

# インドールテルペノイドハロゲナーゼの立体構造基盤の解明 Structural and functional analysis of alpha-ketoglutarate dependent halogenases

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 MORI<sup>1</sup>, and Ikuro ABE<sup>1</sup>

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

## 1 はじめに

インドールテルペノイドハロゲン化酵素 AmbO5 は抗菌、抗藻活性を有するハパリンドール類の生合成に関与するハロゲン化酵素であり、ハパリンドール類縁体を位置、立体選択的にハロゲン化する [1]。AmbO5 は  $\alpha$ -ケトグルタル酸 ( $\alpha$ KG) 要求性ハロゲナーゼ群の一種であるが、これまでに機能同定されてきた  $\alpha$ KG 要求性ハロゲナーゼ酵素群のほとんどは、キャリアタンパク質に共有結合で結合している化合物を受け入れ、ハロゲン化を触媒する。一方で AmbO5 はキャリアタンパク質を必要とせず低分子のインドールテルペノイドを基質として認識する。研究開始当時、このような  $\alpha$ KG 要求性ハロゲナーゼは AmbO5 の他に類縁酵素の WelO5 [2]、アミノ酸のハロゲン化酵素 BesD [3] の 2 種類しか見つかっていなかった。WelO5 と AmbO5 は 80% の相同性を有し、同様なハロゲン化反応を触媒する。しかし、アミノ酸配列が非常に似通っているにもかかわらず、AmbO5 は WelO5 と比較して広範な基質特異性を有しており、図 1 に示した化合物を全て基質として認識する。この違いがどのような要素によりもたらされるのかという構造的知見や、広範な基質特異性を利用した新規ハロゲン化化合物の創出に興味をもたれた。本研究では X 線結晶構造解析技術を利用して、ハロゲン化酵素の構造機能相関の解明と新たな酵素機能の開拓を主たる目的とした。

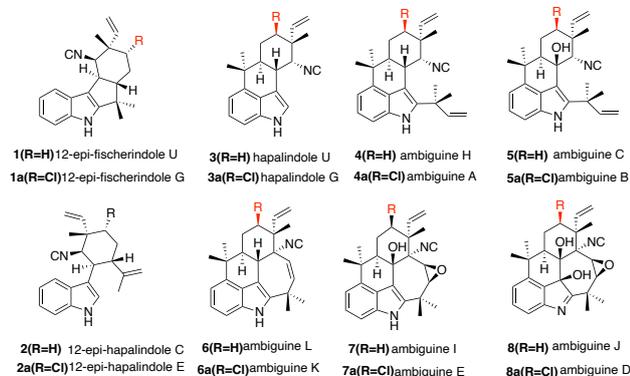


図 1 : AmbO5 の反応

## 2 実験

AmbO5 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。0.1 M tris(hydroxymethyl)-aminomethane pH 8.5, 0.2 M MgCl<sub>2</sub>, 0.12 M N/K tartrate, 12% PEG 8000 の条件で、25 mg/mL の酵素を用いた際に直方体型の結晶を得た。X 線回折強度の測定の結果、 $\alpha$ KG 結合型 AmbO5 の結晶構造を 2.8 Å の分解能で得ることに成功した。

## 3 結果および考察

AmbO5 の全体構造は、ホモログ酵素 WelO5 (PDB ID : 5IQT) と同様な構造を有していた (root mean square deviations = 1.4 Å) [2]。WelO5 と AmbO5 の活性部位残基の位置と配列を比較した結果、これらの酵素の残基は非常によく保存されており、ハロゲナーゼの特徴的な H-X-G/A モチーフの位置、配列もよく保存されていた。 $\alpha$ KG 結合型の AmbO5 構造において、活性中心の鉄原子は、His164、His259、水分子、および共基質  $\alpha$ KG によって配位されていた (図 2)。

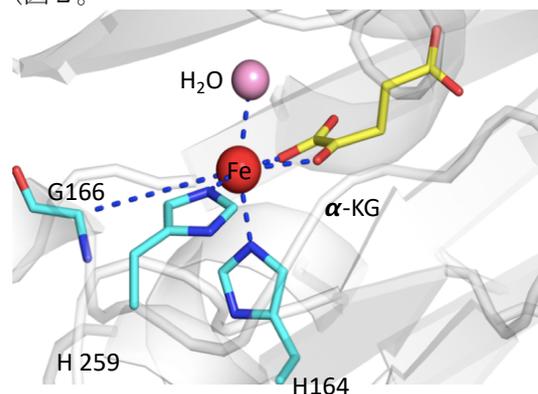


図 2 : AmbO5 の活性部位構造

AmbO5 と WelO5 の主な違いは、C 末端の  $\alpha$ -ヘリックスとそれに続くループ領域 (213 から 235 のアミノ酸配列に相当する) に見出された。この領域は、過去の AmbO5 と WelO5 のスワッピングの実験から、基質特異性に重要であると示唆されていた部分であり、AmbO5 と WelO5 の 2 つのアポ構造を比較したところ、以下の違いが明確に観察された。この部分

における AmbO5 の結晶構造内の  $\alpha$ -helix は、WelO5 の構造内の  $\alpha$ -helix よりも短く、引き続くループ部分のコンフォメーションも大きく異なっていた。

また、WelO5 のループ B(72 から 83 のアミノ酸領域)は  $\alpha$  ヘリックスを持つが、AmbO5 の対応する部分は、ループ構造を有していた (図 3)。

これらのループ A、ループ B は活性部位の近傍に位置し、これらの違いが基質特異性に重要であることが構造からも示唆された。特に、ループ A が短く、コンフォメーションも大きく異なることで、立体障害を低減し、活性部位を広げるため、AmbO5 はより広い基質特異性を示すと考えられる。現在詳細にこのループ部分の重要性を検討するため、変異解析を行なっている。

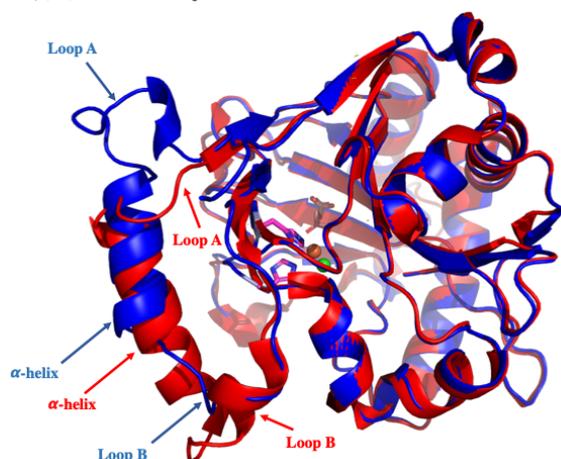


図 3: AmbO5 (赤) と WelO5 (青) の全体構造の比較

#### 4 まとめ

本研究では、ハロゲン化酵素 AmbO5 の機能解析、構造解析研究を行い、異なる基質特異性を示す WelO5 との比較から、基質特異性に重要な部分構造を提唱した。現在、活性部位残基や酵素のコンフォメーション変化を理解するために、AmbO5 と基質の複合体構造の取得が進行中である。

#### 参考文献

- [1] Hillwig, M. L. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **55**, 5780-5784 (2016)
- [2] Mitchell, A., *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, **12**, 636-640 (2016).
- [3] Neugebauer, M. E., *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, **15**, 1009-1016 (2019).