

シアノバクテリア由来インドールテルペノイド合成に関わるプレニル基転移酵素の
X線結晶構造解析X-ray crystal structure analysis of two prenyltransferases responsible for
bioactive terpene indole formation in cyanobacteria

淡川孝義, 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

Takayoshi Awakawa 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。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、創薬シ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。

インドールテルペノイドは、PKC 活性化物質であるテレオシジン、血栓症治療薬エルゴタミン、抗ガン活性を持つビンブラスチン、スピロトリプロスタチンなど、多様な骨格、活性を持つ化合物を含む。アンビギュインはインドールテルペノイドであるハパルアルカロイドの一群であり、広い抗菌スペクトル、抗腫瘍活性を持ち、シアノバクテリアから単離される。アンビギュイン合成は共同研究者であるピッツバーグ大学 Xinyu Liu のグループの研究によって、その生合成経路の全容が明らかにされている [1]。本化合物ではインドリルビニルイソニトリルの三位に結合したゲラニル基が転移し、環化することで、特徴的な 6-6 員環構造を形成する。三位のゲラニル化に関わる生合成の鍵酵素が AmbP1 であり、本酵素は Mg²⁺ イオン依存的にプレニル基転移反応を触媒し、Mg²⁺ イオン非存在下では2位へのプレニル化反応を触媒することが、*in vitro* 反応によって示されている [2]。この金属イオンによるプレニル化の位置特異性の制御は興味深く、酵素の立体構造を明らかにし、その制御のメカニズムを明らかにすることによって、反応性、基質特異性の拡張に繋げることができる。AmbP1 の立体構造を元にその機能を拡張できれば、骨格多様性に富む、有用インドールテルペノイドを創出することができるため、本研究成果は学術、産業の両面から意義深い。

また、本研究ではインドールの二位のプレニル化に関わる AmbP3 [1] も研究対象とし、その構造を AmbP1 と比較することによって、それぞれの酵素のさらなる触媒能の理解に繋げることが可能となる。そこで、本研究では、AmbP1、AmbP3 の反応性、基質特異性を明らかにすることを目的とし、それぞれの X線結晶構造解析に着手した。

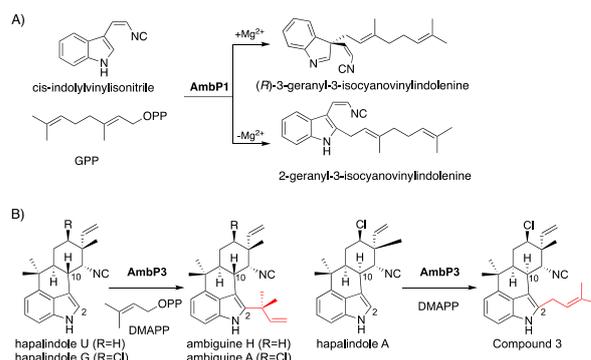


図1 AmbP1、AmbP3 の触媒するプレニル基転移反応

2 実験

大腸菌にて AmbP1 を6残基のヒスチジntag、MBP 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精製、TEV 処理による tag の除去、陰イオン交換カラム、ゲル濾過カラムを用いて精製した。また、AmbP3 を6残基のヒスチジntag 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精製、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、両者ともに、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(BL-1A, BL-17A)を利用した。それぞれの結晶構造は、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

AmbP1アポ型の立体構造を2.35 Åの分解能で得ることに成功した。その全体構造は、既知酵素と同様なABBA構造を有していた。また、基質複合体の結晶構造を取得し詳細な解析を行い、pH6.5、pH8で基質であるインドリルビニルイソニトリルとGPPアナログのGSPPをそれぞれソーキングし、基質酵素複合体を取得した。インドリルビニルイソニトリルは主に基質周辺のアミノ酸残基の疎水性相互作用によって保持されることが判明した。pH6.5の構造では、プレニル基質アナログのGSPPのC-1とプレニル基受容インドールC-2間の距離aは3.3 Åであるのに対し、GSPPのC-1とプレニル基受容インドールC-3間の距離bは4.6 Åであり、C-2位プレニル基転移反応モデルであることがわかった(図2A)。pH8.5の構造では、プレニル基質アナログのGSPPのC-1とプレニル基受容インドールC-2間の距離cは5.4 Åであるのに対し、GSPPのC-1とプレニル基受容インドールC-3間の距離dは4.6 Åであり、所望のC-3位プレニル基転移反応モデルであることがわかった(図2B)。C-3位プレニル基転位反応では、活性中心にマグネシウムイオンが配位し、その結果、E209側鎖構造が変化し、その結果、インドリルビニルイソニトリルの配向が変化することが明らかとなった[3]。

