

論文内容の要旨

糸状菌 *Aspergillus terreus* 由来

6-メチルサリチル酸合成酵素 ATX の機能解析

森 口 智 美

【背景】

糸状菌の生産するポリケタイド化合物には、ロバスタチンやグリセオフルビンなど、興味深い構造や生理活性を示す化合物が多く含まれる。その基本炭素骨格となるポリケトメチレン鎖の伸長を担うポリケタイド合成酵素 (PKS) は、一本のポリペプチド上に反応に必要な触媒ドメインを全て持つ多機能型酵素で、各ドメインが繰返して反応に関与する **iterative PKS (iPKS)** である。iPKS は一つの酵素で多段階の反応を触媒でき、その生成物の構造が多様であることから、その酵素特異的な反応制御機構の解明は、酵素を用いた物質生産に大きく貢献すると考えられる。しかし、iPKS の反応制御機構については、未解明な点が多く残されている。そこで、本研究では、iPKS 産物の中で最も単純な構造を持つ 6-メチルサリチル酸 (6-MSA) を合成する酵素 (MSAS) で、iPKS の中でも分子量が最小である、*Aspergillus terreus* 由来 ATX の反応制御機構および、立体構造の解明を目指した。

ATX は、縮合酵素 (KS)、アシル基転移酵素 (AT)、アシルキャリアープロテイン (ACP) の他、ケト還元酵素 (KR)、脱水酵素 (DH)

A. terreus ATX (1803 aa)

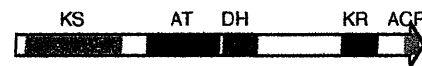


Fig. 1 Domain Architecture of ATX

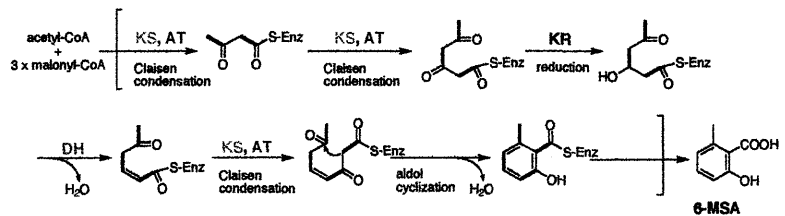


Fig. 2 Proposed Reaction Mechanisms of ATX

の各触媒ドメインを持つと考えられていた。(Fig.1) このドメイン構成から、ATX は、2段階の縮合反応による C6 中間体の形成、還元、脱水、もう一段階の縮合反応による C8 中間体の形成という一連の反応を触媒すると提唱されていた。この反応スキームでは、酵素にチオエステル結合した C8 中間体が、6-MSA として酵素から遊離する反応は非触媒的に起こることになる (Fig. 2)。しかし、化学的にも、他の酵素との比較からも、酵素結合型中間体がカルボン酸として酵素から遊離するには、チオエステラーゼの関与が必要である。よって、ATX にも 6-MSA の遊離に関わる未同定の触媒ドメインが存在すると考えられた。

ここで、提唱されていた反応メカニズム中、中間体の脱水は必須ではないと考えられた。他酵素の反応において、2級の水酸基が芳香環化に伴い、非触媒的に脱水する例が報告されている。つまり、6-MSA 合成過程中、還元により生じた水酸基は、脱水されずに次の伸長反応の基質となり、水酸基を持った C8 中間体の芳香環化に伴う、非触媒的な脱水が起こると考えられた。これまで ATX の DH と考えられていたドメインは、既知の DH に高く保存されている活性中心 His を含む HxxxGxxxxP 配列を持つものの、ドメイン全体の相同性はほとんどない。もし、このドメインが中間体の脱水ではなく 6-MSA の遊離に関わるのであれば、矛盾が解消する。

以上のことから、ATX の、これまで脱水酵素と考えられていたドメイン、以下、DH 様ドメインが、6-MSA の遊離に関与する可能性について検討することとした。

【方法・結果】

1. 活性 ATX タンパクの大量調製と *in vitro* アッセイ

本検討では、ATX を大腸菌で発現させ、精製 ATX を用いた *in vitro* 実験を行うこととした。発現にあたり、反応の足場である ACP をホスホパンテテイル化してホロ型とする酵素 *Bacillus subtilis* 由来 SFP を共発現させた (Fig. 3)。

