

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16034

研究課題名(和文)天然物生合成に関与する同一部位多段階酸化型シトクロムP450酵素の反応機構と制御

研究課題名(英文) Reaction mechanism and regulation of the same-site multistep oxidative cytochrome P450 enzymes involved in natural product biosynthesis

研究代表者

飯坂 洋平 (Iizaka, Yohei)

東邦大学・薬学部・講師

研究者番号：40770425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：単一酵素でありながら酸化反応を複数回触媒する多機能型のシトクロムP450酵素(P450)は、抗生物質をはじめとする天然化合物の構造と生物活性の多様性を生み出す魅力的な酵素である。本研究では、マクロライド系抗生物質の生合成で基質同一部位を3段階酸化修飾するP450 RosCを対象として、野生型と最初の酸化反応だけを触媒する変異体との基質親和性とX線結晶構造の比較解析により、RosCが多段階の酸化修飾を可能とする、またその反応を制御する要因の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

野生型RosCと変異体の結晶構造解析により多段階酸化修飾に重要なP450の立体構造を見出すことが出来た。本結果は、多機能型P450を目的の反応だけ触媒するように制御できる可能性を示し、工業的にも重要な多機能型P450を利用した目的物質の選択的且つ効率的な生産に貢献することが期待される。また、本成果に基づいて基質を1回のみ酸化修飾する大多数のP450を多機能型P450へと機能改変することで、新たな有用物質の創出にも繋がる。

研究成果の概要(英文)：Multifunctional cytochrome P450 enzymes, which catalyze multistep oxidation reactions, are advantageous for diversifying the structure and bioactivity of compounds because a single enzyme can carry out multiple structural modifications. In this study, we focused on P450 RosC, which iteratively oxidize a single site in a substrate during the biosynthesis of the macrolide. Comparative analysis of the substrate affinity and X-ray crystal structure between the wild type and a mutant that catalyzes only the first oxidation reaction revealed some of the factors that enable and regulate the multistep oxidative modification reaction.

研究分野：微生物化学

キーワード：シトクロムP450酵素 多機能型P450酵素 生合成 マクロライド系抗生物質 結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

微生物由来の P450 は天然化合物の生合成に関わる水酸化をはじめとしたエポキシ化、脱アルキル化、脱水素化、C-C/C-N 結合の形成や C-C 結合の開裂など 20 種類以上の多様な酸化反応を触媒し、天然化合物の構造と生物活性の多様性の一端を担っている。多くの P450 は基質に対してこれらの反応を一度だけ触媒するが、酸化反応を複数回触媒して多機能性を示す P450 も存在する。多機能型 P450 は天然物の生合成において複数の官能基を形成することから、生体触媒等への利用においては化学構造の多様性を導く大きな利点を有している。一方で、目的とする化合物が多段階反応の中間体である場合には、更なる修飾により目的化合物の生成が一過的となり、効率的な生産という側面からは欠点と成り得る。

多機能型 P450 は基質の異なる部位を多段階修飾するものと基質同一部位を多段階修飾するものに大別される¹⁾。前者のいくつかの P450 は最初の反応で生じた基質構造の変化により P450 の活性中心への基質の配置が変わり、異なる部位への修飾が生じることが報告されている。しかしながら、基質同一部位の多段階酸化修飾を可能とするメカニズムは報告されていなかった。基質同一部位多段階酸化型 P450 は植物ホルモンや化学伝達物質の生合成に関与する真核生物由来の P450 にも存在する。基質構造が全く異なるものでも、これらは修飾部位が第 1 級炭素であればヒドロキシ基、ホルミル基、カルボキシ基を形成する 3 段階の酸化反応を、第 2 級炭素であればヒドロキシ基、カルボニル基を形成する 2 段階の酸化反応が生じる点で共通している。そのため、基質同一部位での多段階酸化修飾を可能とする共通の機構が存在すると考えられた。

