

天然化合物の化学構造多様性を司る酵素の結晶構造解析とエンジニアリング

富田武郎¹, 葛山智久²

¹東京大学生物生産工学研究センター, ²東京大学大学院農学生命科学研究科

X-ray structural analysis and engineering of enzymes responsible for the diversity of chemical structure of natural products

Takeo TOMITA¹, Tomohisa KUZUYAMA²

¹Biotechnology Research Center, The University of Tokyo

²Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

Abstract

天然化合物は微生物や植物等により生合成される複雑かつ多様な化学構造を持つ化合物群である。それらは多様な生物活性を示すことから医薬品, 抗生物質, 農薬等に利用されるものが多数存在し, 我々人類はそれらを有効利用している。多様な酵素が天然化合物の構造多様性を生み出すことが知られているが, 本稿では最近我々が発見した2つの鍵酵素の機能・構造解析と, そのエンジニアリングについて紹介する。

1. はじめに

1-1. 放線菌による天然化合物の生合成

放線菌は土壌を始めとした様々な環境中に生息する細菌群である。バクテリアでありながらカビのように糸状に生育し, 多様な形態分化を起こす特徴を持つ。系統的に高度に多様化した群であり, 約2200種に分類されている。放線菌の注目すべき特徴として多様な天然化合物を生産することが挙げられ, 例えばこれまで発見された抗生物質の多くは放線菌の生産物であるとされている。しかも, 放線菌が生産する多様な天然化合物の生合成には, 一次代謝経路では見られないようなユニークな生合成反応を伴うことも多い。このように「天然化合物の宝庫」ともいえる放線菌であるが, 天然化合物を生産する他の生物と比べ, 比較的培養が容易, 生育が早い, 組換え酵素の *in vitro* 実験がしやすい他, 多種のゲノム情報が蓄積してきた, 遺伝子組換えが可能である等の利点があり, 生合成経路の解明から各酵素の精密な反応機構解析に至るまでの一連の研究を行うのに非常に都合がよい。このような背景から放線菌は天然物生合成研究分野の最先端を牽引する生物群の一つであると言える。

2. ジテルペン合成酵素 CotB2

2-1. シクロオクタチン生合成における CotB2

シクロオクタチンはテルペン化合物の中でも20個の炭素原子から構成されるジテルペンに分類され, 5-8-5員環の環状構造を持つ (Fig. 1)。1992年に Aoyagi らによって放線菌 *Streptomyces melanosporofaciens* MI614-43F2 から単離・精製された化合物で, lysophospholipid の脂肪酸エステル結合を加水分解する lysophospholipase を阻害するこ

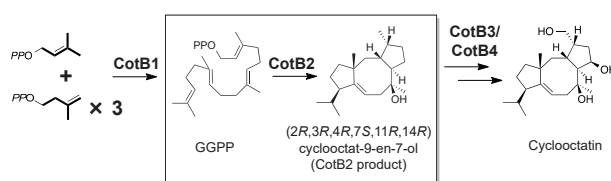


Figure 1 Biosynthetic pathway of cyclooctatin.

とから, 抗炎症活性を示すことが知られている [1]。2009年に我々のグループによって, その生合成経路が解明され, ジテルペン合成酵素 CotB2 が直鎖状の生合成前駆体であるゲラニルゲラニルリン酸 (GGPP) を基質とし, 6カ所の不斉中心の立体化学を制御しつつ5-8-5員環構造の形成を一挙に行うことが明らかとなった (Fig. 1) [2]。CotB2 がどのようにしてこのような複雑な反応を活性中心内で行っているかに興味を持たれたが, 当時ジテルペン合成酵素の立体構造は未解明であり情報に乏しかったため, 我々はその結晶構造解析に着手した。

2-2. CotB2 の結晶構造解析

大腸菌を用いて生産し, 精製した組換え CotB2 タンパク質の結晶化を行い, セレノメチオン置換タンパク質を用いた Se-SAD 法により構造決定を行った。その後, native タンパク質のリガンドフリー型構造と, 低反応性の基質アナログであるゲラニルゲラニルチオニリン酸 GGSP 複合体の構造を, それぞれ 1.8 Å 分解能で決定した (Fig. 2A) [3]。CotB2 は複数の α -ヘリックスから構成される典型的な terpene cyclase fold 構造を取っており, 二量体を形成していた。各サブユニットに1つずつの活性中