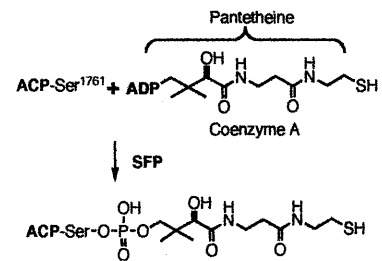


Fig. 3 Phosphopantetheinylation of ACP

大腸菌体内では ATX の反応基質が供給されることから、ATX が活性型として発現すれば、菌体内で 6-MSA が生成するはずである。そこで、まず ATX、SFP 共発現用プラスミド pET-atX/sfp で形質転換した大腸菌の 6-MSA 生産を確認した。誘導培養後の形質転換体培養液を塩酸酸性下酢酸エチル抽出すると、培養液 1 L あたり 1.5 mg の 6-MSA の生成が確認された。このことから、大腸菌を宿主とした活性 ATX の発現が可能であることが示された。また、同じ系を用い、C 末端に His₁₀ タグを付した ATX が 6-MSA 合成活性を有することも確認した。次に、タグを付した ATX のアフィニティークラム (IMAC) 精製を試みた。すると、形質転換体の誘導培養液 1 L あたり 1 mg の精製 ATX が得られた。さらに、精製 ATX の *in vitro* 活性を検討した。精製 ATX を、acetyl-CoA、[2-¹⁴C]malonyl-CoA、NADPH と反応させた後、反応液の塩酸酸性酢酸エチル抽出物を薄層クロマトグラフィー (TLC) 分析した。すると、抽出物中に 6-MSA が検出

された。このことから、ATXが *in vitro* でも 6-MSA を生成することを確認した。

2. DH 様ドメイン変異体 (DHm) への中間体の結合

「DH 様ドメインが 6-MSA の遊離に関与する」という仮定を検証するにあたり、まず、DH 様ドメインが 6-MSA 生成に関与しているかを確認することとした。そのために、HxxxGxxxP 配列の His を Ala に変異させた変異体 DHm (H972A) の活性を調べた。野生型 ATX と同じ条件で酵素反応を行ったところ、精製 DHm による 6-MSA 合成は検出されなかった。このことから、His⁹⁷² の関与する DH 様ドメインによる触媒反応が、6-MSA 合成過程において必須であることを確認した。

次いで、上記の仮定が正しければ、DHm には遊離できない反応中間体が結合したままであると考えられたことから、野生型 ATX と DHm を、[2-¹⁴C]malonyl-CoA を含む基質混合液とそれぞれ反応させ、反応後の各酵素が ¹⁴C 標識されるかどうかを SDS-PAGE 解析した。

CBB 染色により各酵素のバンドを確認後 (Fig. 4 left)、同じゲルをオートラジオグラフィ解析すると、野生型 ATX は ¹⁴C 標識されず、DHm のみ ¹⁴C 標識されていた

(Fig. 4 right)。この結果から、DH 様ドメインが機能しないと 6-MSA は遊離せず、反応中間体は酵素に結合したままとなることが明らかとなった。

3. DHm に結合した中間体の加水分解

反応中間体は、DHm の ACP 上ホスホパンテイル基にチオエステル結合していると考えられた。チオエステルは、アルカリ性条件下で加水分解される。よって、前述の仮定が正しければ、DHm に結合した中間体はテトラケタイドであり、基質と反応後の DHm をアルカリ加水分解処理することで、6-MSA が遊離すると考えられた。そこで、[2-¹⁴C]malonyl-CoA を含む反応基質と反応後の DHm をアルカリ処理した。まず、基質と反応後の DHm 溶液から未反応基質や生成物等の低分子化合物を除いた後、その溶液に、酵素の高次構造を崩すためのβ-メルカプトエタノールを加え、液性を NaOH で強アルカリ性として 5 分間煮沸することで、中間体を結合した DHm の加水分解反応を行った。反応後、溶液を塩酸性下酢酸エチル抽出し、抽出物を TLC 分析すると、6-MSA が検出された (Fig. 5 lane 1)。

この結果から、DHm に結合した中間体はテトラケタイドであり、ATX の反応において DH 様ドメインの関与なしにテトラケタイド中間体の形成まで反応が進行することが明らかに

