

結晶構造解析を基盤とする二次代謝酵素の機能制御と物質生産 Structure-based function analyses of secondary metabolite enzymes

森貴裕, 阿部郁朗*

東京大学薬学系研究科, 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

Takahiro Mori and Ikuro Abe*

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033, Japan

1 はじめに

微生物や植物などが生産する二次代謝産物はその構造多様性や骨格の複雑さ、活性の高さから医薬品のリード化合物として大きな役割を担っている。これら二次代謝産物を生合成するのが二次代謝酵素であり、その中には、大規模な骨格変換を触媒するものが多数存在する。二次代謝酵素には活性部位の微妙な構造の差異により、基質特異性や反応性が大きく変化するものがあり、これが天然物の多様性を生み出す要因になっている。そのため、一次配列からこれらの反応を推測する事は難しく、X線結晶構造解析により立体構造を取得し、詳細な反応メカニズムを検討する必要がある。また、得られた知見を基に酵素の基質特異性、反応性を人為的に活用・拡張することにより、創薬リードの分子多様性と生物活性を備えた広大な非天然型化合物ライブラリーの構築が可能となってくる。本研究では、メロテルペノイド生合成中において骨格変換の制御に重要な役割を担っている異性化酵素群を取り上げ、その詳細な反応メカニズムの解明と自在な骨格変換の制御を目的とした機能改変酵素の創出を目的に研究を行う。

糸状菌 *Aspergillus nidulans* の生産する austinol はポリケタイドと farnesyl 基由来のテルペノイドからなる特異なハイブリッド型化合物 (メロテルペノイド) である。Austinol 生合成遺伝子クラスター内に存在する、新規多機能型非ヘム鉄ジオキシゲナーゼ AusE は austinol 生合成中、スピロラクトン環の構築など、テルペン骨格の、一連の、位置選択的、立体特異的酸化反応を触媒する[1]。この反応の詳細なメカニズムを解明すべく、X線結晶構造解析に着手した。

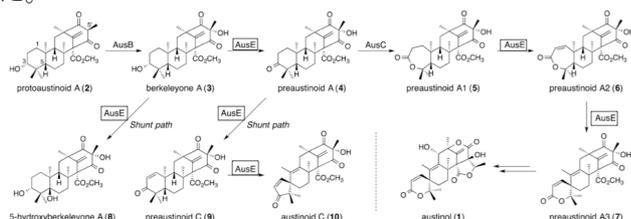


図1 Austinol の後期生合成経路

2 実験

A. nidulans AusE を大腸菌に異種発現させ、精製した酵素について結晶化を行った。X線回折強度デー

タの収集は、Photon Factory の構造生物学ビームライン (PF BL-1A、PF BL-17A) を利用した。

3 結果および考察

A. nidulans AusE と Mn^{2+} の複合体構造を 2.9 Å の分解能で決定した。酵素の全体構造は他のジオキシゲナーゼと同様な全体構造を有しており、活性中心のアミノ酸残基、His130、Asp132、His214 の位置もよく保存されていた (図2)。AusE の全体構造は *Claviceps purpurea* 由来 Fe(II)/2-KG/ O_2 -dependent cyclol synthase, EasH や *Homo sapiens* phytanoyl-CoA dioxygenase を含む他の非ヘム鉄ジオキシゲナーゼと 2.1 Å、3.3 Å の RMSD 値を示した。

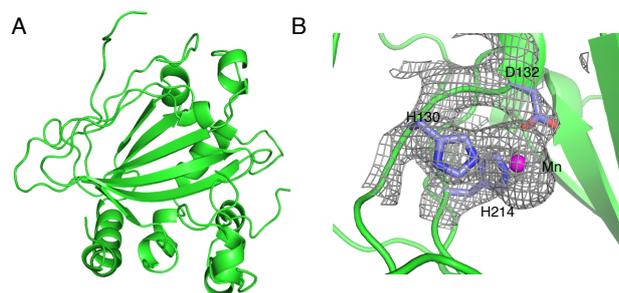


図2 AusE の (A) 全体構造、(B) 活性部位

活性残基には Mn^{2+} が配位しており、この部位に基質が結合し、反応が進行する事が推測される。現在、ホモログ酵素の結晶化、基質との複合体構造の取得を試みると同時に、周辺アミノ酸残基に変異を導入し、活性部位を構成するアミノ酸残基の反応への寄与を検討しているところである。

参考文献

- [1] Matsuda, Y. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 10962 (2013).