

糸状菌メロテルペノイド複雑骨格構築に関わる α -ケトグルタル酸依存性
ジオキシゲナーゼの構造機能解析Structure and function analysis of α -ketoglutarate dependent dioxygenase involved in
the biosynthesis of fungal meroterpenoids森貴裕¹, 阿部郁朗^{1,*}¹ 東京大学大学院薬学系研究科

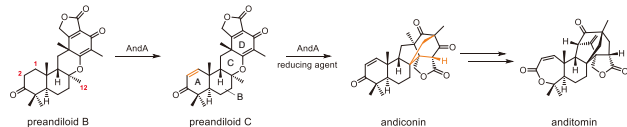
〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

Takahiro MORI¹ and Ikuro ABE^{1,*}¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033, Japan

1 はじめに

植物や微生物が生産する二次代謝産物はその構造多様性と複雑さ、高い生物活性から医薬品のリード化合物として大きな役割を担ってきた。一般に、二次代謝産物合成酵素は活性部位の微妙な違いでその反応性が大きく変化することが知られており、その反応性を人為的に拡張する事で、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になる。

糸状菌由来メロテルペノイド（ポリケタイド-テルペノイド・ハイブリッド型化合物）やセファロスポリンなどの生合成中に見出される非ヘム鉄 α -ケトグルタル酸 (α KG) 依存性ジオキシゲナーゼは、天然に広く分布しており、生合成中における酸化反応を触媒している。特に、糸状菌メロテルペノイド生合成中においては、スピロラクトン環の構築など、大規模な骨格変換を伴ったテルペン骨格の位置選択的、立体特異的酸化反応を触媒し、メロテルペノイド類の骨格多様性の構築に重要な役割を担っている [1, 2]。本研究では、糸状菌メロテルペノイド *anditomin* の生合成に関わる α KG 依存性ジオキシゲナーゼ *AndA* を取り上げ、その詳細な反応機構解析を目的として研究を行った。*AndA* は 2 段階の反応を触媒し、*preandiloid B* から *preandiloid C* を經由して *andiconin* を生成する酵素である (図 1) [1]。

図 1 : *AndA* の触媒反応

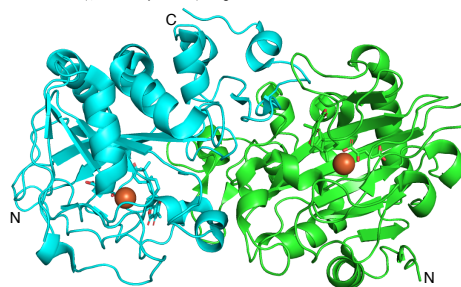
2 実験

N 末 8 残基を削った *AndA* を大腸菌に発現させ、複数のカラムを用いて精製した。精製酵素について結晶化スクリーニングを行った結果、PEG 3350 を沈殿剤として用いた条件で結晶化に成功した。PF BL-1A にて回折強度の測定を行ない、得られたデータに対して *PrhA* (PDB ID: 5YBM) を鋳型として分子置換を行なった。その結果、*AndA* のアポ体構造を

2.5 Å の分解能で解析することに成功した。また、基質や中間体との複合体構造を取得するため、嫌気条件にて結晶化した酵素に対して 5 mM FeSO₄、10 mM α KG、20 mM *preandiloid B* もしくは *preandiloid C* のソーキングを行ない、X 線測定を行なったところ、*AndA*-Fe(II)- α KG-*preandiloid B* の複合体構造を 2.25 Å、*AndA*-Fe(II)- α KG-*preandiloid C* の複合体を 1.95 Å の分解能で構造決定した。

3 結果および考察

AndA の全体構造は他のメロテルペノイド生合成に関わる α KG 依存性ジオキシゲナーゼの構造と類似していた (*PrhA*: PDB code 5YBM, 0.91 Å over 202 C α -atoms、*AusE*: PDB code 5YBL, 1.1 Å over 206 C α -atoms) [2]。活性部位においては 2His/1Asp の活性残基により鉄原子が配位しており、基質は鉄近傍に位置していた (図 2、3)。

図 2 : *AndA* の全体構造

Preandiloid B、*C* の A 環ケトン基と活性部位構成残基 *Asn121* が水素結合を形成し、D/E 環と *Glu66* の側鎖、*Lys63*、*Gln67*、*Ile70* の主鎖ケトン基が水分子を介して相互作用していた。さらに、二量体のもう片方の *Tyr272* が活性部位に突き出し、D/E 環と水分子を介した水素結合ネットワークを形成することで基質と相互作用していた (図 3)。興味深いことに、*apo* 体では 56-72 間のループの電子密度が見られず欠損しているのに対して、複合体構造においては基質と相互作用することでコンフォメーションが固定されていることが判明した。このコンフォメーション

