散乱法　クライオ電子顕微鏡

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

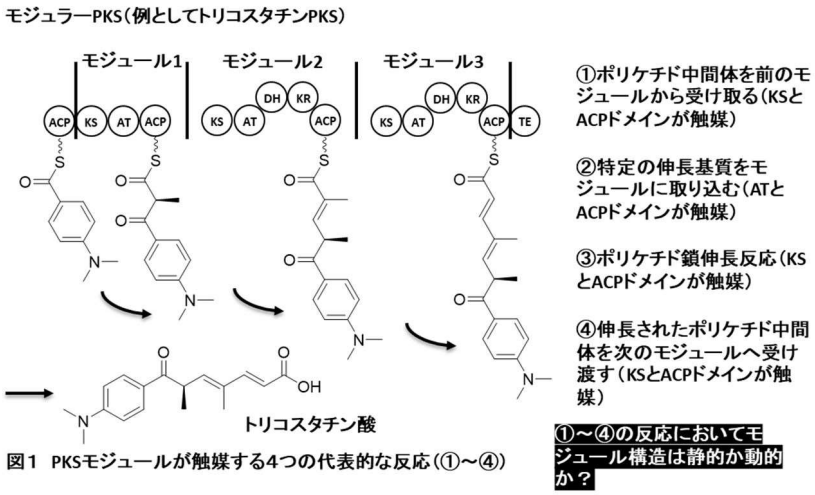

図１　PKSモジュールが触媒する4つの代表的な反応（①～④）

モジュラーポリケチド合成酵素（モジュラーPKS）は複数のモジュールからなる超巨大酵素であり、様々な生理活性物質の生合成を担っている。各モジュールは3-6 種類のタンパク質ドメインによって構成され、ポリケチド鎖伸長反応を通常一回のみ触媒する。最小のモジュールはケトシンターゼ（KS）、アシルトランスフェラーゼ（AT）、アシルキャリアープロテイン（ACP）からなる（図１のモジュール１）。加えて、ケトリダクターゼ（KR）、デヒドラターゼ（DH）、エノイルリダクターゼ（ER）が各モジュールに存在する場合があり、伸長されたポリケチド主鎖が修飾される場合がある（図１のモジュール２や３）。

各モジュールでは少なくとも４つの化学反応が触媒され、いずれも KS、AT、ACP の３つのドメインの異なる組み合わせによって行われる（図１）。これらの反応において各ドメインがどのような空間的配置を取り、どの界面を利用して相互作用するか、またその際モジュールの立体構造は静的なのか動的なのかは依然として未解明な点が多い。

２．研究の目的

2014 年、米国のミシガン大学の研究チームが *Nature* 誌にピクロマイシン PKS のモジュール 5 のモデル構造が発表した [1, 2]。当該研究ではクライオ電子顕微鏡による単粒子解析が初めてモジュラーPKS の構造解析に利用された。ACP に結合するポリケチド中間体の構造が変化することで ACP ドメインがモジュール内をダイナミックに移動したり、モジュール内の反応に応じて各ドメインの空間的配置が変化するなど、これまでの予測を裏付けるようなセンセーショナルなデータが発表された。一方で 7Å 以上という低い分解能のデータから構造が類推されたためか過去の構造生物学的および生化学的な解析と矛盾する点が散見されたことも事実であり、著者らも論文内で認めている。一方で米国のスタンフォード大学の研究グループは、2018 年に X 線小角散乱法（SAXS）を利用したエリスロマイシン PKS のモジュール 2 の解析を *Journal of the American Chemical Society* 誌（*JACS* 誌）に発表した。興味深いことに、上記 *Nature* 誌とは異なるモデル構造が提案されている [3]。したがって、どちらのモデル構造がより実態を反映しているのか、あるいはどちらも正しい結果なのか現時点で判断するのは非常に難しい。そこで、本研究では図１のトリコスタチン PKS のモジュール３の生化学的・構造生物的解析を通じて既存の構造モデルを精査し、PKS モジュールの正確な構造を我が国から初めて発信することを目的としている。

３．研究の方法

以下の３つの研究計画を実施して、モジュラーPKS のモジュール構造の実態に迫った。

(1) トリコスタチン PKS のモジュール 3 の *in vitro* 反応解析
(2) トリコスタチン PKS のモジュール 3 の SEC-SAXS による構造解析
(3) トリコスタチン PKS のモジュール 3 のクライオ電子顕微鏡による単粒子解析

