# The carbohydrate tail of landomycin A is responsible for its interaction with the repressor protein LanK The FEBS Journal (2022)

Atsushi Tsugita, Shiro Uehara, Takashi Matsui, Takeshi Yokoyama, Iryna Ostash, Maksym Deneka, Subbarao Yalamanchili, Clay S. Bennett, Yoshikazu Tanaka and Bohdan Ostash

#### ■ Summary

Landomycin A (LaA) は、アングサイクリン系抗 生物質の1つで、強い抗腫瘍活性を持つため、抗 がん剤としての応用が期待されている。 Streptomyces cyanogenus S136は、アグリコンに デオキシ糖を順番に付加することで、最終的に LaAを生合成する(図1(A))。このLaA生合成 経路において、TetR型転写調節因子であるLanK は、H+トランスポーターであるLanJの転写を制御す る(図1(B))。これにより、最終生成物である LaAが細胞内で十分に蓄積されるまで、ランドマイ シンの細胞外輸送は抑制される。3つ以上の糖 鎖を持つランドマイシンは、LanKのエフェクター分子 として機能することが分かっていたが、どのようにして、 LanKが最終生成物であるLaAとランドマイシン中 間体を区別するか、正確なメカニズムは分かってい なかった。



図1 (A) ランドマイシンの化学構造。アグリコンに6, 3, 2糖が 付加された化合物がそれぞれ、landomycin A (LaA), LaE, LaDと呼ばれる。(B) LanKによるランドマイシンの膜外輸送と その生産の調節。LanKが、lanK-lanJプロモーター領域に結 合することで、LanKとLanJの転写は制御される。リガンドの 結合によって、LanKはDNAを放出する。

アポ体のLanKとLanK-LaA複合体の結晶構造と、ランドマイシン中間体(LaA、LaE、 LaDおよび6糖と3糖の合成糖鎖)とのゲルシフトアッセイの結果、LaAの糖鎖部分のみ

### ■LaA結合に重要な残基は、トンネル入り口付近に存在する

LaA結合部位周辺の23残基をアラニンに置換した変異体を作製し、EMSAにより DNA結合活性を比較した(表1および図5)。その結果、変異体は4つのグループに 分類された。グループ1(L115AとR116)は、LaA非存在下でも、DNA(lanKjp)に 結合しない変異体で、これらの残基は、LanKが本来持っているDNA結合能に重要な 役割を担っていると思われる。グループ2の変異体(G132A、Y136A、S149A、 L152A)は、LaA存在下でもDNAを遊離しなかった。グループ3 (M108A、N125A、 I128A、F160A)は、DNA-LanK複合体の新しいバンドによって示されるように、LaAと 不完全に結合した。グループ4 (T117A、G119A、I120A、G121A、L124A、E133A、 D138A、Q145A、H156A、F157A、F161A、I165A、E166A)は、EMSAで野生型 LanKと同様な挙動を示す変異体であった。

rotein <sup>a</sup>	LanK– <i>lanKJp</i> interaction <sup>b</sup>	<i>lanKJp</i> release in the presence of landomycin A (LaA)	Role of the mutated residue according to structural data
anK <sup>w⊤</sup>	+	+	
1108A	+	Partial; new shifted band occurs <sup>c</sup>	Recognises 5 <sup>th</sup> sugar of LaA
115A	_	Could not be tested	Interaction between protomers
116A	_	Could not be tested	Interaction between protomers
117A	+	+	Unknown
119A	+	+	Unknown
20A	+	+	Unknown
121A	+	+	Unknown
124A	+	+	Unknown
125A	+	Partial; new shifted band occurs	Recognises 5 <sup>th</sup> sugar of LaA
28A	+	Partial; new shifted band occurs	Recognises 2 <sup>nd</sup> and 5 <sup>th</sup> sugars o
132A	+	-	Unknown
133A	+	+	Unknown
136A	+	-	Recognises 1 <sup>st</sup> sugar of LaA
138A	+	+	Close to Y136