放線菌 *Micromonospora rosaria* IFO 13697 が生産するマクロライド系抗生物質 rosamicin の生合成において、P450 RosC は抗菌活性に影響するラクトン環 C-20 位の 3 段階の酸化反応を触媒する (図 1)^{2,3)}。RosC ランダム変異体のスクリーニングと部位特異的変異導入によるアミノ酸置換変異体の解析により、1 段階目の水酸化の触媒能を保持しつつ、2 段階以降の酸化反応を触媒しない変異体が見られ、RosC の多段階酸化反応はアミノ酸残基の置換により制御できることが示された (図 2)⁴⁾。

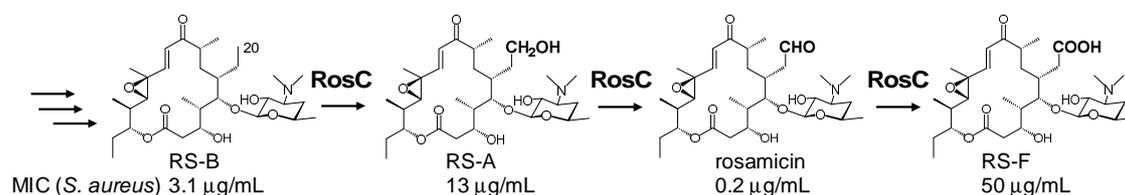


図 1 Rosamicin 生合成における RosC の 3 段階の酸化反応と最小発育阻止濃度 (MIC)

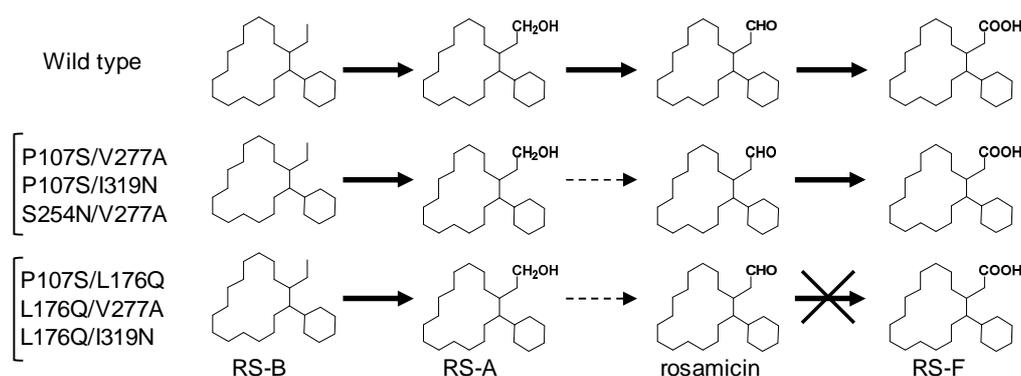


図 2 変異型 RosC が触媒する反応

2. 研究の目的

多機能型 P450 は生物活性の変化を伴う天然化合物の構造の多様化に大きく貢献する。また、多機能型 P450 の酸化反応を自由に制御することができれば、反応経路を集約させて目的化合物を効率的に生産させることに繋がる。基質同一部位多段階酸化型 P450 である RosC は、1 段階目の酸化反応のみを触媒する変異体が見られた。この変異体の取得は RosC の多段階酸化反応が制御できることを科学的に実証しただけでなく、酵素機能解析で有効な比較解析を行うことを可能にした。そこで本研究では、一度修飾した部位の再修飾を可能とする基質同一部位の多段階酸化反応の機構とその制御の仕組みを解明することを目的として、RosC とその変異体を研究対象に酵素特性解析と結晶構造解析に基づく詳細な機能解析を行った。

3. 研究の方法

(1) RosC 及び変異体の異種発現と精製

大腸菌による RosC と変異体の異種発現には pET system を用いた。本システムで発現したタンパク質の N 末端側には His-tag が付加されることより、タンパク質の発現を誘導した大腸菌を超音波破碎した後、Ni-NTA カラムによるアフィニティ精製を行った。結晶構造解析に供する試料は、トロンピン消化した後、Ni-NTA カラムに非吸着の画分を回収することで His-tag を除去した。さらに、陰イオン交換クロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーに供して純度を向上させた。RosC と変異体の濃度は CO 差スペクトルを測定することで算出した。