４．研究成果

(1) トリコスタチン PKS のモジュール 3 の *in vitro* 反応解析

トリコスタチンの生合成経路はつい最近まで不明であったが、トリコスタチン生産菌である *Streptomyces sp.* RM72 のゲノム解析によって、モジュラーPKS によってトリコスタチンが生合成されることを東京大学の研究チームが 2017 年に明らかにした [4]。我々はまず *S. sp.* RM72 のゲノムからトリコスタチン PKS のモジュール３を pET 系のベクターにサブクローニングし、大腸菌によるタンパク質生産を試みた。また、生産されたモジュール 3 をホロ化するために *Streptomyces avermitilis* 由来の pptA2 遺伝子も共発現できるように実験系を組んだ。トリコスタチン PKS のモジュール 3 と pptA2 の遺伝子を導入した大腸菌を培養した結果、可溶性画分にモジュール 3 が生産されることを確認した。また不溶性画分にはほとんどモジュール 3 は見られず、大腸菌内で大部分のタンパク質が適切に折り畳まれたことを示唆する結果となった。

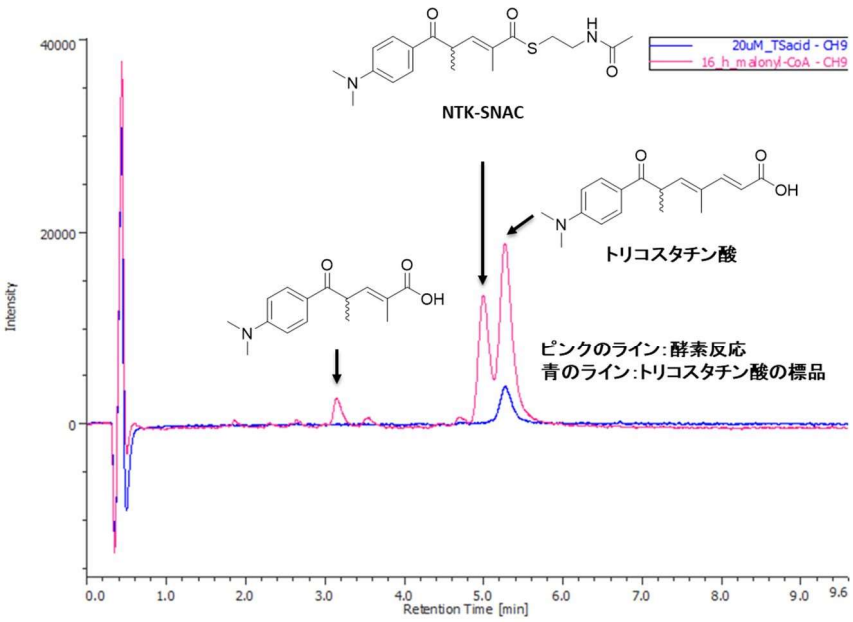


図2 トリコスタチン酸の*in vitro*生産

Ni-NTA アフィニティーカラムにより精製後、*in vitro* で酵素反応を行った。トリコスタチン PKS のモジュール 3 は開始基質としてモジュール 2 の酵素産物を利用する（図 1）。そこで、モジュール 2 の酵素産物を模した化合物（NTK-SNAC）を開始基質として利用し、伸長基質のマロニル CoA および NADPH を精製したモジュール 3 に加えた。その結果、トリコスタチン酸の生産を確認した（図 2）。この結果は pptA2 によってモジュール 3 がホロ化されたことも実証した。この反応系を利用して温度やイオン強度、pH を変えて酵素反応速度を評価した。その結果、モジュール 3 の活性は温度変化（15-37℃）にはあまり影響をうけなかったが、イオン強度（28-989 mM）や pH（6.0-8.0）によっては不活化（あるいはほぼ不活化）することが示された。これらの結果は構造解析の測定条件によって、モジュール構造が変化する可能性を示唆しており、これまで異なる複数のモジュール構造が発表されている要因の 1 つである可能性が示された。