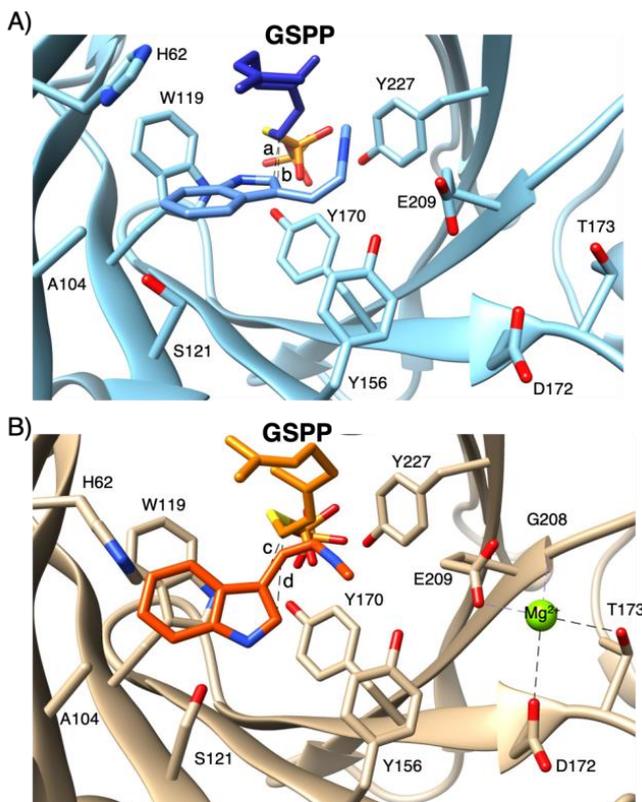


図2 AmbP1の基質酵素複合体 (A: pH 6.5 構造、B: pH8.0 構造)

AmbP3は、ハパリンインドールU (HU)の2位へジメチルアリルピロリン酸 (DMAPP)を逆プレニル化することによって、アンビグインHを生成する(図1)。興味深いことに、基質をHUのC-10立体異性体であるハパリンインドールA (HA)に置換すると、AmbP3はその触媒活性を順プレニル化へと変化させ、compound 3を与える。順プレニル化と逆プレニル化の両方を触媒するプレニル基転移酵素の結晶構造は報告されておらず、AmbP3の結晶構造解析によってプレニル基転移酵素に関する新規な知見を得ることが期待された。HUおよびHAとAmbP3の複合体結晶構造を比較することにより、AmbP3の基質への結合様式に関する知見を取得した。その結果、HU、HAの酵素への結合様式は大きく異なることが分かり、DMAPPのC-1またはC-3と基質のC-2間の距離が、二つの複合体結晶構造間で大きく異なり、その結果、二つのプレニル化様式が選択されることが明らかとなった(図3)。このHAとHUの結合様式によって、Trp117が大きく構造を変えること、また酵素活性部位内の疎水性結合が異なる様式でのプレニル化基質の受け入れを可能にすることによって、それぞれ異なる基質結合構造が実現されることを明らかにした。さらに、DMAPPのジメチルアリルカチオンがTrp117を含む、既知の酵素とは異なるアミノ酸の組み合わせであり、二つの異なる基質結合様式を可能にすることが分かった[4]。

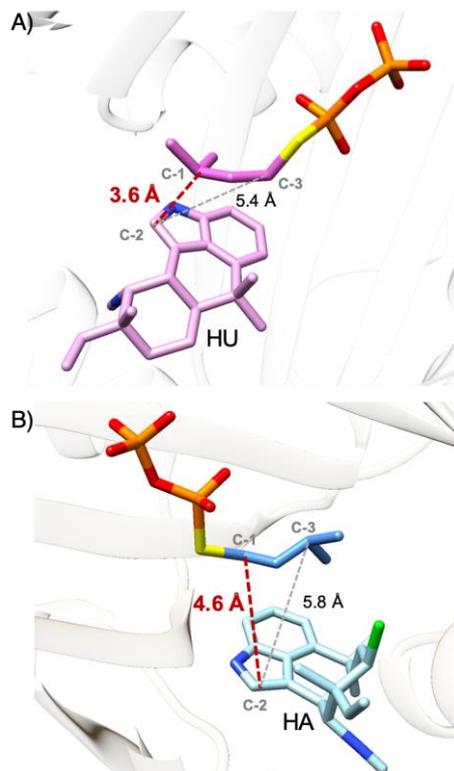


図3 AmbP3の基質酵素複合体 (A: HU、DMSPPとの複合体構造、B: HA、DMSPPとの複合体構造)

4 まとめ

本研究より、プレニル基転移酵素の基質認識をコントロールし、生物学的に有用な非天然型化合物を酵素合成するための有用な知見が与えられた。特にAmbP1の金属依存性、AmbP3の基質の立体構造の違いに応じた反応可塑性は興味深い。これらの可塑性は基質認識が主に疎水性相互作用に拠るためと考えられる。それぞれの酵素の可塑性の要因となるアミノ酸残基を他の酵素に導入することで、プレニル基転移酵素の反応リデザインへとつなげていくことが可能となる。

謝辞

本研究成果のための結晶回折データの取得にあたり、PFスタッフの方々に非常にお世話になりました。ここに感謝致します。

参考文献

- [1] M.L. Hillwig, Q. Zhu and X. Liu, *ACS Chem. Biol.* **9**, 372 (2014).
- [2] X. Liu, M. L. Hillwig, L. M. I. Koharudinb and A. M. Gronenbornb, *Chem. Comm.* **52**, 1737 (2016)
- [3] T. Awakawa, T. Mori, Y. Nakashima, R. Zhai, C. P. Wong, M. L. Hillwig, X. Liu, I. Abe, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **57**, 6810 (2018).
- [4] C. P. Wong, T. Awakawa, Y. Nakashima, T. Mori, Q. Zhu, X. Liu, I. Abe, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **57**, 560 (2018).