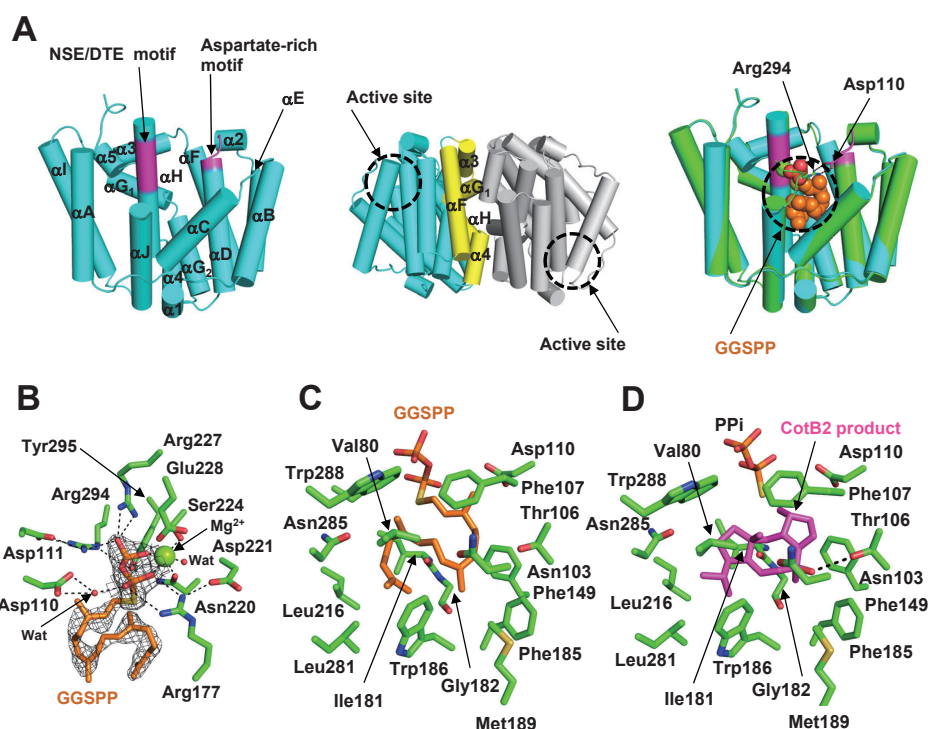


Figure 2 Crystal structure of CotB2. (A) Monomer structure (left), dimer structure (center), and GGSP-bound complex of CotB2 (right). (B) GGSP/Mg²⁺-binding site. (C) Interior of the active site recognizing 20-carbon chain of GGSP. (D) Model structure of CotB2 bound with the CotB2 product.

心ポケットが存在しており、その入り口には機能的に必須な保存モチーフであるアスパラギン酸リッチモチーフとNSE/DTEモチーフが存在していた。GGSP 複合体型構造では、GGSP が活性中心内でS字型構造に折りたたまれていた (Fig. 2B)。また、活性に必要な Mg²⁺ イオンは、GGSP の二リン酸基および水分子、NSE/DTE モチーフの Asn220, Ser224, Glu228 と正八面体配位で結合していた。アスパラギン酸リッチモチーフの Asp111 はポケットの反対側にある Arg294 とイオン結合を形成しており、この活性中心ポケットの蓋となり、外界からの水分子などの攻撃を妨げているように考えられた。アスパラギン酸リッチモチーフの Asp110 は他のテルペン合成酵素の構造比較から、2, 3 番目の Mg²⁺ を結合する役割を持ち、酵素反応の最初のステップである二リン酸と C20 のカルボカチオンへのイオン化のトリガーとなることが推測されているが、本構造ではそのような Mg²⁺ は観察されなかったことから、反応開始の一つ前段階をとらえたものと考えている。

