

新規ニトロ化反応触媒酵素の立体構造基盤の解明 Structural and functional analysis of nitro group forming diiron enzymes

森貴裕*, 牛丸理一郎, 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^{1*}, Richiro USHIMARU¹, 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

二核鉄酵素は、自然界に広く分布し、一次代謝と二次代謝産物合成の両方で様々な酵素変換を触媒している [1]。例えば、クラス Ia リボヌクレオチド還元酵素やメタンモノオキシゲナーゼを含むフェリチン様二核鉄酸化酵素 (ferritin-like diiron oxidases, FDO) ファミリーは 4 つのヘリックスバンドル構造を共有しており、Fe₂(II/II) 中心を活性部位に持つ。一方で、近年、ヘムオキシゲナーゼ様 (heme oxygenase like, HO) タンパク質も二核鉄を活性部位に有し、窒素原子の水酸化など多様な酸化反応を触媒することが明らかになってきている。しかしながら、そのタンパク質立体構造や触媒メカニズムは未だ不明である。

ホルマオマイシンは、*Streptomyces griseoflavus* 由来の環状ペプチド天然物であり、非タンパク質性 3-ニトロシクロプロピルアラニン (NcpA) を有している [2]。ホルマオマイシンの生合成研究から、NcpA のニトロシクロプロパン部位の形成には 2 つの非ヘム鉄酵素 HrmI と HrmJ 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、ヘムオキシゲナーゼ様酵素と相同性を示す HrmI はリシンの窒素酸素添加反応を触媒して 6-ニトロノルロイシンを生成し、 α -ケルグルタル酸依存性非ヘム鉄酵素 HrmJ は 6-ニトロノルロイシンの脱水素化を触媒して NcpA を生成することが判明した (図 1)。しかしながら、窒素酸素添加反応を触媒するヘムオキシゲナーゼ様の立体構造はほとんど報告されておらず、HrmI の詳細な反応メカニズムは未だ明らかにされていない。そこで本研究では、ホルマオマイシンの生合成機構をより深く理解するため、HrmI の生化学的特性の評価と X 線結晶構造解析に着手した。

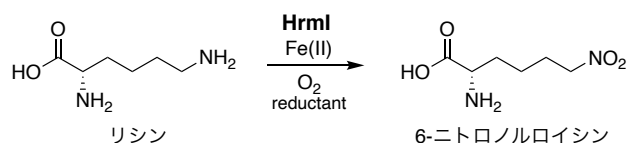


図 1 : HrmI の反応

2 実験

HrmI 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。50 mM sodium acetate (pH 4.5)、600 mM ammonium sulfate の条件で、10 mg/mL の酵素を用いた際に八面体型の結晶を得た。X 線回折強度の測定の結果、単核鉄結合型 HrmI の結晶構造を 1.8 Å の分解能で得ることに成功した。また、100 mM potassium acetate (pH 8.1)、10% w/v PEG 3350 の条件で得た結晶に対し Fe(NH₃)₂(SO₄) の希硫酸水溶液を添加することで、二核鉄結合型 HrmI 結晶構造を得た。

3 結果および考察

HrmI の全体構造は、SznF (PDB ID : 6M9S) のヘムオキシゲナーゼ様ドメイン (SznF は streptozotocin の生合成において N-メチルアルギニンの N-酸化反応と転位反応の 2 段階の反応を触媒する。) の構造と類似しており、7 つのヘリックスバンドル構造によって酵素活性部位が形成されていることが明らかとなった [3]。単核鉄型構造の場合には E218, H228, H321 によって保持されている Fe1 に対応する電子密度のみ観測され、二つ目の鉄イオンは観測されなかった。このとき、活性部位を構築する 2 本のヘリックスの間には 7 アミノ酸からなるループが観測された (図 2 A)。

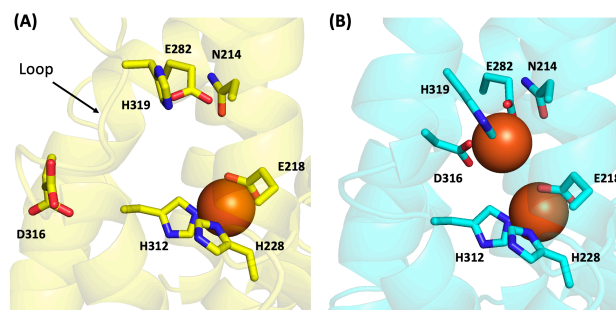


図 2 : (A) 単核鉄と (B) 二核鉄結合型 HrmI 構造

一方で、Fe(NH₃)₂(SO₄) の希硫酸水溶液を添加した時に得られた結晶構造では、二つ目の鉄イオン Fe2 が N213, E282, D316, H319 によって結合されてい

た(図2B)。Fe2に結合に伴い、ループ構造はコンフォメーション変化によりヘリックス構造を形成した。特に、単核鉄型構造において溶媒側に露出していたD316は活性部位内部に配向し、Fe2に配位していた。二核鉄の活性部位への結合に伴い、鉄の非存在化では安定なループ構造のコンフォメーション変化が誘起されヘリックス構造を形成したと考えられる。

また、7つのヘリックスバンドル構造の内部に基質結合部と考えられるキャビティーが観測された。特に二核鉄から約10–15 Å離れた場所にキャビティーを構成するR288とE185が存在し、リシンのα-アミノ酸部位を静電相互作用によって結合することが示唆された。

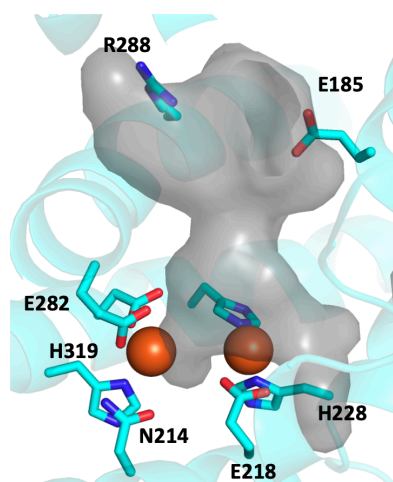


図3. HrmIの基質結合部位

4 まとめ

本研究では、新規ヘムオキシゲナーゼ様N-酸素添加酵素HrmIの構造解析研究により、二核鉄活性部位の形成におけるタンパク質の動的挙動と基質結合様式に関する新たな知見を得た。現在、活性部位残基の機能をさらに理解するために、HrmIの二重・三重変異体の構築や基質特異性の拡張についても試みている。今後、これらの変異酵素を用いて非天然型アミノ酸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] Jasniewski, et al. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 2554–2592.
- [2] Shimo, et al. *J Am Chem Soc.* **2021**, *143*, 18413–18418.
- [3] Ng, et al. *Nature* **2019**, *566*, 94–99.

*tmori@mol.f.u-tokyo.ac.jp