

論文の内容の要旨

糸状菌メロテルペノイドの複雑骨格構築に関わる α -ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼの構造機能解析

中 嶋 優

糸状菌由来メロテルペノイドはテルペノイドとポリケタイドのハイブリッド型化合物であり、複雑骨格を有する生物活性物質として数多くの報告がある^{1,2)}。これら骨格の生成に関わる生合成酵素を精密機能解析し、エンジニアリングすることで、新規生物活性物質の創出に繋げることが可能である。所属研究室ではこれまで糸状菌メロテルペノイド *austinol*、*berkeleydione* 生合成酵素の反応解析を行い、その特異な反応について明らかにし、非ヘム鉄 α -ケトグルタル酸 (α KG) 依存性ジオキシゲナーゼ *AusE* と *PrhA* が、それぞれの骨格形成に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた³⁻⁴⁾。*AusE*、*PrhA* は共通して *preaustinoid A1* を基質として受け入れるが、*AusE* は H-2 の脱水素による *preaustinoid A2* の生成、H-5, -9 の脱水素を伴うスピロラクトン環形成による *preaustinoid A3* の生成を触媒するのに対し、*PrhA* は *preaustinoid A1* の H-5 の脱水素による *berkeleyone B* の生成、H-1 の脱水素を伴うシクロヘプタジエン環形成による *berkeleydione* の生成を触媒する (図 1)。即ち、これら 2 つのジオキシゲナーゼは共通の化合物を基質として受け入れるものの、鉄原子による脱水素の位置選択性が異なる。*AusE*、*PrhA* は互いに高い相同性 (~78%) を有するため、活性中心アミノ酸の僅かな差異が二つの反応を制御すると考えられた。そこで私は当該研究において両酵素の X 線結晶構造解析に着手し、その反応性の違いをもたらすアミノ酸残基を同定し、詳細な反応メカニズムを明らかにすることを目指した。このような多段階酸化反応を触媒する α KG 依存性ジオキシゲナーゼの反応制御機構の詳細はこれまで明らかになっておらず、新規な知見が得られることが期待された。

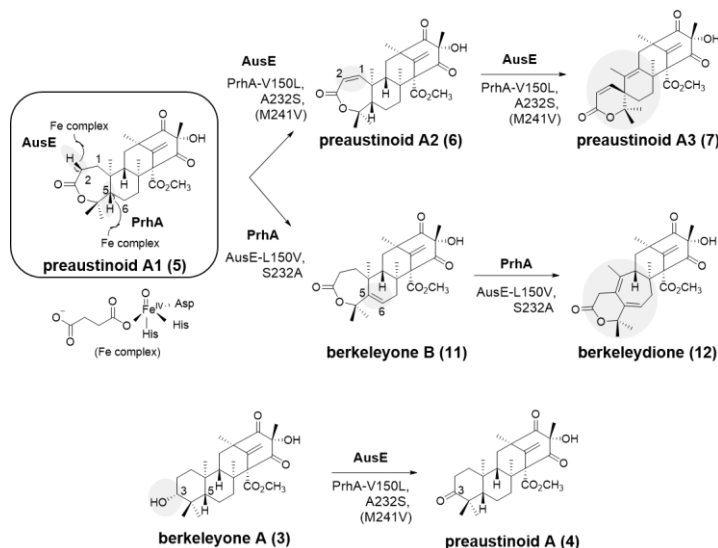


図 1 *AusE* 及び *PrhA* が触媒する多段階酸化反応

1. AusE、PrhA の結晶構造解析と変異導入による機能改変

大腸菌より調製した AusE、PrhA を嫌気条件下で結晶化スクリーニングを行い、得られた結晶に対し、X 線回折データ (PF BL-1A, -17A にて取得) の解析を行った所、AusE、Mn(II)、 α -KG の複合体を 2.1 Å、PrhA、Fe(II)、 α -KG、preaustinoid A1 の複合体構造を 2.2 Å の解像度で取得することに成功した。それぞれの全体構造は Jelly-roll バレル構造を取っており、金属、補酵素、基質を認識するアミノ酸はよく保存されていた。Preaustinoid A1 に対する両酵素の反応性の差異を解明すべく、PrhA 基質複合体構造での preaustinoid A1 と Fe(II) の位置関係に着目してさらに解析を進めると、その反応性より preaustinoid A1 の H-5 が H-2 より鉄原子に近接していると予想されたが、Fe(II) と C-2、C-5 と鉄原子との距離はそれぞれ 4.4 Å 及び 5.2 Å であり、反応性の違いを説明することができず、更なる解析が必要であった (図 2)。

