

放線菌由来新規 Pictet-Spengler 反応触媒酵素の X 線結晶構造解析 X-ray crystal structure analysis of a novel Pictet-Spenglerase from Actinomycete

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

植物や微生物が産出する二次代謝産物は、構造多様性と多様な生物活性を示し、医薬品の創薬ターゲットとして重要な役割を担っている。この多様性を生み出しているのが二次代謝酵素であり、中には活性部位を構成するアミノ酸残基の差異により活性が大きく変化する酵素が多く存在する。そのため、一次アミノ酸配列から詳細な反応性、メカニズムを推測することは難しく、X 線結晶構造解析による立体構造の解明が必要となる。

β -カルボリンアルカロイド、マリナカルボリン類の生産に関わる海洋放線菌 *Marinactinospora thermotolerans* 由来 McbB は、*in vivo* の実験から L-トリプトファン、オキサロアセトアルデヒド間で Pictet-Spengler (PS) 反応を触媒し、テトラヒドロ- β -カルボリン骨格を形成した後、酸化反応、脱炭酸反応を行い、 β -カルボリン化合物 1,2 を生成すると提唱されていた(図 1)。McbB は他の PS 反応触媒酵素と全く相同性を示さず、放線菌由来の機能未知酵素と高い相同性を有している。そこで、McbB の立体構造を明らかにし、PS 反応、酸化、脱炭酸反応の一連の反応の触媒のための構造基盤を明らかにすべく、X 線結晶構造解析による反応メカニズム解明を試みた。

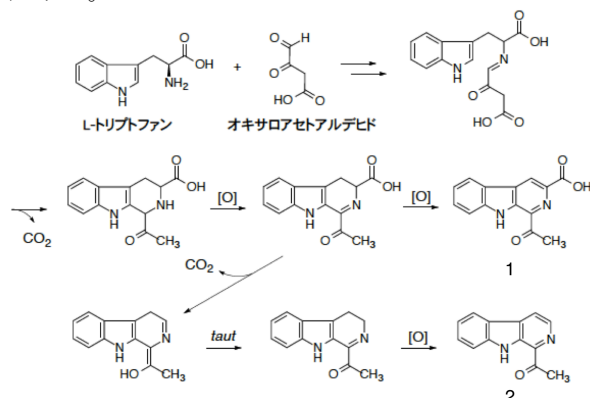


図 1 McbB の関わる β -カルボリン骨格合成反応

2 実験

大腸菌にて McbB を 6 残基のヒスチジンとの N 末端融合タンパク質として異種発現し、Ni アフィニティ

ーカラム、ゲル濾過カラムを用いて精製した。精製した酵素を用いて結晶化スクリーニングを行った結果、PEG1000 を沈殿剤とする結晶化条件で結晶が再現性良く得られた。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(NW12A) を利用した。McbB の結晶構造は、Se-Met 誘導体結晶を用いた SAD 法で決定した。

3 結果および考察

McbB の Se-Met 誘導体結晶の全体構造を 2.48Å の分解能で決定した(図 2)。McbB の全体構造は既知の PS 反応触媒酵素とは大きく異なり、N 末端側に β バレル、C 末端側に 5 本の α ヘリックスという二つのドメインから形成されていた。非対称単位には、4 つの分子が存在し、それらは二つの対称型のダイマーであることが判明した。モノマー同士はそれぞれほぼ同一の構造を持ち、RMSD 値は 0.2-0.3Å であり、これらダイマー間の表面積は 908Å² であった。このダイマー境界面に基質である L-トリプトファンが結合しており、塩基として反応の開始に関わる Glu97 が β 6- β 7 間のループ上、L-トリプトファンのアミノ基から 3.6Å 離れた位置に存在し、反応に十分な距離に近接していることが明らかとなった(図 3)。Ser48 が水素結合に関わり、アミノ基の保持に関わっていることが分かった。その他 Phe250, Leu85 が π - π 相互作用、疎水性相互作用によってインドール環を保持していることが明らかとなった。また、Tyr53 の水酸基、Leu46, Val47 のアミドプロトンがカルボキシル基の保持に関わっており、L-トリプトファンが基質として厳密に認識されていることが判明した。上記アミノ酸はそれぞれ一アミノ変異体で作製され、S48A/V, Y53A/F, F97A, F250A において活性が消失するのに対して、S48T, F250Y/W においては維持されることから、これらの残基との相互作用が基質認識に重要であることが示された。

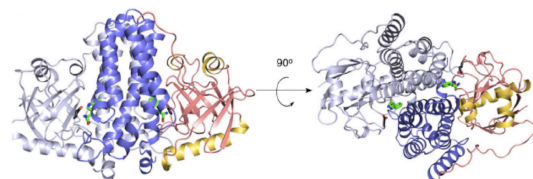


図 2 McbB の全体構造(緑:L-トリプトファン)