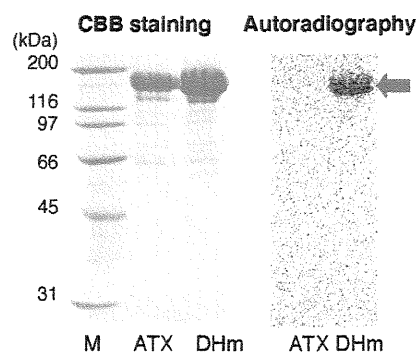


Fig. 4 SDS-PAGE Profiles of ¹⁴C Labeled Protein

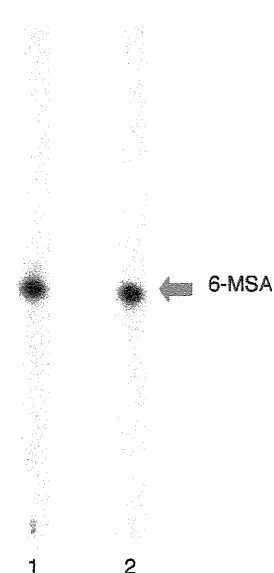


Fig. 5 Chemical and Enzymatic Hydrolysis of DHm - Intermediate

なった。さらに、野生型 ATX の持つ活性 DH 様ドメインが、DHm 上のテトラケタイド中間体を 6-MSA として遊離する反応を触媒することを確認するため、低分子化合物を除いた後の DHm 溶液に野生型 ATX 溶液を加え、酵素反応を行った。すると、反応後の酢酸エチル抽出物中から、アルカリ加水分解により生じた 6-MSA と等量の 6-MSA が検出された (Fig. 5 lane 2)。この結果により、DH 様ドメインは、アルカリ加水分解と等価な加水分解反応を触媒するチオエステラーゼ (TE) 活性を有することを証明した。

4. 酵素結合型中間体の模倣体の合成と酵素との反応

DH 様ドメインの TE 活性の動的パラメーターを求めるために、ACP のホスホパンテテイル基結合型中間体の模倣化合物として、6-MSA のカルボン酸に *N*-アセチルシステアミンをチオエステル結合させた 6MSA-SNAC を合成し、野生型 ATX と反応させた。ATX が時間、酵素濃度依存的に 6MSA-SNAC を加水分解し 6-MSA を遊離した一方、DHm による加水分解反応は全く観測されなかった (Fig. 6)。

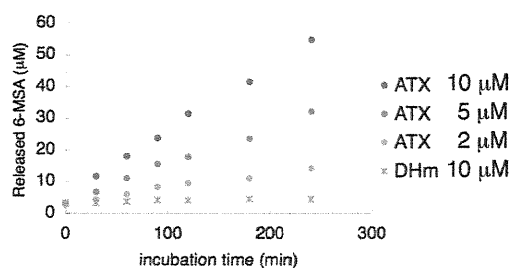
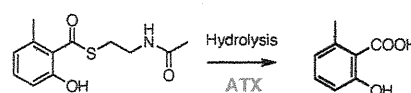


Fig. 6 Hydrolysis of 6MSA-SNAC Catalyzed by ATX

反応の動的パラメーターは、 $K_m=12.3 \text{ mM}$, $k_{cat}/K_m=0.12 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ であった。この値は、ポリケタイド化合物の合成に関わる既知の TE と比較して、ほぼ同程度であった。

しかし、この DH 様ドメインの反応メカニズムは、既知の TE とは大きく異なると思われる。既知の TE の大半は、His に活性化された Ser の求核攻撃により Ser 結合型となった反応中間体が、水分子や水酸基に求核攻撃されるというメカニズムで反応する。故に、それらは Ser 特異的修飾剤である PMSF により阻害される。しかし、ATX の TE 活性は PMSF 存在下でも全く阻害されない。さらに、他の TE に高く保存されている活性中心 Ser を含む GxSxG 配列も見出されない。これらのことから、ATX の DH 様ドメインは、His⁹⁷² を塩基として用い、ACP 結合型中間体をそのまま加水分解することが強く示唆される (Fig. 7 a, b)。このようなメカニズムで加水分解反応を触媒すると考えられる TE は、本酵素が初めての例である。