ン変化は、基質の固定だけではなく、活性部位に疎水場を形成して水分子による副反応を抑える役割があると推定される。

α KG 依存性ジオキシゲナーゼ においては、 α KG の脱炭酸を伴った鉄原子の活性化により反応性の高い Fe(IV)オキソ中間体が生成し、基質の水素原子を引き抜くことでラジカルを発生させる[3]。すなわち、酵素が基質のどの C-H 結合を活性化するかは、どの炭素原子が活性中心に近づいているかが重要となる。そこで詳細に preandiloid B、preandiloid C の結合様式を比較したところ、preandiloid B では、C1 位が鉄に配位している α KG との距離が 3.3 Å と近く、

preandiloid C では、C12 位が 3.5 Å と近づいていることが明らかとなった。

これらの結果をもとに酵素反応メカニズムを考察すると、まず、Fe(IV)オキソ中間体によって preandiloid B の C1 位水素原子が引き抜かれることで反応が開始され、C1-C2 間の二重結合を形成する。二段階目の異性化反応においては、C12 位の水素原子が引き抜かれラジカルが生じたのちに、ラジカル転位を介した C8-O 間の開裂、C12 位と C10'位間の結合形成が進行し、andiconin の骨格が形成される。その後、ascorbate などの還元剤によりラジカルが消失することで andiconin が形成されると考えられる(図4)。

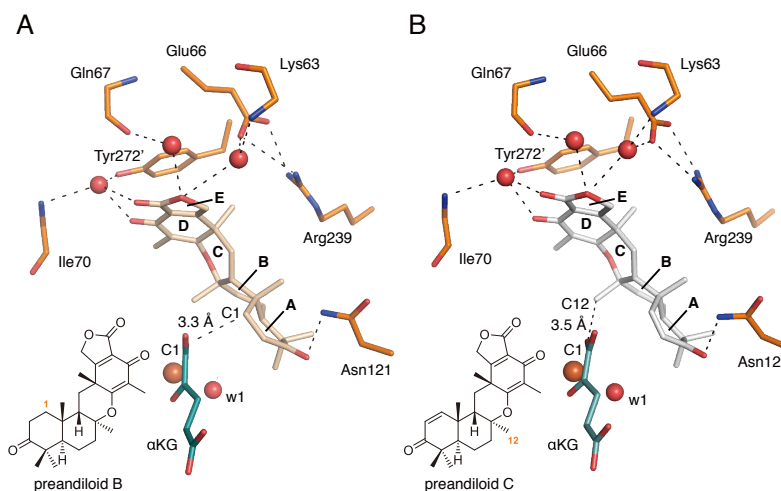


図3：AndA の活性部位構造

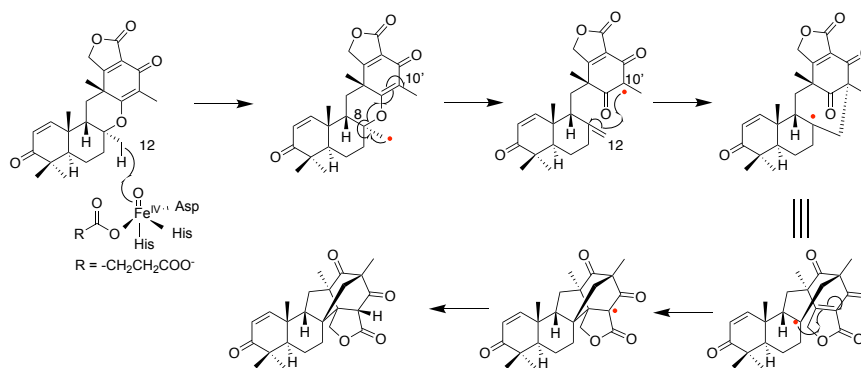


図4：AndA の推定反応メカニズム

4 まとめ

本研究ではメロテルペノイドの骨格構築に重要な役割を担う α KG 依存性ジオキシゲナーゼ AndA と基質の複合体構造を決定し、酵素と基質の相互作用をもとに反応メカニズムを提唱した[4]。今後、結晶構造を基盤とした合理的な改変により酵素反応を人為的に変化させ、非天然型新規化合物の創出を試みていく予定である。

参考文献

- [1] Y. Matsuda, *et al.*, J. Am. Chem. Soc. **136**, 15326 (2014).
- [2] Y. Nakashima, *et al.*, Nat Commun. **9**, 104 (2018).
- [3] R.P. Hausinger, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. **39**, 21 (2004).
- [4] Y. Nakashima, *et al.*, J. Am. Chem. Soc. **140**, 9743 (2018).