そこで、反応性の差異をもたらすアミノ酸残基を特定すべく、AusE、PrhA preaustinoid A1 結合部位周辺アミノ酸残基の比較を行った所、150、232、241 位の 3 つのアミノ酸残基のみが異なることが見出された (図 2)。特に、AusE の Ser232 残基は preaustinoid A1 の 3 位のカルボニル基の近傍に見出され、この側鎖とカルボニル基の相互作用が反応性の決定に重要であると推測された。これらアミノ酸残基の触媒に与える影響を調べるために、PrhA の活性部位を AusE 型に変異した PrhA-V150L/A232S を調製し、*in vitro* にて preaustinoid A1 に対する活性評価を行った。その結果、PrhA-V150L/A232S は berkeleydione を生成せず、AusE の生成物である preaustinoid A3 が生成されることを確認した (図 1)。一方で、AusE の活性部位を PrhA 型に変異させた AusE-L150V/S232A を調製し同様の活性試験を試みた結果、berkeleydione が生成され、本酵素は PrhA 型反応活性を獲得したことが判明した (図 1)。つまり、この変異試験により両酵素活性の相互変換を行うことに成功し、この僅か 2 残基の差異により反応性が制御されることが判明した。

AusE は preaustinoid A1 だけでなく、その前駆体である berkeleyone A も基質として受け入れ、3 位の水酸基の酸化反応を触媒し preaustinoid A を生成する (図 1)。その一方で、PrhA は berkeleyone A を基質として受け入れない。変異体 PrhA-V150L/A232S は AusE 型反応を触媒し、preaustinoid A1 から A3 へと変換することから、本変異酵素においても berkeleyone A から preaustinoid A への酸化が進行すると予想した。そこで、PrhA-V150L/A232S による *in vitro* での berkeleyone A への活性評価を行った。その結果、preaustinoid A の生成を確認し、このアミノ酸変異によって、AusE が有する活性のすべてを PrhA 変異体が獲得したことが示された。

2. 結晶構造に基づく AusE 型反応の精密機能解析

次に、AusE の詳細な反応機構を解明すべく、PrhA-V150L/A232S 変異体の結晶を調製し、Fe(II)、 α -KG、各基質 (berkeleyone A, preaustinoid A1, preaustinoid A2) との X 線回折データの解析を行うことで、それぞれの複合体構造を取得した (図 3)。これらの構造を詳細に解析した結果、berkeleyone A 複合体では H-3 が鉄原子と最も近い位置にある一方、preaustinoid A1 複合体では H-2 がより近接することが明らかとなった。興味深いことに berkeleyone A と preaustinoid A1 の A 環の構造は chair 型から boat 型への構造変化が起きていた。これにより preaustinoid A1 では H-2 が鉄原子に近づくことで 2 位の酸化への選択性が生じることが示された。続いて、Fe(II) と preaustinoid A2 の複合体構造を精査すると、5 位が鉄

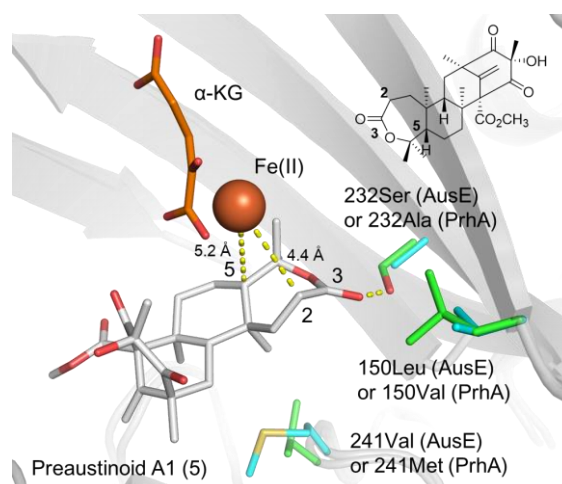


図 2 PrhA の preaustinoid A1、Fe(II)、 α -KG との結合様式、及び AusE 構造との比較

原子の最も近傍に存在することが判明した。よって、preaustinoid A2 の H-5 の引き抜きによりラジカルが生じ、環構造の再構成が引き起こされ、preaustinoid A3 のスピロラクトン環形成へと導かれる反応機構が示された。