さて、S字型に折りたたまれた20個の炭素鎖は興味深いことに複数の芳香族アミノ酸残基、疎水性アミノ酸残基、それといくつかの極性残基により取り囲まれていた (Fig. 2C)。この構造を元に CotB2 酵素反応産物であるシクロオクタット-9-エン-7-オールとのドッキングシミュレーションモデルを作製したところ、これらが2つの構造がよく似たコンフォメーションを取っていることがわかった (Fig. 2D)。このことから、本構造が CotB2 の活性中心内において表面を構成する残基は反応前に GGPP を反応産物と一部類似した初期コンフォメーションへと誘導してい

ることがわかり、反応機構を考察する上で有用な情報を提供していると考えられた。我々は別途行っていたラベル基質を用いた生化学実験から、GGPP のイオン化の後、反応産物に至るまでの反応カスケードを予想した (Fig. 3) [4]。このカスケードでは、初めに C1 位に生じたカルボカチオンが C10-C11 の π 電子の攻撃を受けることから始まり、巧妙な多段階連鎖反応により最終的に反応産物に行きつく。この間、C15, C8, C3, C6 位のカルボカチオン形成を経由するが、モデル構造においてこれらのカルボカチオンが生じる位置の近傍に芳香族アミノ酸あるいはアスパラギン残基が配置されており、それぞれ π -カチオン相互作用、双極子相互作用を形成し、カルボカチオン中間体の安定化に寄与していると推測された。以上、結晶構造解析により CotB2 が基質である GGPP を結合して外界から隔離した後、GGPP のイオン化による反応開始に続き、活性中心内での反応初期コンフォメーションの決定と、カルボカチオン中間体の安定化といった一連の流れにより精巧な酵素反応を達成していることのアウトラインを垣間見ることができた。なお、このシクロオクタット-9-エン-7-オールへの複雑で多段階からなる骨格形成反応は、全部で12個の遷移状態を経て生成すること、大きな活性化エネルギーを必要とするステップは無く、室温条件下で円滑に反応が進行すること、反応全体で約 40 kcal/mol の大きな安定化が起こることが、密度汎関数 (DFT) 法による各中間体および遷移状態の構造最適化とポテンシャルエネルギー計算によってわかっている [5]。

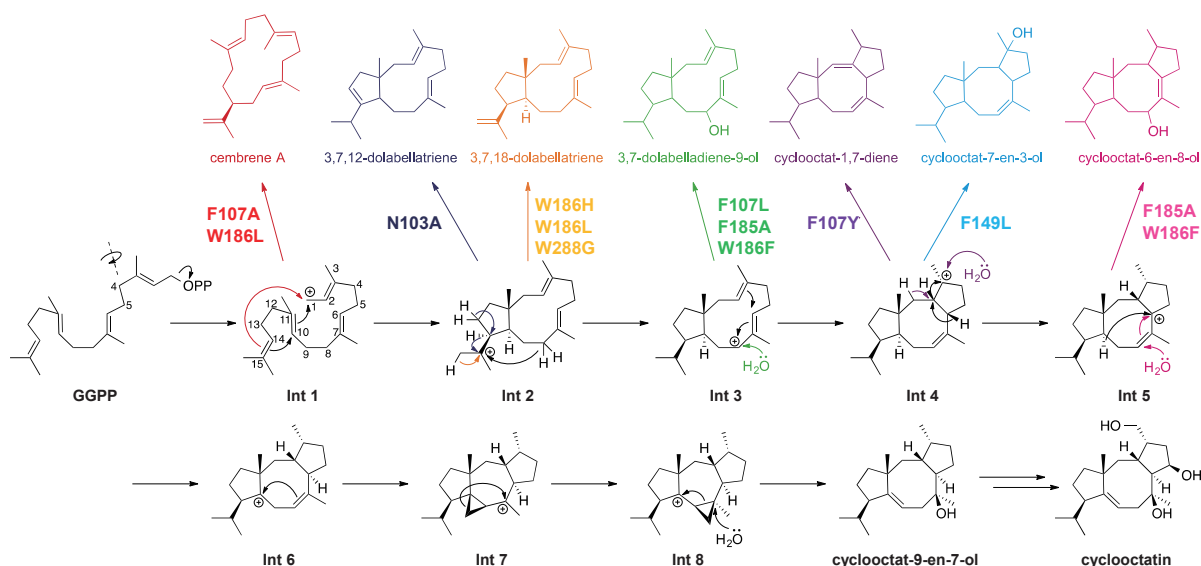


Figure 3 Proposed reaction mechanism of CotB2, and compounds produced via detailed reactions by the CotB2 variants.

