

放線菌由来インドールラクタム合成に関わる
新規酸化酵素の X 線結晶構造解析
X-ray crystal structure analysis of novel P450 from Actinomyces.

森貴裕¹, 阿部郁朗^{1,*}

¹ 東京大学薬学系研究科, 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

Takahiro Mori¹ and Ikuro Abe^{1,*}

¹ 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。この特徴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。

放線菌 *Streptomyces blastmyceticus* 由来 TleB は Teleocidine B の生合成の一部を担う P450 であり、基質 N-methyl-L-valyl-L-tryptophanol (NMVT) を環化して indolactam V (ILV) を生成する [1] (図 1)。これは有機合成では困難な C-N 結合形成反応を触媒する珍しい酵素であり、その基質許容性が高いことから、生体触媒としての応用が期待される。本研究では P450 による C-N 結合形成という特異な反応のメカニズムを X 線結晶構造解析の観点から明らかにすることで、酵素活性研究における新たな知見を獲得することを期待する。

2 実験

TleB を大腸菌に 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させ、Ni-キレート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、Na/K tartrate を沈殿剤とする結晶化条件で結晶が再現性よく得られた。TleB の結晶に対し 50 mM valindolmycin (NMVT) を 2 時間ソーキングし、X 線回折強度の測定を行った。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-BL1A) を利用した。TleB の構造は、49% の相同性を示す *Micromonospora griseorubida* MycG (2Y46) を鋳型とした分子置換法で決定した [2]。

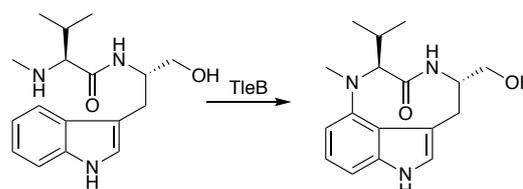


図 1 : TleB の触媒反応

3 結果と考察

TleB と NMVT の複合体構造を 1.8 Å の分解能で決定することに成功した。TleB の全体構造は他の P450 と同様な Cytochrome P450 fold を有していた (図 2)。Dali program による立体構造の相同性検索の結果、TleB は Reveromycin A 生合成中の *Streptomyces* sp. SN-593 P450rev1 (3WVS: RMSD 1.4 Å)、Griseoviridin 生合成中の *Streptomyces griseoviridis* SgpV (4MM0: RMSD 1.6 Å)、Flaviolin の縮合に関与する *Streptomyces coelicolor* Cytochrome P450 158A2 (2d09: RMSD 1.7 Å) と高い 3 次元相同性を有していた。同じインドール環の 4 位に修飾を行う *Streptomyces scabies* TxtE (4L36) とはアミノ酸配列相同性 29%、RMSD 2.6 Å を示した [3-5]。

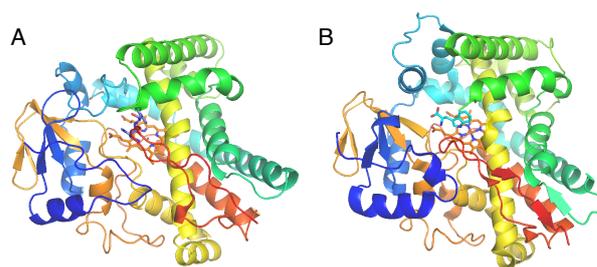


図 2 : (A) TleB の全体構造、(B) TxtE の全体構造

TleB の活性部位には Heme と NMVT が結合しており、Heme の位置は TxtE 等の他の P450 と比較して良く保存されていた (図 3)。Heme の Fe 原子は Cys347 の硫黄原子、H₂O と配位結合を形成し、Heme の propionate 側鎖は Thr286、Arg289、His92、His345 と水素結合を形成していた。反対側の methyl 基、ethyl 基の周辺は疎水性アミノ酸残基が密集し、

酵素と Heme の間で多くの水素結合と疎水性相互作用を形成することにより Heme を固定していることが明らかとなった。

NMVT は Heme の上部に位置し、Val 部分の N-methyl 基は Thr286 と水素結合を形成し (3.2 Å)、アミドカルボニルは水分子を介して Ser170、Thr239 と水素結合ネットワークを構築していた。また、Trp 部分の hydroxyl 基は Phe169 の主鎖カルボニル、Gln387 と水素結合を形成していた (2.7 Å、3.1 Å)。インドール環部分は Val231、Ala235 と疎水性相互作用を形成することにより固定されていると考えられる。

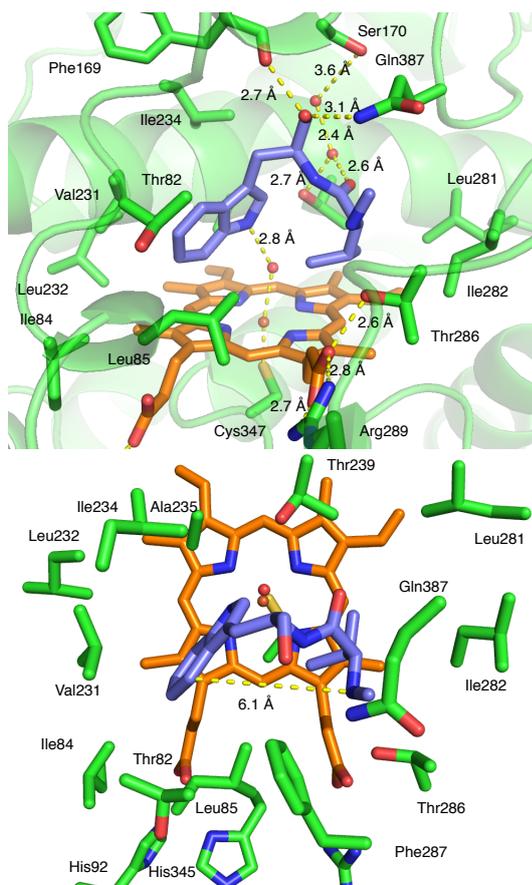


図 3. TleB の活性部位

4 まとめ

本研究では C-N 結合形成反応を行う新奇 P450 と基質の複合体構造を決定し、酵素と基質の相互作用を明らかとした。現在、結晶構造を元に、反応メカニズムを解明すべく、変異体実験を行っているところである。

参考文献

- [1] Awakawa, T., *et al.*, *JACS* **2014**, *136*, 9910.
- [2] Li, S., *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 37880.
- [3] Takahashi, S., *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 32446.
- [4] Zhao, B., *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 42188.
- [5] Yu, F., *et al.*, *PLoS One* **2013**, *8*, e81526.