(2) RosC 及び変異体の基質親和性の解析

RosC 及び変異体の基質親和性の評価は、基質の結合による P450 のスペクトル変化が飽和状態に達するまで基質濃度に依存することを利用した Spectral Substrate Binding アッセイ法により行った。各基質濃度に対する吸光度変化量を算出し、非線形回帰により解離定数を求めた。

(3) RosC 及び変異体の結晶構造解析

精製した RosC と変異体を用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法により各種結晶化試薬を用いて結晶化条件をスクリーニングした。結晶が得られた条件について、ハンギングドロップ蒸気拡散法も加えて、試薬組成、pH、温度等の最適化を図った。また、基質のソーキングも行い、酵素基質複合体についても同様に結晶化条件を検討した。得られた結晶は高エネルギー加速器研究機構の放射光施設にて X 線結晶回折測定を行った。

4. 研究成果

(1) RosC 及び変異体の基質親和性の比較

基質同一部位を 3 段階酸化修飾する RosC は P107S/V277A、P107S/I319N、S254N/V277A の変異により 2 段階目のアルコール酸化の触媒活性のみが低下する(図 2)。また、P107S/L176Q、L176Q/V277A、L176Q/I319N の変異によって 2 段階以降の反応であるアルコール酸化とアルデヒド酸化の触媒活性が著しく低下する。これらのアミノ酸変異による多段階酸化反応の制御は、RosC 変異体と電子供与体である *Pseudomonas putida* の CamA、CamB を共発現させた大腸菌を用いた whole cell アッセイと RosC 変異体を再構成した rosamicin 生産菌株の代謝産物の解析により確認された。アミノ酸変異により触媒能が変化するメカニズムを明らかにするためには、RosC と変異体の酵素特性に関する in vitro 解析が有効であるが、RosC が多段階の酸化反応を触媒することから反応速度論的解析は困難であると考えられた。加えて、P450 が触媒作用を発揮するために必要な電子供与体について、RosC と相互作用する native な電子供与体が特定されておらず、代替として頻用される spinach 由来の ferredoxin と ferredoxin-NADP+ reductase を用いた in vitro 反応系では十分な触媒活性が認められなかった。そのため、精製した RosC と変異体の各 rosamicin 生合成中間体に対する基質親和性を Spectral Substrate Binding アッセイ法により比較した。対象とした RosC 変異体は 2 段階目のアルコール酸化の触媒活性のみが低下する P107S/V277A 変異体と 2 段階以降の反応であるアルコール酸化とアルデヒド酸化の触媒活性が著しく低下する P107S/L176Q 変異体とした。

まず、RosC と変異体は基質添加時に 400 nm 付近の吸光度の減少と 425 nm 付近の吸光度の上昇が見られ、P450 の活性中心であるヘムに N 原子が配位した場合に生じる type II 型のスペクトル変化が認められた(図 3)。多くの P450 はヘムに配位した水分子が基質の結合に伴い除去されると type I 型と呼ばれる 390 nm 付近の吸光度の上昇と 420 nm 付近の吸光度の減少が見られる。このことから、RosC の活性中心には rosamicin 生合成中間体の付加糖 desosamine の N 原子が配位していることが示唆された。次に、RosC の基質となる 20-deoxy-20-dihydrorosamicin (RS-B)、20-dihydrorosamicin (RS-A)、rosamicin に対する基質濃度とスペクトル変化量を測定して解離定数を算出した(表 1)。1 段階目の反応の基質である RS-B に対しては RosC と変異体で親和性の違いは認められなかった。2 段階目の反応の基質である RS-A に対する P107S/V277A 変異体、P107S/L176Q 変異体の親和性は野生型 RosC よりも 2~3 倍の低下が見られた。3 段階目の反応の基質である rosamicin についてはアルデヒド酸化を触媒しない P107S/L176Q 変異体の親和性が野生型より 3 倍低下した。このことから、変異体による 2 段階目以降の触媒活性の低下は基質との親和性の低下が一因であることが示された。