2-3. CotB2 の活性中心のエンジニアリング

我々は、結晶構造から得られた推定反応機構と CotB2 の活性中心に関する情報を用いて、反応産物の構造制御ができないか試みた。活性中心の芳香族アミノ酸やアスパラギン残基がカルボカチオンの安定化に寄与していることが推察されたが、我々はこれらを疎水性アミノ酸等に置換することで、芳香族アミノ酸残基の役割を証明すると同時に反応産物を別の狙った化合物へと変化させることができないか実験を行った。その結果、Fig. 3 で示すようにアミノ酸置換によって本来の反応産物であるシクロオクタット-9-エン-7-オールとは異なる構造の反応産物を得ることに成功した。この結果は、芳香族アミノ酸残基が実際に各部位でのカルボカチオンの安定化に寄与していることを支持するものである。例えば、Asn103 残基は C8 位のカルボカチオンの安定化を行っていると考えられるが、これを Ala 残基に置換した N103A 置換体では中間体 Int 2 から C8 位にカルボカチオンを持つ中間体 Int 3 へ進むことができず、近傍にあるヒドリドによるカルボカチオン消去で反応

が停止し、3,7,12-ドラベラトリエンが生成したと考えられる。

近年、多様な生物のゲノム情報が蓄積しつつあり、CotB2 以外のテルペン合成酵素を *in silico* で探索することが可能になってきている [6]。このような探索とウェットな実験での機能証明により新たな化学構造を持つテルペンを合成する酵素が発見されつつある。これらテルペン合成酵素間のアミノ酸配列相同性は低いものの、酵素の基本構造は類似していると予想されることから、今回紹介した CotB2 に関する構造機能研究は、多様なテルペン合成酵素がどのようにして多様な化学構造を持ったテルペンを作り分けているのかを明らかにしていく上での一つの道標を提示したと考えている。

3. カルバゾール骨格形成に関わる環化酵素 CqsB2

3-1. カルキノスタチン生合成における CqsB2

カルキノスタチン A は放線菌 *Streptomyces exfoliatus* 2419-SVT2 から単離された抗酸化作用を示すカルバゾール

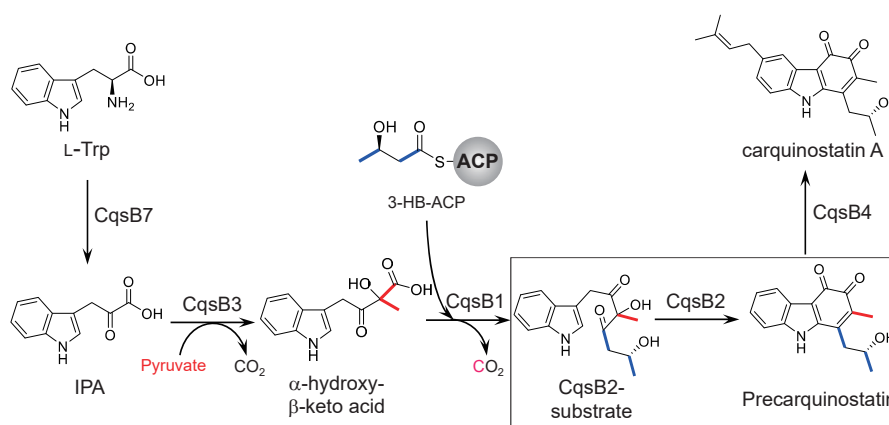


Figure 4 Biosynthetic pathway of carquinostatin A.

