

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 翟 睿

抗マラリア薬として利用されるアルテミシニンをはじめとして、エンドペルオキシド含有化合物は多様な生物活性を示し、その構造と活性から医薬品資源として注目される化合物群である。しかしながら、その生合成については未知な部分が多く、酵素の発見、機能解析が待たれている。エンドペルオキシド構造を含む二次代謝産物の生合成については、糸状菌 *Aspergillus fumigatus* 由来 verruculogen の生合成が明らかとされており、遺伝子群中の非ヘム鉄 α -ケトグルタル酸 (α -KG) 要求性ジオキシゲナーゼ酵素 FtmOX1 がエンドペルオキシド形成反応を触媒することが報告されていた。近年、二つ目の例として *Aspergillus novofumigatus* 由来のメロテルペノイド化合物 novofumigatonin の生合成中において、非ヘム鉄 α -KG 要求性ジオキシゲナーゼ酵素 NvfI がエンドペルオキシド構造の形成を行うことが明らかとされた。NvfI は asnovolin A を基質とし、一回の触媒反応で3つの酸素原子を導入し、fumigatonoid A を生産する。興味深いことに、NvfI は他の α -KG 要求性ジオキシゲナーゼと相同性を示さず、系統樹解析においてはこれまでに解析された α -KG 要求性ジオキシゲナーゼとは異なる系統群に属することが見出された。そこで翟睿は、この α -KG 依存性ジオキシゲナーゼ NvfI に着目し、酵素の機能解析、立体構造解析に着手した。

非ヘム鉄 α -KG 要求性ジオキシゲナーゼ酵素群は二価鉄を含む酸化酵素であり、低分子化合物からタンパク質やDNAまで様々な生体分子に対して水酸化や脱メチル化、二重結合の導入など多彩な酸化反応を触媒する。本酵素群は、細菌から植物、動物まで広く存在しており、ヒトには約60個、各植物種のゲノムでは0.5%を占めることが明らかとなっている。医薬品資源としても利用価値の高い二次代謝産物の生合成中においても重要な役割を担っており、これら酵素の機能解析、構造解析を基盤とした反応機構解析は、遺伝子資源を利用した有用化合物の安定供給、機能改変生合成酵素を用いた新規生物活性化合物の創出へつなげることが期待される。

まず、翟睿は酵素を大腸菌に異種発現させ、精製した酵素に対して X 線結晶構造解析を行った。その結果 2.0 Å の分解能で全体構造の取得に成功した。NvfI の全体構造は、他のジオキシゲナーゼと類似した double-stranded β -helix (DSBH) core fold を有していたが、大きく異なる点として、DSBH を構成する β -sheet が別の部位の β -strand と相互作用し、新たな β -barrel 構造を形成していた。さらに、他のジオキシゲナーゼにおいては二量体化することで活性部位を形成しているのに対し、NvfI では単量体で活性部位を形成していることが判明した。ゲル濾過カラム解析によっても実際に NvfI は溶液中において単量体で存在していることを確認している。

さらに翟睿は基質と酵素の結合様式を明らかとするために、結晶に対して基質 asnovolin A のソーキングを行い、酵素-基質複合体を取得した。アポ体と複合体の活性部位構造を比較した結果、複数のアミノ酸残基のコンフォメーション変化が見られ、基質結合によって活性部位残基の大きな動きが引き起こされることが判明した。また、コンフォメーション変化が見られた活性部位残基および基質と相互作用している残基の変異体解析を行った結果、Arg118、Phe127、His138、Trp199 の変異体においてはエンドペルオキシド形成活性が低下し、代わりに異なる部分が酸化されたアルデヒド化合物や、エポキシド化合物を生成することを見出した。このことから、これらの残基と基質との相互作用や酵素反応中における活性部位構造の動きが、基質認識や基質の結合様式に重要であると考察している。また、FtmOx1 の酵素反応においては Tyr 残基が酵素反応中エンドペル

オキシドの形成後、ラジカル中間体への水素原子の付加反応を行い、触媒残基として重要な役割を担っていることが示唆されている。NvfI においても Tyr116 が基質近傍に存在し、同様に重要な役割を担っていると考えられたが、Tyr116 を Phe に置換した変異体は野生型と同程度のエンドペルオキシド形成活性を維持していた。しかしその一方で、Y116A 変異体においては生成物特異性が変化し、異なる位置の水素原子が引き抜かれ水酸化された asnovolin B を主生成物として与えることが判明した。以上の結果より、Tyr116 残基は、触媒残基としては機能していないが、芳香環がエンドペルオキシド形成反応中、分子酸素を認識するのに重要であり、NvfI においては FtmOx1 とは異なる反応メカニズムにより、エンドペルオキシドが形成されると考察している。

また、翟睿は ^{18}O で標識した酸素、水を反応に用いることで生成物における酸素原子の由来についても検討した。 $^{18}\text{O}_2$ 存在下においては生成物+4 の分子量ピークが見られ、+6 のピークは見られなかった。一方で、 H_2^{18}O 存在下においては、+2 の分子量ピークが確認された。この結果は、導入される 3 つの酸素原子のうち、2 つが酸素由来、1 つが水分子由来であり、推定反応機構と矛盾している。これに対して翟睿は、活性中心の早い溶媒交換が原因であり、溶媒交換により水分子で置換された ferryl-hydroxo 中間体から 3 つ目の水酸基部分が導入されるため、1 つの酸素原子が水分子由来となったと考察している。最後に、以上の立体構造解析、変異体解析の結果をもとに、NvfI の反応機構を提唱した。

本研究を通して翟睿は、天然においても珍しいエンドペルオキシド構造を合成する α -KG 依存性ジオキシゲナーゼ NvfI に着目し、酵素の機能解析、立体構造解析を達成した。今後、酵素に対して構造に基づく合理的な変異を導入することで、二次代謝合成酵素の触媒機能のさらなる拡張と、生体触媒にも利用可能な有用酵素の創出への展開が期待される。よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。