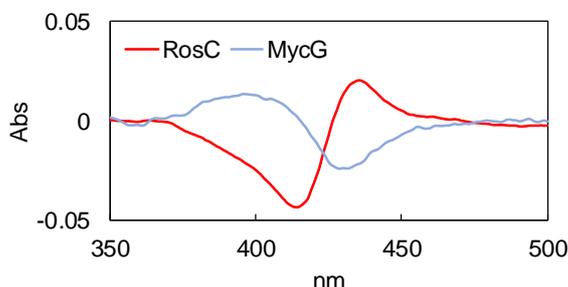


図 3 基質結合時の吸光差スペクトル
(MycG は type I 型のスペクトル変化を示し、RosC は type II 型のスペクトル変化を示す)

表1 RosC と変異体の解離定数

	Kd (μM)		
	RS-B	RS-A	rosamicin
野生型	1.06 ± 0.29	1.23 ± 0.18	0.65 ± 0.11
P107S/V277A	0.94 ± 0.20	2.94 ± 0.20	1.03 ± 0.16
P107S/L176Q	0.96 ± 0.22	2.72 ± 0.13	1.63 ± 0.07

(2) RosC 及び変異体の結晶構造解析

多段階酸化反応に関連する立体構造を明らかとするため、野生型 RosC と P107S/L176Q 変異体の X 線結晶構造解析を行った。二次構造予測から N 末端側のアミノ酸残基が結晶化の障壁となることが予測されたことから、N 末端側から 6、15、21 アミノ酸残基を除いた RosC と変異体を調製し、結晶化条件をスクリーニングした。RosC と変異体は共に削ったアミノ酸残基数に依存して良質な結晶が得られたことから、21 アミノ酸残基を除いた野生型 RosC と変異体の結晶化条件の最適化を図った。得られた単結晶の X 線解析により結晶構造を決定することに成功した(図4)。RosC の全体構造は他の P450 と共通する三角プリズム型の安定なドメイン構造であったが、基質が活性中心に向けて入り込む際の入り口となる BC loop 領域と FG loop 領域は温度因子が相対的に高く、柔軟性に富んでいることが明らかとなった。FG loop は基質結合時に蓋をするように構造変化することが報告されていることから、RosC が多段階酸化反応を可能とする要因として BC loop と FG loop の柔軟性が関与していると考えられた。また、P107S/L176Q 変異体は変異部分での構造のゆらぎが大きくなっており、特に L176Q は FG loop 上の変異であった。2 段階目以降の触媒活性が著しく低下した 3 種類の RosC 変異体はいずれも L176Q 変異が生じていることから、RosC における FG loop 領域の立体構造が多段階酸化反応とその制御に重要な役割を果たしていると考えられる。

また、RS-B、RS-A、rosamicin と野生型 RosC の基質酵素複合体の結晶化を検討した。いずれの基質とも外形上良質な結晶を得ることができ、rosamicin との共結晶構造を決定することに成功した。上記したように Spectral Substrate Binding アッセイ法による解析では、RosC は基質結合時に rosamicin の付加糖 desosamine の N 原子が heme に配位していることを示す type II 型のスペクトル変化が観察されたが、結晶構造解析の結果は基質の修飾部位である C-20 位が配位されていることが明らかとなった。この事象は type II 型のスペクトル変化を示す P450 が heme に N 原子ではなく基質の修飾部位を配位することを示す新たな知見となった。今後、RS-B、RS-A との共結晶の立体構造を決定することで、多段階酸化反応における各基質との結合様式の差異を明確にすることができる。本研究では、P107S/L176Q 変異体と各基質との共結晶の取得も検討したが、結晶は得ることができなかった。これは変異により生じた立体構造上のゆらぎが基質との結合様式に影響したことが要因であると推定された。