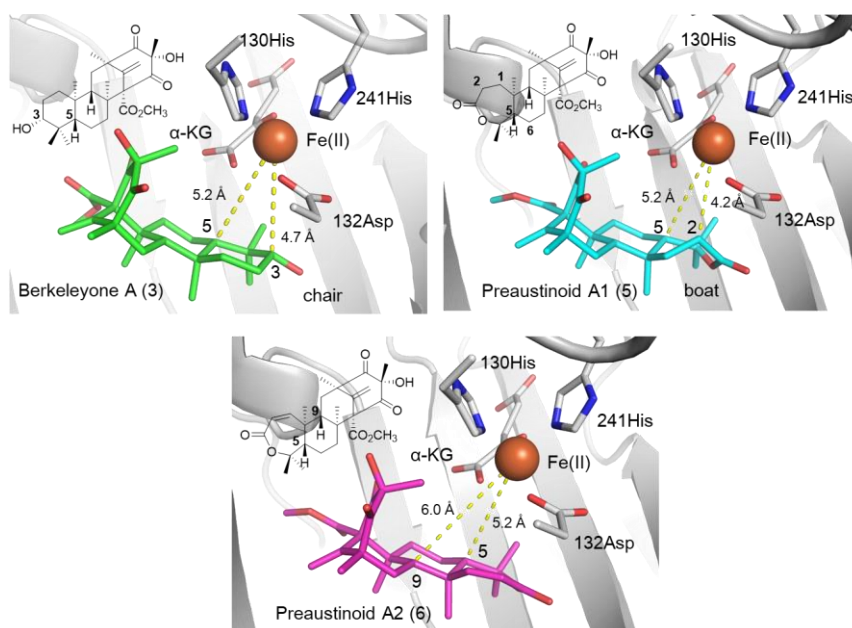


図3 PrhA-V150L/A232S と各基質との複合体構造

3. 変異導入による非天然型新規生体触媒の創出

さらに反応性の改変を行うべく、三重変異を加えた PrhA-V150L/A232S/M241V 変異体を調製した。この変異体を用いて preaustinoid A1 に対して *in vitro* による活性評価を行った結果、新規化合物 X1-X4 が生成された。各化合物の単離を行い、各種 NMR、LC-MS 解析による構造決定を行った結果、驚くべき事に、これらは preaustinoid A3 から更に酸化反応が進んだ新規化合物群であった (図 4)。以上より、PrhA-V150L/A232S/M241V は preaustinoid A1 から preaustinoid A3 の酸化反応に加えて、連続した 2 回または 3 回の酸化反応を触媒し、compound

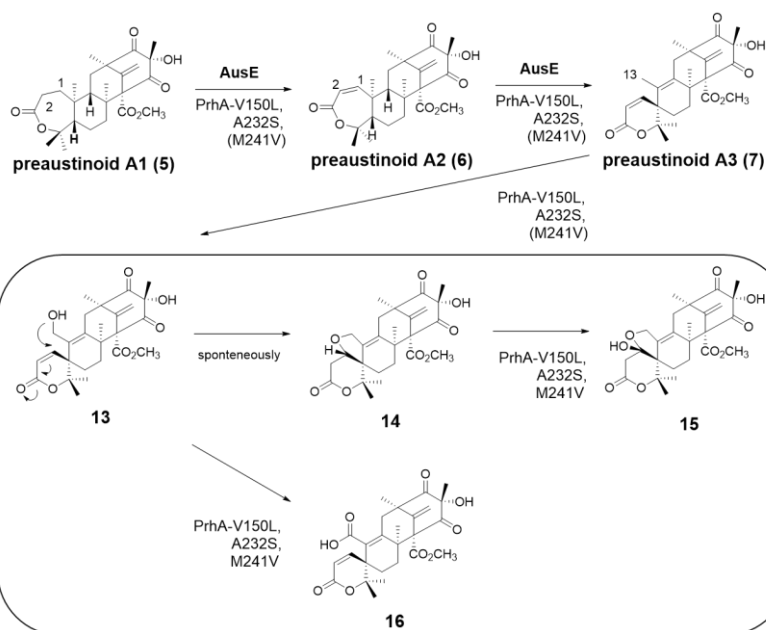


図4 PrhA 変異体による非天然型メルテルペノイドの生成

X3、X4 を生成することが示された。本研究結果は、立体構造に基づく合理的な部位特異的変異導入によって、基質特異性を改変し、酸化酵素の触媒能を拡大することに成功した極めて希少な例であり、複雑骨格天然物合成の鍵となる酸化酵素反応リデザインのために重要な知見を与えた。

4. まとめ

当該研究では多段階の酸化反応を触媒する複数の α KG依存性ジオキソゲナーゼのX線結晶構造解析を行い、その中間体リガンドの複合体構造を取得することによって、その触媒能の精密機能解析を行った。その結果、これら酵素群の多段階反応における反応制御について重要なアミノ酸残基を見出した。加えて、部位特異的変異体の作製を行い、野生型酵素反応からさらに酸化段階の進んだ生成物を創出することに成功した。多段階酸化反応を触媒する酵素と各中間体との複合体結晶構造解析の報告例は希少であり、構造解析を基に生み出された変異酵素は、天然型酵素を超えた前例のないスーパー多機能性を獲得した。今後は、当該研究によりもたらされた知見を基に、メロテルペノイド化合物ライブラリーの作成を目指した創薬研究への展開が期待される。

参考文献

- (1) Matsuda, Y. & Abe, I. *Nat. Prod. Rep.* **33**, 26 (2016).
- (2) Geris, R. & Simpson, T. J. *Nat. Prod. Rep.* **26**, 1063 (2009).
- (3) Matsuda, Y., Awakawa, T., Wakimoto, T. & Abe, I. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 10962 (2013).
- (4) Matsuda, Y., Iwabuchi, T., Fujimoto, T., Awakawa, T., Nakashima, Y., Mori, T., Zhang, H., Hayashi, F. & Abe, I. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 12671 (2016).
- (5) Nakashima, Y., Mori, T., Nakamura, H., Awakawa, T., Hoshino, S., Senda, M., Senda, T. & Abe, I. *Nat. Commun.* **9**, 104 (2018).