(2) トリコスタチン PKS のモジュール 3 の SEC-SAXS による構造解析

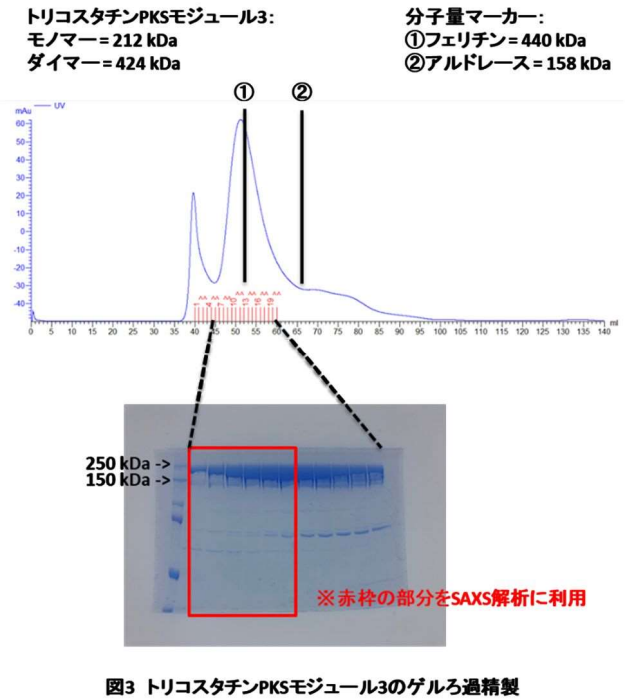


図3 トリコスタチンPKSモジュール3のゲルろ過精製

トリコスタチン PKS のモジュール 3 を Ni-NTA アフィニティーカラムにより精製後、さらにゲルろ過（Size Exclusion Chromatography = SEC）で精製した際のデータを図 3 に示した。トリコスタチン PKS のモジュール 3 ゲルろ過精製は、上記 *Nature* 誌とほぼ同一条件で行っている [1]。モジュラーPKS はホモダイマーで機能することが知られている。分子量マーカーと比較した結果、トリコスタチン PKS のモジュール 3 はホモダイマーを形成することが確認できた。ホモダイマーの場合分子量は 424000 となるが、興味深いことに、フェリチン（=4400000）よりもよりも早くゲルろ過カラムから溶出された。ゲルろ過精製では、大きな分子の方が早く溶出されるため、一見矛盾する結果のようにも見える。我々はこの結果を分子の形状の違いによるものであると考えている。フェリチンは球状であるが、モジュールの構造はどちらかと言えば平らな構造であることが、上記 *Nature* 誌と *JACS* 誌いずれからも推測できる。つまり、回転半径で言えばフェリチンよりも大きな分子と言え、その結果を反映したものであると考えている。

SEC-SAXS によるトリコスタチン PKS のモジュール 3 の測定をこれまで複数回行った。SEC-SAXS とは、ゲルろ過で精製したタンパク質を再度ゲルろ過し、カラムから溶出された直後に X 線を当て、SAXS による構造解析をする手法である。これまでタンパク質濃度、バッファー条件、グリセロール濃度など様々な条件下で測定を試み、一定の成果を得たので図 4 にそのデータを示した。実測値が黒い点で表されており、赤いラインは図の中のモデル構造から類推した SAXS データの予測値である。このモデル構造は X 型の構造と呼ばれ、上記 *JACS* 誌で提案された構造を支持する結果である。一方で上記 *Nature* 誌で提案されたアーチ型の構造から理論曲線を描いた場合は大きなずれが生じた。したがって、トリコスタチン PKS のモジュール 3 の立体構造