アルカロイドである (Fig. 4) [7]。本化合物は、細胞内でフリーラジカル除去剤として働くと考えられており、脳虚血後の神経保護剤や神経変性疾患抑制剤のリード化合物として期待されている。

カルバゾール骨格の生合成に必要な環化反応を触媒する酵素は、インドロカルバゾール生合成における StaP やシアマイシン生合成に関与する XiaI など、ごく少数の酵素が見つかったのみである [8, 9]。そこで我々はカルキノスタチン生合成に関わる遺伝子クラスターを同定し、化合物の異種生産と各生合成遺伝子の欠失、各生合成酵素の生化学解析に基づいてカルキノスタチンの生合成経路を解明し、カルバゾール骨格合成酵素 CqsB2 の機能的特徴を明らかにした (Fig. 4) [10]。その結果、CqsB2 は不安定な生合成中間体上のアシル側鎖部位を環化してカルバゾール中間体 (プレカルキノスタチン) のオルトキノン含有 A 環を形成するというカルバゾール生合成の鍵となる反応を担うことがわかった。CqsB2 はこのような複雑な反応を補因子の補助なしに行っている。我々はこの前例のない酵素反応の反応機構を探るべく結晶構造解析を行うこととした。

3-2. CqsB2 の結晶構造解析

大腸菌を用いて生産し、精製した組換え CqsB2 タンパク質の結晶化を行い、セレノメチオニン置換タンパク質を用いた Se-SAD 法により構造決定を行った。その後、native タンパク質のリガンドフリー型構造と、CqsB2 反応産物であるプレカルキノスタチンとの複合体の構造を、そ

れぞれ 2.1 と 2.2 Å の分解能で決定した (Fig. 5A)。プレカルキノスタチンは放線菌の遺伝子破壊株 ($\Delta cqsB4$) に生産させ、各種クロマトグラフィーによって精製することで調製した。CqsB2 は N 末端アーム (Ser2~Gly57) と C 末端コアダメイン (Gln58~Gly222) から構成されており、同一のサブユニット 2 つからなる二量体構造を取っていた。類似構造検索の結果、CqsB2 の C 末端コアダメインは *Streptomyces glaucescens* 由来の TcmN ARO/CYC や、*Streptomyces coelicolor* A3(2) 由来の WhiE-OrfVI と類似していることがわかった。

プレカルキノスタチン複合体構造は、リガンドフリー型構造とよく似ていた。プレカルキノスタチンは C 末端コアダメインの裂け目に結合しており、そこへ別サブユニットの N 末端アームが覆いかぶさることでポケット内に埋もれていた (Fig. 5A)。ポケット内でプレカルキノスタチンは多くの疎水性残基、極性残基、荷電残基によって取り囲まれていた (Fig. 5B)。CqsB2 の基質である不安定な生合成中間体と共通のインドール環部は Leu83, Trp86, Ile90, Ile115, Tyr130, Tyr144 等による疎水相互作用により認識されていた一方で、反応により新たに形成されるオルトキノン環部分の周辺には疎水性残基だけでなく、His206, Cys132 のような極性残基や Glu105, Glu209 のような荷電残基が存在していたため、これらの残基が触媒反応に重要な役割を果たしていることが推測された (Fig. 5B)。

