

糸状菌由来メロテルペノイドの骨格変換に関わる異性化酵素の X 線結晶構造解析

X-ray crystal structure analysis of isomerases involved in the fungal meroterpenoid biosynthesis

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

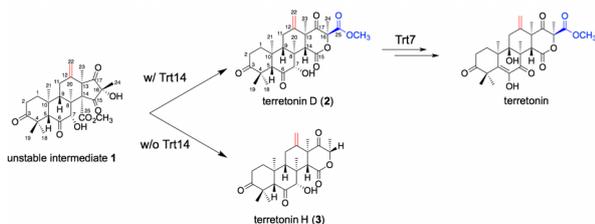
Takahiro Mori and Ikuro Abe

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、その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。

メロテルペノイドとはテルペノイド骨格を部分構造として有する化合物の総称である。特に糸状菌からは、構造多様性ならびに生物活性に富むメロテルペノイドが報告されており、その生合成遺伝子の解明や生合成酵素の機能解析は、今後の創薬や有用化合物を指向した物質生産において重要である。本研究では、糸状菌メロテルペノイドである *terretonin* 生合成に関わる異性化酵素 *Trt14* に注目した。*Trt14* は、わずか 16kDa の大きさの酵素であり、エステルの解裂、メトキシ基の転位による D 環拡大反応を触媒することにより、*terretonin* 中間体(*terretonin D*) の生成を触媒し、メロテルペノイド複雑骨格の形成に関わる多機能触媒である(図 1)。本酵素ファミリーは *austinol* 生合成中の *AusH* や *paraherquonin* 生合成中の *PrhC* など、複数のメロテルペノイド生合成経路に含まれるが、その立体構造基盤は未知であった。本研究では、反応性、基質特異性を明らかにすることを目的とし、*Trt14* とそのホモログの X 線結晶構造解析に着手した。

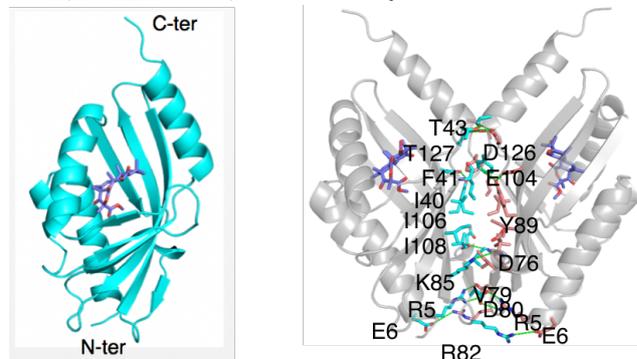
図 1 *Trt14* の触媒する異性化反応

2 実験

大腸菌にて *Trt14* を 6 残基のヒスチジンとの N 末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、PEG8000 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(BL17A, NE3A, NW12A)を利用した。*Trt14* 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

Trt14 のアポ体結晶の全体構造を 1.9 Å の分解能で決定した(図 2)。*Trt14* の全体構造は 5 つの α -ヘリックス、6 つの β -シートから構成される $\alpha + \beta$ barrel fold をとり、対照性をもつホモダイマーであることを明らかとした。これは、nuclear transport factor 2 (NTF-2) スーパーファミリーの酵素によく保存された構造であった。RMSD 値は 1.2-1.7 Å であり、ダイマー間の表面積は 1450 Å² であった。このダイマー境界面には数多くの静電的、疎水的相互作用が存在することが明らかとなった(図 2)。NTF-2 スーパーファミリーの酵素は、limonene-1,2-epoxide hydrolase、scytalone dehydratase、ポリケタイド環化酵素 *Snoal* などが知られるが、いずれも一次アミノ酸配列において相同性は 10% 以下であった。