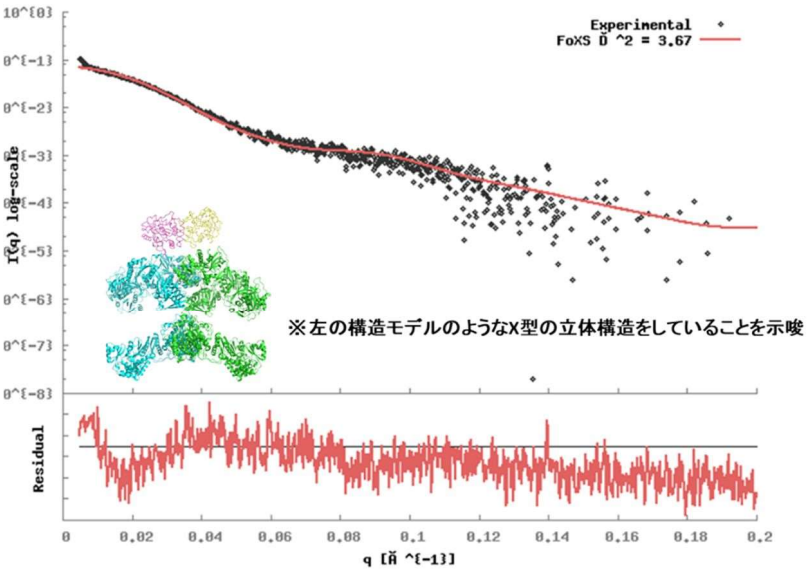


図4 トリコスタチンPKSモジュール3のSEC-SAXS解析

は上記 *Nature* 誌とは異なる可能性が高く、今後さらなる研究を進めるべきであると考えている。SEC-SAXS の専門家からは、論文として発表するためにはさらにデータの質を向上させる必要があるだろうとアドバイスを得ているので、引き続き今後の課題として取り組む予定である。また、上記 *JACS* 誌は SEC-SAXS 測定、上記 *Nature* 誌はクライオ電子顕微鏡によって構造を類推しているので、測定法による違いによって異なる構造が得られている可能性も否定できない。そこで、以下の③の測定結果も踏まえながら、モジュラーPKS の正確なモジュール構造に関してより深い考察をできればと考えている。

(3) トリコスタチン PKS のモジュール 3 のクライオ電子顕微鏡による単粒子解析

②の SEC-SAXS 解析と同様に精製したタンパク質溶液を用いて、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析をこれまで複数回試みた。タンパク質濃度、バッファー条件、グリセロール濃度など様々な条件下で測定を試みたが、これまで単粒子解析に利用できるクオリティーの電子顕微鏡画像は得られていない。タンパク質によっては測定時に薄膜を形成する際に変性する可能性があると専門家からコメントを得ており、トリコスタチン PKS のモジュール 3 はクライオ電子顕微鏡の測定条件にうまく適応させれない可能性が出てきた。引き続き解析を進めたいと考えているが、標的 PKS モジュールを変更することも視野に入れ今後も研究を進めたいと考えている。

＜引用文献＞

1. Dutta, S.; Whicher, J. R.; Hansen, D. A.; Hale, W. A.; Chemler, J. A.; Congdon, G. R.; Narayan, A. R.; Hakansson, K.; Sherman, D. H.; Smith, J. L.; Skiniotis, G., Structure of a modular polyketide synthase. *Nature* **2014,** *510* (7506), 512-7.

2. Whicher, J. R.; Dutta, S.; Hansen, D. A.; Hale, W. A.; Chemler, J. A.; Dosey, A. M.; Narayan, A. R.; Hakansson, K.; Sherman, D. H.; Smith, J. L.; Skiniotis, G., Structural rearrangements of a polyketide synthase module during its catalytic cycle. *Nature* **2014,** *510* (7506), 560-4.

3. Li, X.; Sevillano, N.; La Greca, F.; Deis, L.; Liu, Y.-C.; Deller, M. C.; Mathews, I. I.; Matsui, T.; Cane, D. E.; Craik, C. S.; Khosla, C., Structure-Function Analysis of the Extended Conformation of a Polyketide Synthase Module. *Journal of the American Chemical Society* **2018,** *140* (21), 6518-6521.

4. Kudo, K.; Ozaki, T.; Shin-Ya, K.; Nishiyama, M.; Kuzuyama, T., Biosynthetic Origin of the Hydroxamic Acid Moiety of Trichostatin A: Identification of Unprecedented Enzymatic Machinery Involved in Hydroxylamine Transfer. *J Am Chem Soc* **2017,** *139* (20), 6799-6802.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計0件

〔図書〕　計1件

| | |
|---|---|
| １．著者名<br>Hung-Wen (Ben) Liu and Tadhg P. Begley (ed.), Satoshi Yuzawa and Tomohisa Kuzuyama | ４．発行年<br>2020年 |
| ２．出版社<br>Elsevier | ５．総ページ数<br>4238 |
| ３．書名<br>Comprehensive Natural Products III, Volume 1, 1.05 - Engineering of Acyltransferase Domains in Polyketide Synthases | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

６．研究組織

| | 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号） | 備考 |
|---|---|---|---|
| 研究協力者 | 葛山　智久<br>(Kuzuyama Tomohisa)<br>(12601) | 東京大学・応用生命工学専攻・教授 | |
| 研究協力者 | 新家　一男<br>(Shin-ya Kazuo)<br>(82626) | 国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・研究グループ長 | |
| 研究協力者 | 藤吉　　好則<br>(Fujiyoshi Yoshinori)<br>(12602) | 東京医科歯科大学・高等研究院卓越研究部門・特別栄誉教授 | |
| 研究協力者 | 清水　伸隆<br>(Shimizu Nobutaka)<br>(82118) | 大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・教授 | |

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
| --- | --- |