

糸状菌由来メロテルペノイド生合成に関与する
新規異性化酵素の立体構造解析
Structural and functional analysis of novel isomerases
in the biosynthesis of fungal meroterpenoids

森貴裕, 阿部郁朗

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 ABE¹

¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033, Japan

1 はじめに

非ヘム鉄 (II) / α -ケトグルタル酸 (α -KG) 依存性ジオキシゲナーゼは、自然界に広く分布し、一次代謝と二次代謝産物生合成の両方で様々な酵素変換を触媒している [1]。近年の糸状菌由来メロテルペノイド類の生合成研究によって、 α -KG 依存性ジオキシゲナーゼは、多くのメロテルペノイド類の構造多様化、複雑化に関与する主要酵素の一つであることが明らかになった [2]。本酵素群は、 α -KG と O_2 を補酵素として一連の酸化的変換を行う。

Novofumigatonin は、*Aspergillus novofumigatus* IBT 16806 (CBS117520) 由来のメロテルペノイド化合物であり、特徴的なオルトエステル基を有している [3]。Novofumigatonin の生合成研究から、オルトエステル基の形成には2つのジオキシゲナーゼ NvfI と NvfE が関与していることが明らかになった。これらの酵素の機能解析を行った結果、NvfI は asnovolin A のエンドペルオキシド化を触媒して fumigatonoid A を生成し、NvfE は fumigatonoid A のエンドペルオキシド異性化を触媒して fumigatonoid C を含むオルトエステル基を生成することが判明した。興味深いことに、NvfE は α -KG を副基質として利用せず、エンドペルオキシドの異性化反応を触媒することが示唆された。しかし、これらの酵素の詳細な反応メカニズムは未だ明らかとされておらず、NvfE は α -KG 結合能を失うことで異性化活性を獲得する新しいクラスの酵素に属しているのではないかと推測される。そこで本研究では、novofumigatonin の生合成機構をより深く理解するため、NvfE の生化学的特性の評価と X 線結晶構造解析に着手した。

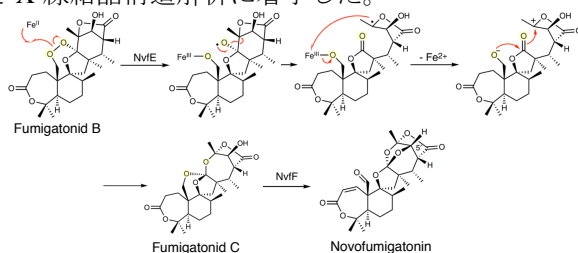


図 1 : NvfE の推定触媒反応

2 実験

NvfE を大腸菌で発現させ、精製した酵素を用いて酵素反応と結晶化を行った。400 mM potassium phosphate dibasic、1600 mM sodium phosphate monobasic、100 mM sodium phosphate dibasic/citric acid pH4.2、8% Jeffamine®-M600 の条件で、10 mg/mL の酵素を用いた際に立方体型の結晶を得た。X 線回折強度の測定の結果、アポ型 NvfE の結晶構造を 1.85 Å の分解能で得ることに成功した。

3 結果および考察

NvfE の全体構造は、AndA (PDB ID : 5ZM3) など、他のメロテルペノイド生合成に関わる Fe(II)/ α -KG 依存性ジオキシゲナーゼ (AndA は anditomin の生合成において二重結合の導入と異性化の 2 段階の反応を触媒する。) と同様な構造を有していた [4]。NvfE と AndA の活性部位を比較したところ、活性中心の 2-His-1-Asp と鉄との相互作用様式はほぼ一致していた。一方、NvfE の立体構造と、AndA/ α -KG/基質の三者複合体との主な違いは、3 つのループ領域に見出された。NvfE では、loop A (Ser70-Cys83 間) が AndA のものと比較して短く置換されていた (図 2)。

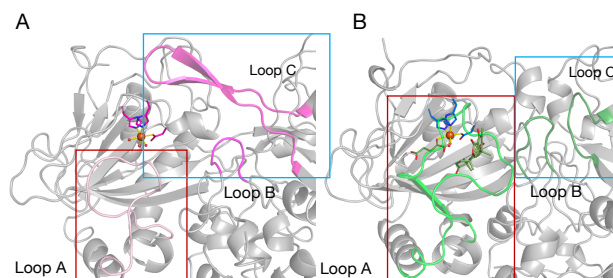


図 2 : (A) NvfE と (B) AndA のループ構造

AndA の構造解析において、基質の結合していない apo 型構造では、loop A の電子密度は見られず、複合体を形成し、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ることが明らかとなっている。しかし、NvfE の立体構造では、Y78 と E149 との相

相互作用により、基質が結合していない状態でも loop A の電子密度が観測され、コンフォメーションが固定されていることが判明した (図3)。

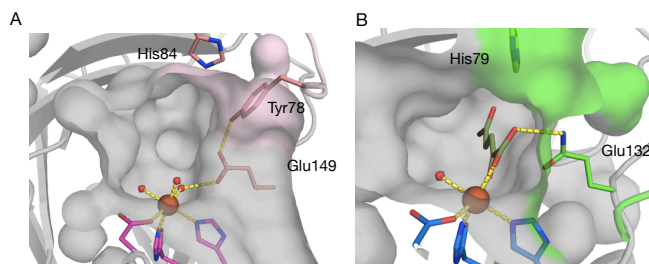


図3. (A) NvfE と (B) AndA の活性部位

さらに、隣接するモノマーからの Pro288-Gly294 間の loop B も、基質と相互作用することが知られている。NvfE においてこの loop B は、AndA や他のジオキシゲナーゼのものよりも短く置換されていた。さらに、NvfE の結晶構造では、隣接モノマーからの長い loop C が活性部位近傍に位置している。このように、これらの構造の違い、特に loop A のコンフォメーションの違いが NvfE の特徴的な基質特異性、反応性の理由の一つであると考えられる。

4 まとめ

本研究では、新規異性化酵素 NvfE の機能解析、構造解析研究により、天然においても珍しいオルトエステル形成反応の詳細な反応機構を明らかとした。現在、活性部位残基の機能をさらに理解するために、NvfE の二重・三重変異体の構築や loop 部分の改変研究が進行中である。また、ランダム変異による NvfE の基質特異性、反応性、 α -KG 依存性の改変についても試みている。今後、これらの変異酵素を novofumigatonin 生合成遺伝子クラスターを有する糸状菌に異種発現させ、非天然型新規化合物を生産するためのプラットフォームを構築する予定である。

参考文献

- [1] White, M. D., and Flashman E., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **31**, 126 (2016).
- [2] Matsuda, Y., et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **31**, 1 (2016).
- [3] Matsuda, Y., et al., *Nat. Commun.*, **9**, 2587 (2018).
- [4] Nakashima, Y., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 9743 (2018).