図 2 *Trt14* の全体構造

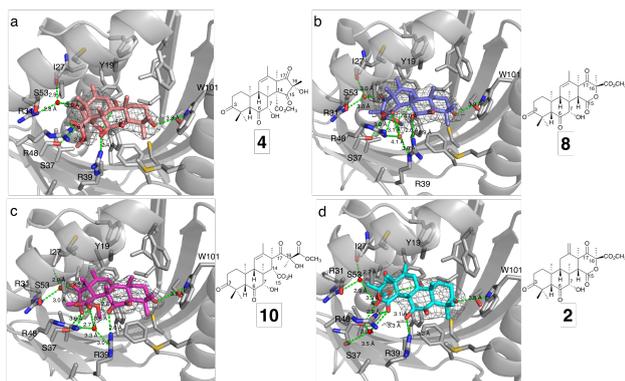


図3 基質アナログ **4** とその反応中間体と Trt14 との結合様式

次いで、基質アナログである化合物 **4** を Trt14 にソーキングし複合体構造の取得を試みたところ、驚くべきことに基質は結晶中で変換され、ソーキング時間の変化にしたがって、中間体の **8**, **10** との複合体構造が得られることが明らかとなった(図3)。これら複合体構造の比較より、基質の保持に関わるいくつかのアミノ酸が見出され、そのうち、14 位のメトキシ基と相互作用し、触媒の鍵となるアミノ酸 Tyr19、Arg39、Arg48 をそれぞれ見出すことに成功した。それぞれの部位特異的変異導入を行い、実際にそれらが活性に重要な役割を担うことが示された。

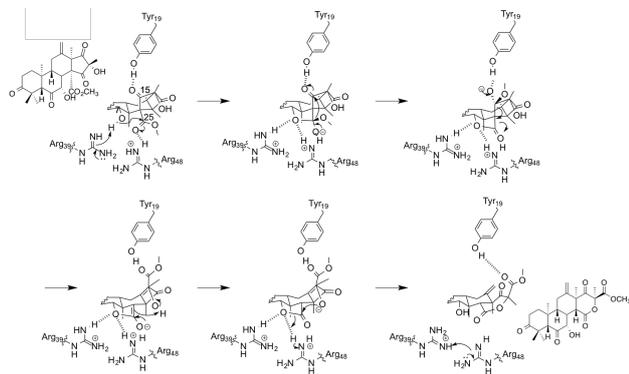


図4 結晶構造解析より推定された Trt14 の反応機構

以上の結果より、Trt14 の触媒機構について以下のように提唱した(図4)。まず、Arg39 が塩基として働き、化合物 **4** の7位の水酸基よりプロトンを引き抜き、生じた7位のアルコキシドが25位のメチルエステルに **Re-face** より求核攻撃を行い、新たにラクトン構造を形成する。中間体の15位のカルボニル基と Tyr19 が水素結合し、メトキシ基を15位の炭素原子に近接させ、その転移を触媒する。続く C14-C15 位間の解裂、C16位の水酸基からのプロトン化によるケト基への異性化、Arg48 を介した C16位の水酸基からの C25位のケト基への求核攻撃によってエステル環が再構成され、terretinin 骨格が生成する。同様の三つのアミノ酸は、AusH、PrhC にも

保存されており、類似の反応機構の存在が示唆された。本研究では糸状菌メロテルペノイドの骨格多様性を増幅する異性化酵素の触媒機構を明らかにすることに成功した。本酵素のホモログは糸状菌メロテルペノイド生合成に広く分布しており、これらを解析し、その触媒を制御し、多様なメロテルペノイド化合物の創出を行うことで、多様な生理活性を持つ化合物ライブラリーの構築が可能となる。

4 まとめ

本研究では、糸状菌メロテルペノイド由来の環拡大、加水分解などを触媒し、その複雑骨格形成に関与する新規異性化酵素 Trt14 の X 線結晶構造解析を行い、反応触媒機構の解明、機能改変を行った[1]。Trt14 と相同性を有する酵素ホモログはメロテルペノイドだけでなく、他の糸状菌二次代謝酵素遺伝子クラスターにも保存してコードされており、それらの構造解析により、糸状菌二次代謝生合成酵素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, T. Iwabuchi, S. Hoshino, H. Wang, Y. Matsuda, I. Abe, *Nat. Chem. Biol.* (2017) in press.

* abei@mol.f.u-tokyo.ac.jp