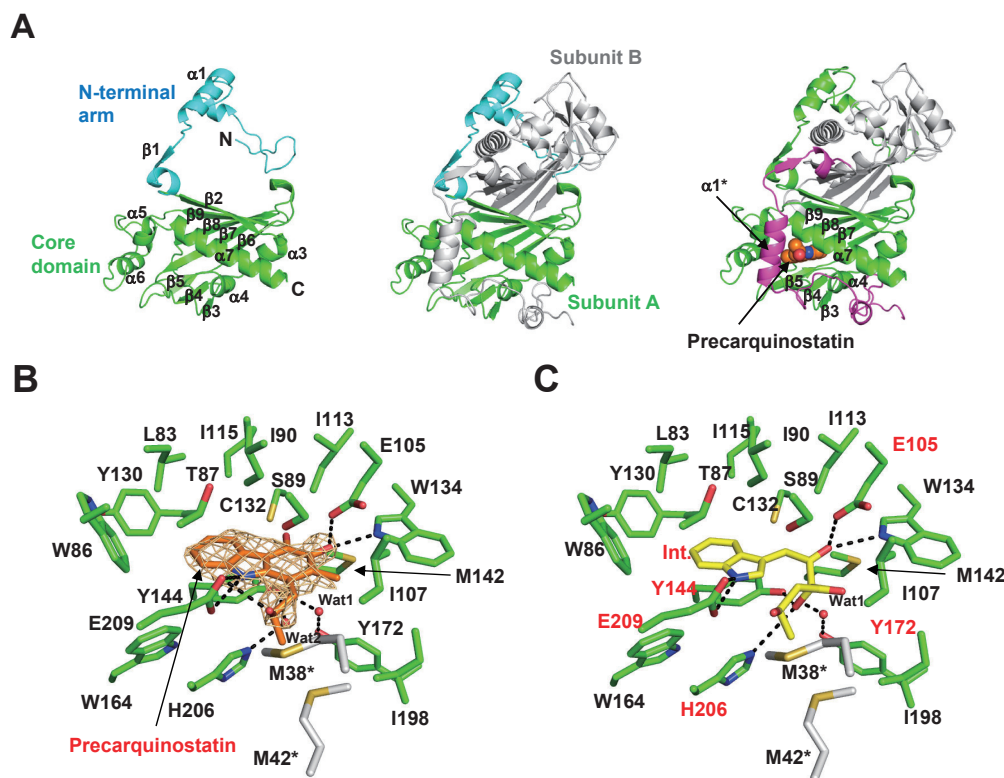


Figure 5 Crystal structure of CqsB2. (A) Monomer structure (left), dimer structure (center), and Precarquinostatin A-bound complex of CqsB2 (right). (B) Precarquinostatin A-binding site. (C) Model structure of CqsB2 bound with the substrate.

3-3. CqsB2 の反応機構解析

CqsB2 の反応機構に関する手がかりを得るために、まずプレカルキノスタチン複合体構造を基に CqsB2 基質との複合体ドッキングモデルを作製した (Fig. 5C)。次に、この構造から重要と考えられたアミノ酸残基の変異体解析を行った。その結果、E105Q/A, Y144A, H206A, E209Q/A 変異体は活性を示さないことがわかった [10]。また、Y172F は顕著な活性低下を示した。このことから、これらの残基が触媒活性に重要な役割を果たしていることが示された。これらの変異体解析と立体構造上の位置関係から、我々は Fig. 6A に示すような推定反応機構を提示した。CqsB2 は基質をその活性中心に結合後、Tyr144, Tyr172 に配位した水分子によるプロトンの引き抜き、Glu105 によるエノラートの安定化、C4a-C9a の π 電子による C1 カルボニルへの攻撃による環形成を促進する。続いて、His206, Glu209 によるオキシアニオンへのプロトン供与、His206 に配位した水分子によるプロトンの引き抜き、C1-C9a での二重結合形成、C1 での脱水が起こる。C2 ヒドロキシ基のプロトン化とともに C4 への水分子の攻撃により芳香族環が形成され、それに伴って C2 における脱水が起こる。最後にケト-エノール互変異性によりカテコール部位を有する還元型プレカルキノスタチンが生成し、好気条件下では自動酸化によりプレカルキノスタチンへと変換される。

3-4. カルキノスタチン類縁体の化学構造多様性の拡張

次に、この生合成系がカルバゾール化合物の構造多様性の拡張に応用できないか試みた。我々は、3つの生合成酵素 CqsB3/1/2 を用いた *in vitro* 酵素反応により、インドールピルビン酸 (IPA) およびピルビン酸、3-ヒドロキシブチリル ACP (3-HB-ACP) からプレカルキノスタチンを合成することに成功していたが、ここで使用する基質を構造の異なるものに置換して同様の実験を行った。その結果、オルトキノロン環上の官能基が伸長した新奇カルバゾール化合物を創出することに成功した (Fig. 6B)。このことは CqsB3/1/2 各酵素が構造の異なる基質を受け入れ、反応しうることを示しており、今後酵素機能改変等を通してカルバゾール化合物の構造多様性や生物活性を創出することが期待される。