が、C末端ドメインのリガンド結合トンネル付近に結合し、アグリコンはリガンド認識に必 須ではないことが明らかになった。また、C末端ドメインのヘリックスおよびループ領域の構 造変化によって、LanK-LanJプロモーター配列からのLanKの解離を引き起こすことが示 唆された。LanKは、糖鎖部分を認識するユニークなTetR型転写調節蛋白質であること が、明らかになった。

## ■LanKはランドマイシンの糖鎖の長さを認識する

異なるランドマイシンを用いたゲルシフトアッセイ(EMSA)によって、LaAとLaEはLanK のDNAへの結合を阻害するが、LaDとアグリコンは阻害しないことが分かった。





図2 (A) 本研究で用いたランドマイシン (誘導体) の構造。 (B) EMSAの結果。1: 10-1 kb DNA ladder (Thermo), 2: DNA, 3: DNA + LanK, 4: DNA + LanK + 50 pM LaA, 5: DNA + LanK + 100 pM LaE, 6: DNA + LanK + 100 pM LaD, 7: DNA + LanK + 100 pM aglycon, 8: DNA + 100 pM LaA, 9: LanK.

# ■LanKの結晶構造解析

分解能2.4Åで決定されたアポ体のLanKの結晶構造は、TetR型転写調節因子に典 型的なΩ型の二量体であった(図3(A))。また、LanK-LaA複合体の結晶構造によっ て、LaAは長い糖鎖部分がリガンド結合トンネルに深く挿入して結合し(図2(B))、ア グリコンはLanKとの直接的な相互作用に関与しないことが明らかになった。



図5 LanKの変異体解析によるリガンド結合に関与する残基の特定。(A)LaA認識に関与する残基の模式図。円弧はファンデルワールス相互作 用を、点線はリガンドとの極性的な相互作用をそれぞれ表す。LaAから5Å以内に位置する他の残基も示している。残基はEMSAにおけるLanKへの 影響によって色分けされている(赤: LaA認識に重要な残基(G132, Y136, S149, L152)で、それらの変異によりLanKはLaAに結合しなくなる。 禄: LaA認識に関わる残基(M108, N125, I128, F160)で、それらの変異はLaAによるDNA放出を完全に無効にしない。青: 変異がLanKによ るLaA認識に影響がない残基。(B-E) 変異体のEMSAの結果。1: 10-1 kb DNA ladder (Thermo), 2: DNA, 3: DNA + LanK, 4: DNA + LanK + LaA, 5: DNA + G132A mutant, 6: DNA + G132A mutant + LaA, 7: DNA + Y136A mutant, 8: DNA + Y136A mutant + LaA, 9: DNA + S149A mutant, 10: DNA + S149A mutant + LaA。(C) 1: 10-1 kb DNA ladder (Thermo), 2: DNA, 3: DNA + LanK, 4: DNA + LanK + LaA, 5: DNA + M108A mutant, 6: DNA + M108A mutant + LaA, 7: DNA + N125A mutant, 8: DNA + N125A mutant + LaA, 9: DNA + Q145A mutant, 10: DNA + Q145A mutant + LaA<sub>o</sub> (D) 1: 10-1 kb DNA ladder (Thermo), 2: DNA, 3: DNA + I128A mutant, 4: DNA + I128A mutant + LaA, 5: DNA + F157A mutant, 6: DNA + F157A mutant + LaA, 7: DNA + F160A mutant, 8: DNA + F160A mutant + LaA, 9: DNA + F161A mutant, 10: DNA + F161A mutant + LaA。(E) 1: 10-1 kb DNA ladder (Thermo), 2: DNA, 3: DNA + L152A mutant, 4: DNA + L152A mutant + LaA, 5: DNA + H156A mutant, 6: DNA + H156A mutant + LaA, 7: DNA + L115A mutant, 8: DNA + L115A mutant + LaA, 9: DNA + R116A mutant, 10: DNA + R116A mutant + LaA.