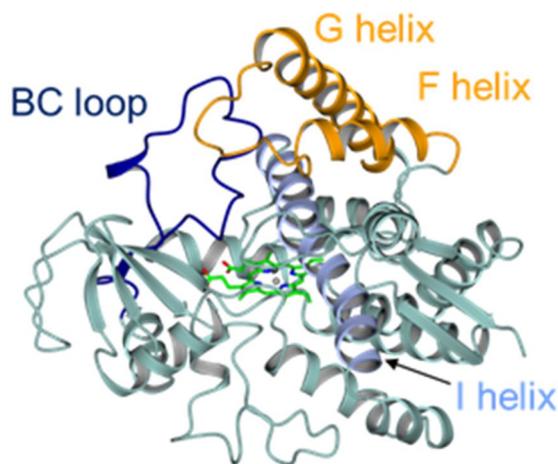


図4 RosC の結晶構造

<引用文献>

1. An overview of the cytochrome P450 enzymes that catalyze the same-site multistep oxidation reactions in biotechnologically relevant selected actinomycete strains. Iizaka Y, Sherman DH, Anzai Y. *Appl Microbiol Biotechnol.* 105(7):2647–61 (2021).
2. Function of cytochrome P450 enzymes RosC and RosD in the biosynthesis of rosamicin macrolide antibiotic produced by *Micromonospora rosaria*. Iizaka Y, Higashi N, Ishida M, Oiwa R, Ichikawa Y, Takeda M, Anzai Y, Kato F. *Antimicrob Agents Chemother.* 57(3):1529-31 (2013).
3. Cytochrome P450 enzyme RosC catalyzes a multistep oxidation reaction to form the non-active compound 20-carboxyrosamicin. Iizaka Y, Takeda R, Sensaki Y, Fukumoto A, Anzai Y. *FEMS Microbiol Lett.* 364(12):fnx110 (2017).
4. Artificial control of the multistep oxidation reactions catalyzed by the cytochrome P450 enzyme RosC. Iizaka Y, Kanai H, Suzuki T, Maruyama Y, Kurita M, Sano M, Watanabe A, Fukumoto A, Saito R, Anzai Y. *Appl Microbiol and Biotechnol.* 104(8):3403-15 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Iizaka Yohei, Arai Ryusei, Takahashi Akari, Ito Mikino, Sakai Miho, Fukumoto Atsushi, Sherman David H, Anzai Yojiro	4. 巻 49
2. 論文標題 Engineering sequence and selectivity of late-stage C-H oxidation in the MycG iterative cytochrome P450	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jimb/kuab069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Iizaka Yohei, Sherman David H, Anzai Yojiro	4. 巻 105
2. 論文標題 An overview of the cytochrome P450 enzymes that catalyze the same-site multistep oxidation reactions in biotechnologically relevant selected actinomycete strains	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 2647 ~ 2661
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00253-021-11216-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 飯坂洋平
2. 発表標題 放線菌由来の多段階型・多機能型シトクロムP450酵素に関する研究
3. 学会等名 第36回日本放線菌学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yojiro Anzai, Yohei Iizaka, Atsushi Fukumoto, Fumio Kato
2. 発表標題 Functional analysis and application of multifunctional P450 enzyme MycG in biosynthetic pathway of 16-membered macrolide antibiotic mycinamicin.
3. 学会等名 The First International Conference of Natural and Biological Resources Technologies.（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯坂洋平, 伊藤みき乃, 酒井美穂, 澤井香奈子, 山田茉莉, 福本敦, 安齊洋次郎
2. 発表標題 シトクロムP450酵素MycGの反応制御に基づく希少な生合成中間体の効率的な生産
3. 学会等名 第33回微生物シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯坂洋平, 齊藤咲季, 島野美衣, 緒方美梨, 福本敦, 安齊洋次郎
2. 発表標題 分光学的手法による多段階酸化型シトクロムP450酵素RosCの機能解析
3. 学会等名 2021年度 日本放線菌学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯坂洋平, 高橋あかり, 伊藤みき乃, 酒井美穂, 福本敦, 安齊洋次郎
2. 発表標題 多機能型シトクロムP450酵素MycGの多段階酸化反応に関するアミノ酸残基の同定
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Michigan大学			