4. おわりに

放線菌は多様な天然化合物を生産している。我々は、これらの生合成の鍵となる酵素を発見し、その詳細解析を行い、機能改変・応用へと繋げることを目指している。本稿では、最近行った研究のうち2つの実施例を紹介した。それらはいずれも、シンプルな直鎖状構造を決まった複雑な環構造へと導くものであり、そこには高度に洗練された反応機構が存在している。結晶構造解析は酵素による反応機構を明らかにするためのきわめて強力な手段であり、最近

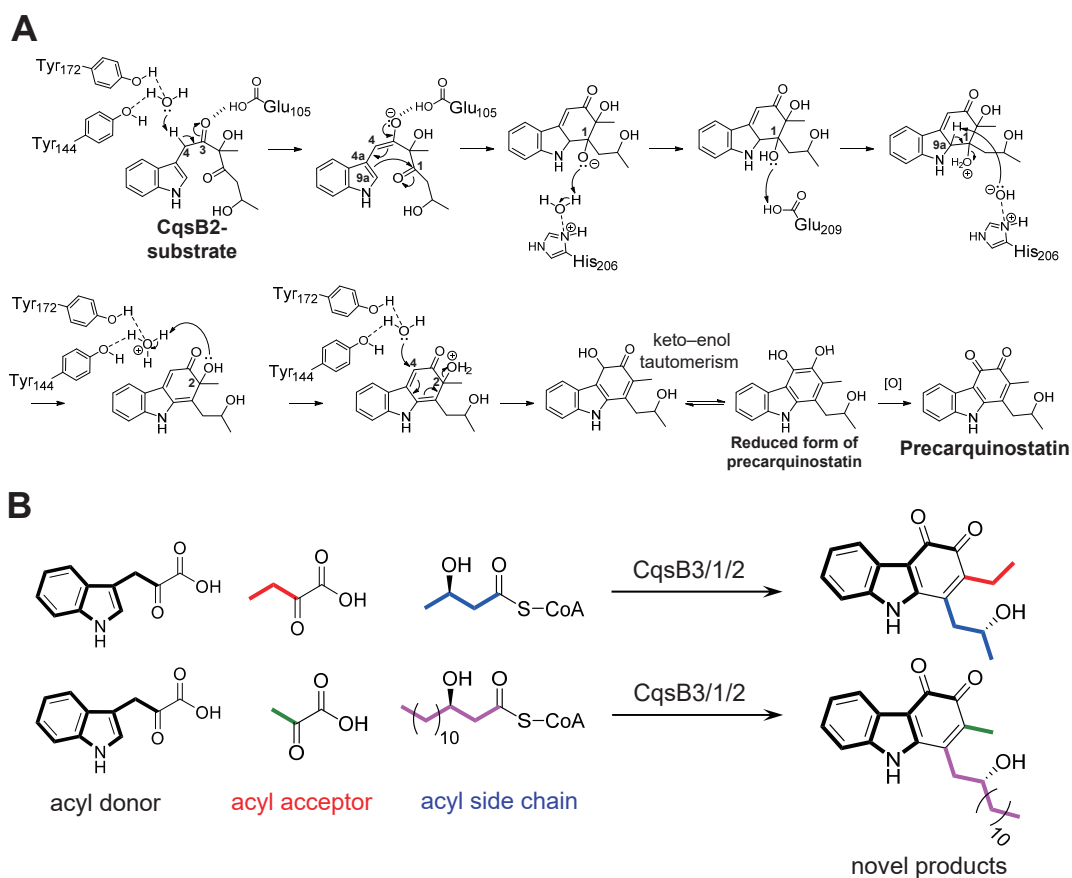


Figure 6 (A) Proposed reaction mechanism of CqsB2. (B) Chemo-enzymatic synthesis of novel carbazole compounds by *in vitro* CqsB3/1/2 reaction.