# ■ LanKのランドマイシン認識による転写制御機構の全体モデル

(A) リガンドフリーな状態では、LanKのα6 (オレンジ) とL6-7 (緑) はそれぞれヘリッ クス、ループ構造をしている。α6はα4(水色)と疎水的な相互作用を形成し、NTDと 結合しているα4は曲がった構造を形成している。(B) 1分子のLaAの結合により、L6-7 とα6の1つが構造変化する。α4は曲がったままであり、NTDは低LaA濃度では外側に開 いていない。(C) 細胞内のLaA濃度が十分になると、LanKは2つのLaAと結合する。こ のとき、2つのLaAに沿って、L6-7はヘリックス構造に変化し、α6が完全にディスオーダー する。その結果、α4はα6との疎水的相互作用を一部失い、直線的な構造に変化し、 NTDのHLHモチーフは外側に開き、LanK二量体はDNAを放出する。

(D) LaE の 糖 鎖 の (A) Ligand free 1→2→3モチーフはLaAの LaA aglycon L6-7 LaE aglycon 4→5→6と同じであるため、 Hexa Tri 🔾 その結合様式はLaAと類 C: β-D-olivose : α-L-rhodinose 似すると予想される。その ため、アロステリックな構造 (D) LaE bound 変化により、LanKはDNA MMMMMMMMM MMMMMMMMMMMMM を放出すると考えられる。 (E) アグリコンはリガンド 認識に必要ではないため、 Hexa は、LaAと同様に DNAを放出するように働 くと推察される。 図6 本研究によって提唱された、LanKのランドマイシン認識機構と転写調節





図3 (A) LanK-apo二量体のリボン図(赤: molCのN末端ドメイン(NTD)、青: molDのNTD、グレー: molCのC末端ドメイン(CTD)、ライトグ レー: molDのCTD、緑: molCとmolDのループL6-7, オレンジ: molCとmolDのヘリックスα6)。(B) LanKとLaAとの複合体の結晶構造。

さらに、LaAの結合とヘリックスα6のループへの構造変化と連動して、α6に隣接するα4 が、直線状に大きく構造変化することを見いだした(図3)。これにより、両プロトマーの NTDに存在する、DNA結合HLHモチーフが外側に移動することがわかった。





図4 LaAによるLanKのアロステリックな構造変化。(A)アポ体では、 α6(紫とオレンジ)とL6-7(緑)は、それぞれヘリックスとループ構造 をとっている。α6とその周囲のヘリックスは疎水性コアを形成し、α4 (グレーとベージュ)と相互作用している。α4は短いループでHLHと 結合しており、屈曲した構造を形成している。(B) 1分子のLaA結合 により、L6-7がヘリックスを形成し、α6の1つがループ構造に変化する。 α4は依然として屈曲しており、HLHは外側に開いていない。(C) 2つ のLaAが結合すると、LaAに沿うようにL6-7がヘリックス構造へと変化し、 α6が完全にディスオーダーする。その結果、α4はα6との疎水的な相 互作用を一部失い、直線的な構造をとるようになる。これにより、 HLHが外側に開き(右)、LanK二量体はDNAを放出する。

### ■謝辞~ウクライナリヴィウ国立大学との二国間共同研究~

本研究は、JSPS二国間交流事業の支援のもと、ウクライナ リヴィウ国立大学 Bohdan Ostash教授グループ、米国 タフツ大学 Clay S. Bennett教授との共同研究 として行われました。

EMSAアッセイを行っていただい たOstash教授、糖鎖の有機合 成を行っていただいたBennett准 教授をはじめとする、本研究に携 わった全ての方々に心より感謝を 申し上げます。



図7 ウクライナリヴィウ国立大学への2度の訪問。 Ostash研究室と田中研究室の集合写真((A) 2018年6月、(B) 2019年9月)。