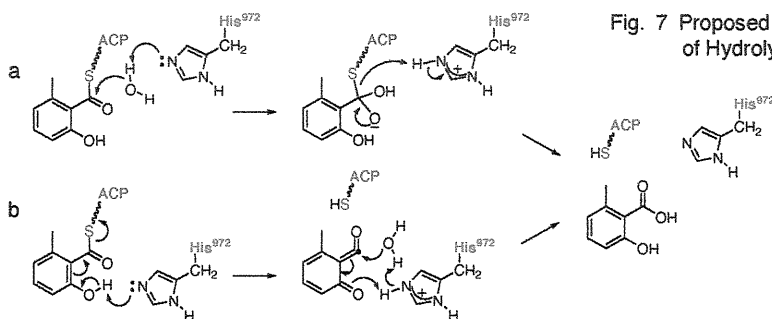


Fig. 7 Proposed Reaction Mechanisms of Hydrolysis Catalyzed by ATX

5. DHを含むモノドメイン酵素の発現

ATXのDH様ドメイン領域は、これまでに機能同定されたTEと一次構造上の相同性はほとんどない。そこで、この領域のX線結晶構造解析を試みることにした。まず、DH様ド

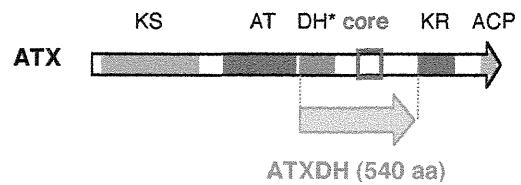


Fig. 8 Construction of ATXDH

メインと、その下流のATXが高次構造をとるために必要なcore領域を併せ持つ、ATXDHを大腸菌にて発現させた (Fig. 8)。N末端にHis₆タグを付したATXDHが、IMAC精製され、さらに、精製ATXDHは時間依存的に6MSA-SNACから6-MSAを遊離した。このことから、ATXDHはTE活性を持つ部分タンパクとして発現したことが示された。現在、イオン交換カラム、ゲル濾過カラムに供して精製したATXDHについて、結晶化条件の検討中である。

【まとめ】

本研究において、脱水酵素だと考えられてきたATXのDH様ドメインが、ACP上に結合したテトラケタイド中間体を6-MSAとして遊離するTEであることを証明した (Fig 9)。このTEは、反応にSerが関与せず、ACP結合型中間体を直接遊離するTEとして初めて確認されたものである。また、既知のTEドメインは、多機能型酵素のC末端に存在するものに限られており、本酵素のように多機能型酵素ポリペプチド鎖の中心に位置するTEは初めての例である。DHとTEは高次構造上の分類から大部分がHot-Dog Foldファミリーに属するという共通点があるが、DH様の活性中心配列を持ちながら、TE活性を持つ酵素は他に例を見ない。

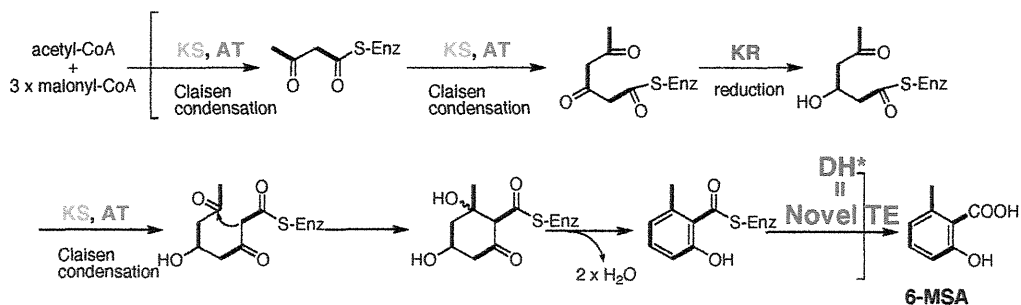


Fig. 9 Identified Role of DH-like Domain as Thioesterase

糸状菌由来iPKSは、1つの酵素上の複数の触媒ドメインが多段階の反応を制御し、複雑な化合物を生成するが、その機構の全貌は未だ解明されていない。本研究では、そのうちの1つの触媒ドメインが触媒する反応について、*in vitro*での実験により、これまでのアミノ酸配列情報から予測された触媒能DHを否定し、TEとしての機能を定量的に解析した。このことは、iPKS反応制御機構の解明に向けた大きな進歩である。今後、他のiPKSについても、それぞれのドメインが触媒する反応の詳細を解明していきたい。