は結晶構造をベースとした計算化学解析を行うことで、より精密な議論をすることも可能になってきている [11]。自然界にはいまなお生合成経路が未解明の天然化合物が多く存在しており、複雑な化学構造を形成するためのユニークな酵素が山のように埋もれていると考えられる。これら酵素一つ一つの発見を化学構造多様性の拡張まで応用展開させることが、そう難しいことではない時代が近づいてきている。

5. 謝辞

本研究を行うにあたり、KEK-PFのスタッフの方々には大変お世話になりました。皆様にご心より深く御礼申し上げます（放射光共同利用実験課題番号 2010G004, 2012G019, 2014G106, 2016G162, 2018G047）。この研究は、科学研究費助成事業の新学術領域研究（研究領域提案型）「生物活性物質構造多様性創出システムの解明と制御」と「生物合成系の再設計による複雑骨格機能分子の革新的創成科学」の助成を受けて行われました。

引用文献

- [1] T. Aoyagi, T. Aoyama, F. Kojima, S. Hattori, Y. Honma, M. Hamada, and T. Takeuchi. *J. Antibiot.* **45**, 1587 (1992)
- [2] SY. Kim, P. Zhao, R. Sawa, T. Tomita, M. Nishiyama and T. Kuzuyama. *Chem. Biol.* **16**, 736 (2009).
- [3] T. Tomita, SY. Kim, K. Teramoto, A. Meguro, T. Ozaki, A. Yoshida, Y. Motoyoshi, N. Mori, K. Ishigami, H. Watanabe, M. Nishiyama, and T. Kuzuyama. *ACS Chem. Biol.* **12**, 1621 (2017).
- [4] A. Meguro, Y. Motoyoshi, K. Teramoto, S. Ueda, Y. Totsuka, Y. Ando, T. Tomita, SY. Kim, T. Kimura, M. Igarashi, R. Sawa, T. Shinada, M. Nishiyama, and T. Kuzuyama. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **54**, 4353 (2015).
- [5] H. Sato, K. Teramoto, Y. Masumoto, N. Tezuka, K. Sakai, S. Ueda, Y. Totsuka, T. Shinada, M. Nishiyama, C. Wang, T. Kuzuyama, and M. Uchiyama. *Sci. Rep.* **5**, 18471 (2015).
- [6] Y. Yamada, T. Kuzuyama, M. Komatsu, K. Shin-ya, S. Omura, D. E. Cane, and H. Ikeda. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **112**, 857 (2015).
- [7] K. Shin-ya, M. Tanaka, K. Furihata, Y. Hayakawa, and H. Seto. *Tetrahedron Lett.* **34**, 4943 (1993).
- [8] A. Howard-Jones, and CT. Walsh. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 12289 (2006).
- [9] H. Li, Y. Sun, Q. Zhang, Y. Zhu, S. Li, A. Li, and C. Zhang. *Org. Lett.* **17**, 306 (2015).
- [10] M. Kobayashi, T. Tomita, K. Shin-ya, M. Nishiyama, and T. Kuzuyama. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **58**, 13349 (2019).
- [11] K. Raz, R. Driller, T. Bruck, B. Loll, and D.T. Major. *Beilstein J. Org. Chem.* **16**, 50 (2020).

(原稿受付日：2020年6月17日)

著者紹介

富田武郎 Takeo TOMITA



東京大学 生物生産工学研究センター
特任准教授

〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

TEL: 03-5841-3069

FAX: 03-5841-8030

e-mail: uttomi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

略歴：2000年東北大学理学部化学科卒業、

2006年東京大学大学院農学生命科学研究科博士課程修了、
博士（農学）取得、2006年東京大学生物生産工学研究センター研究機関研究員、2006年同助手、2008年同助教、
2020年現職

最近の研究：栄養シグナルによる微生物の代謝中枢の調節機構

趣味：ストレッチ、ジョギングによる代謝活性化

葛山智久 Tomohisa KUZUYAMA



東京大学 大学院農学生命科学研究科
教授

〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

TEL: 03-5841-3080

FAX: 03-5841-3080

e-mail: utkuz@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

略歴：1990年東京大学農学部農芸化学
科卒業、1995年東京大学大学院農学生命科学研究科応用
生命化学専攻博士課程修了、博士（農学）取得、1995年
東京大学分子細胞生物学研究所助手、2003年文部科学
省長期在外研究員（米国 The Salk Institute for Biological
Studies）、2004年東京大学生物生産工学研究センター助教
教授、2007年同准教授、2019年現職

最近の研究：生物活性天然化合物の生合成研究

趣味：旅行、ドライブ