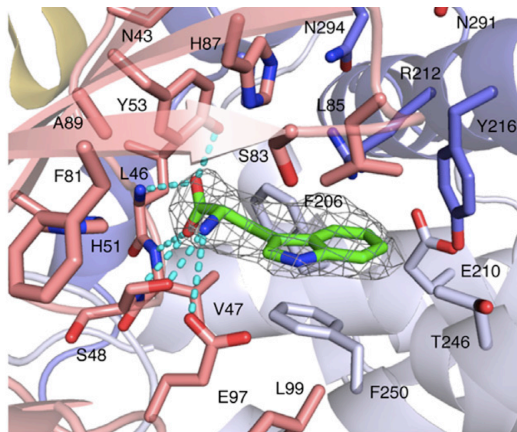


図 3 McbB の L-トリプトファン結合様式

次いで、McbB とオキサロアルデヒドのドッキングモデルを作製し、オキサロアルデヒドが L-トリプトファンの近傍に存在し、Ser48, His51, Arg72 の側鎖によって保持されることが判明した(図 4)。また、Ser83, His87 が基質の α -ケトと水素結合し保持に関わることが示唆された。これらのうち、His51、Arg72、His87 に変異を導入したところ、全ての変異体が活性を維持しており、これらは活性に直接関与していないことが明らかとなった。しかし、Arg72、His87 は活性部位入口に存在し、活性部位入口に存在し、その広さを制御することで、基質特異性に大きな役割を担っていると考えられた。そこで両アミノ酸の変異体 R72A, H87A, R72/H87A を作製し、本来の基質より富高い、フェニルグリオキリサルを基質として酵素反応を行った所、本来の酵素反応では得られない新規 β -カルボリン化合物を生成することに成功した(図 5)。

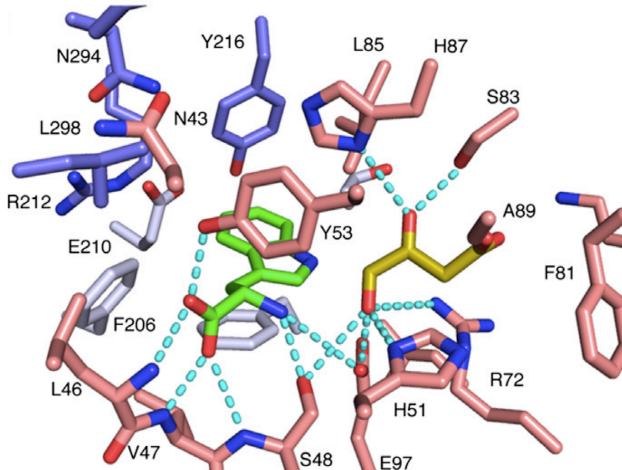


図 4 McbB のオキサロアルデヒド結合様式

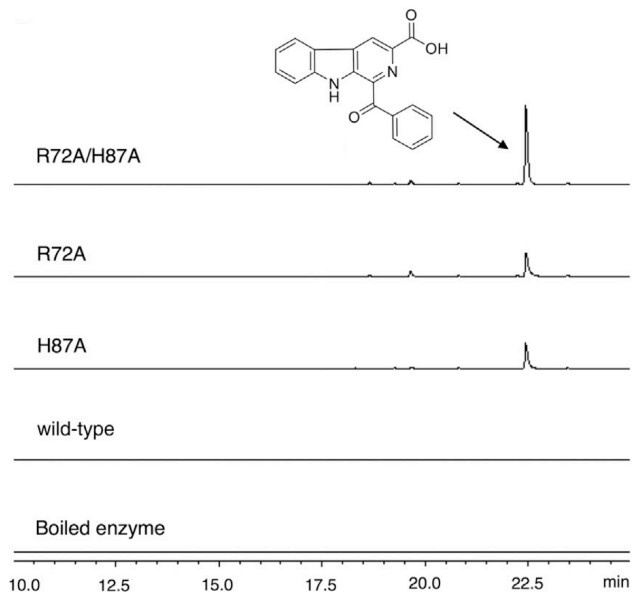


図 5 変異酵素による新規化合物生産

以上の結果を元に、McbB による PS 反応触媒メカニズムを提唱する(図 6)。活性部位に基質が取り込まれた後に、Glu97 が L-トリプトファンのアミノ基から水素を引き抜き、活性化されたアミンがアルデヒドカルボニルへ求核攻撃することで反応が開始する。カルビノールアミン中間体が生成した後に、脱水反応が進行し、イミンが形成する。この際、Glu97 が酸触媒として働き反応を促進していると考えられる。次いで、インドール環の 2 位からイミンへの求核付加反応によって閉環し、再度負電荷を帯びた Glu97 が 2 位の水素を引き抜いて芳香性を回復し、テトラヒドロ- β -カルボリン骨格が形成する。最後に、1 位のアセトアセチル基の脱炭酸反応、酵素外での酸化、脱炭酸反応が進行し、生成物 1,2 が生成すると考えられる。

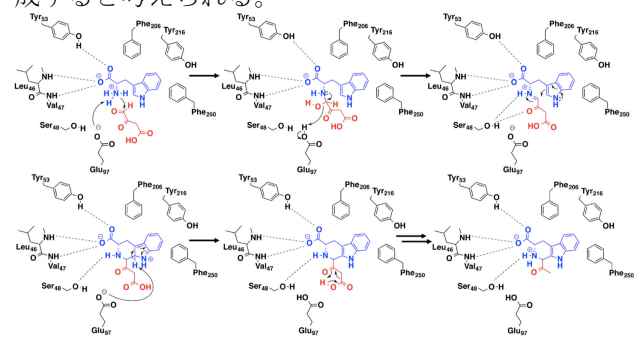


図 6 McbB の PS 反応触媒機構

4 まとめ

本研究では、微生物由来の β -カルボリン生合成に関する新規 PS 反応触媒酵素 McbB の X 線結晶構造解析により、反応触媒機構の解明、機能改変を行った[1]。McbB と同源性を有する酵素は他の微生物群にも存在し、それらの構造解析により、微生物における β -カルボリンアルカロイド生合成の構造活性相関研究が進展するものと期待される。

参考文献

- [1] T. Mori, S. Hoshino, S. Sahashi, T. Wakimoto, T. Matsui, H. Morita, I. Abe, *Chem. Biol.* **22**, 898 (2015).