

糸状菌由来メロテルペノイド生合成酵素の探索と酵素を利用した物質生産

森 貴裕

東京大学大学院 薬学系研究科

研究成果

非ヘム鉄/ α -ケトグルタル酸 (α -KG) 要求性ジオキシゲナーゼは自然界に広く分布しており、一次代謝・二次代謝の両方で様々な酵素変換を触媒している。本研究では、 α -KG を補酵素として利用せずに異性化反応を触媒するメロテルペノイドジオキシゲナーゼ、NvfE の機能解析・構造解析研究を行った。その結果に基づき、NvfE 触媒によるオルトエステル形成反応の詳細なメカニズムを明らかとした。

研究の目的

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 O₂ 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。また、他の α -KG 依存性ジオキシゲナーゼとの結晶構造および配列比較をもとに、精密酵素解析および変異実験を行った。

方法

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 分解能で得ることに成功した。

結果

まず、酵素の金属依存性を調べるために、野生型 NvfE を fumigatonoid A と共に Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} などの様々な金属イオンを添加し *in vitro* 酵素反応を行った。その結果、 Fe^{2+} の添加時のみ異性化反応が進行し、NvfE の活性には Fe^{2+} が必須であり、他の金属イオンでは置換できないことが明らかとなった。

さらに反応機構を理解するため、NvfE の X 線結晶構造解析を行った。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 $\text{Fe(II)}/\alpha\text{-KG}$ 依存性ジオキシゲナーゼ (AndA は anditomins⁴ 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。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/ $\alpha\text{-KG}$ /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。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。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。

NvfE が $\alpha\text{-KG}$ を副基質として必要としない理由をさらに解明するために、変異実験を行った。まず、Y78A、Y78F、E149Q、および二重変異体 Y78F/E149Q を作成し、酵素反応を行った。意外なことに、これらの変異体は、野生型酵素と比較して活性がわずかに低下する

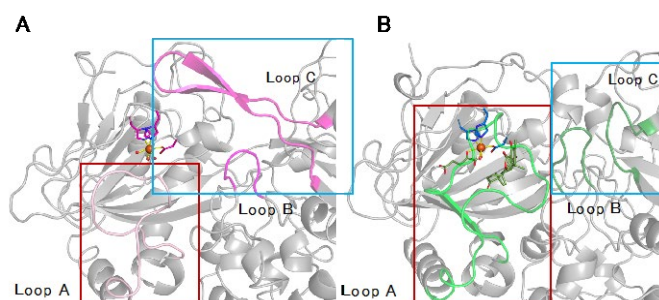


Fig 1. The loops of (A) NvfE and (B) AndA

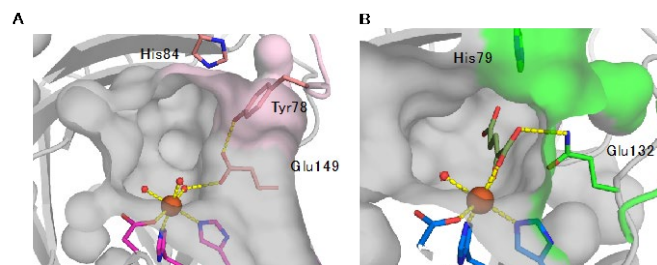


Fig 2. Active site pockets of (A) NvfE and (B) AndA

のみであった。これらの結果から、Y78 と E149 との相互作用だけでなく、他の相互作用も重要であることが示唆された。そこで、活性部位に存在する極性アミノ酸残基 D76A、D135A、S136A、S140A、S177A、Y226A、E261A の変異体を作成し、酵素反応を行なった。その結果、全ての変異体は野生型酵素と同等の活性を示した。これらの結果から、単一変異体では十分ではなく、複合的にコンフォメーションの固定が起きていること、活性部位残基は触媒活性に必須ではないことが示唆された。したがって、NvfE の酵素としての機能は、基質のエンドペルオキシド部位を鉄中心に近い位置に配置して、エンドペルオキシド結合の切断と異性化を行うことであると考えられる。

以上の結果より、NvfE が触媒する反応機構を以下のように考察した。この反応では、まず活性中心に固定させている Fe(II)が酸素と結合して O-O 結合が切断され、酸素上にラジカルが生成する。その後 β 開裂反応を経て C3'位にラジカルが転位する。最後に、Fe(III) による酸化によってカルボカチオンが形成し、閉環することで fumigatonoid C を生成する。

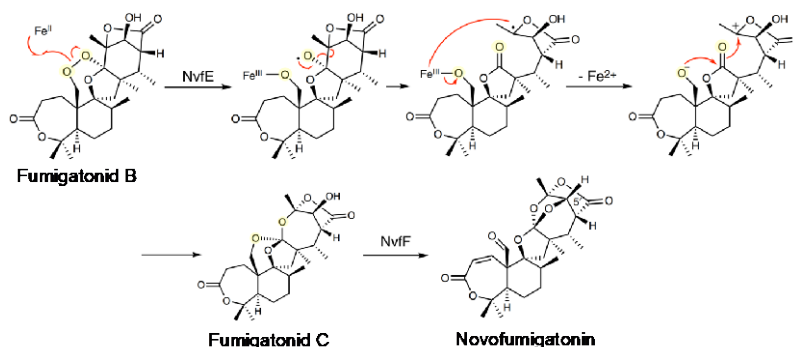


Fig3. Proposed reaction mechanism of NvfE

結論

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。

文献

1. White, M. D., and Flashman E., (2016) Catalytic strategies of the non-heme iron dependent oxygenases and their roles in plant biology. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **31**: 126-135.
2. Matsuda, Y., *et al.*, (2016) Unusual chemistries in fungal meroterpenoid biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **31**: 1-7.
3. Matsuda, Y., *et al.*, Novofumigatonin biosynthesis involves a non-heme iron-dependent endoperoxide isomerase for orthoester formation. (2018) *Nature Commun.*, **9**: 2587.
4. Nakashima, Y., *et al.*, (2018) Structural and computational bases for dramatic skeletal rearrangement in anditomin biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **140**: 9743-9750.