

令和 5 年 4 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14744

研究課題名(和文)シクロプロパン環含有アミノ酸を構築する非ヘム鉄酵素の触媒機構解明

研究課題名(英文)Mechanistic studies on nonheme iron enzymes catalyzing cyclopropanation

研究代表者

牛丸 理一郎 (Ushimaru, Richiro)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教

研究者番号：10873648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ペプチド天然物であるホルマオマイシンは構造的にユニークな非タンパク質性アミノ酸(1'R,2'R)-3-ニトロシクロプロピルアラニン(Ncpa)を持つ。HrmIはリシンから6-N02-Nleの多段階酸化反応を触媒し、HrmJはKGの存在下、6-N02-NleからNcpaへの脱水素型シクロプロパン化反応を触媒する。重水素化基質アナログを用いた反応解析と変異導入実験により立体化学過程とその制御を明らかにした。HrmIとHrmJのX線結晶構造解析を行い、基質の結合様式、立体選択性、触媒メカニズムに関する知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では非ヘム鉄酵素HrmIとHrmJの触媒機構の解析を行なった。HrmIはヘムオキシゲナーゼ酵素ファミリーに属するものの、そのタンパク質構造を触媒機能の相関は明らかになっていなかった。二核鉄結合型HrmIの結晶構造を得ることで、多段階窒素酸化反応の触媒メカニズムに関する知見を得た。また、HrmJは脱水素型シクロプロパン化反応を触媒するが、ほとんどの既知の鉄-KG依存酵素は基質の水酸化反応を触媒するため、HrmJのシクロプロパン化活性は極めて例外的である。本研究成果は既知酵素と同様の酵素活性部位を持つにもかかわらず、なぜ全く異なる反応を触媒するのかという根本的な問いの解決につながる。

研究成果の概要(英文)：The peptide natural product formaomycin has a structurally unique non-proteinaceous amino acid (1'R,2'R)-3-nitrocyclopropylalanine (Ncpa). HrmI catalyzes the multi-step oxidation reaction of lysine to 6-N02-Nle, while HrmJ, in the presence of KG to Ncpa and catalyzes the dehydrogenative cyclopropanation reaction from 6-N02-Nle to Ncpa. Reaction analysis and mutagenesis experiments using deuterated substrate analogs revealed the stereochemical process and its control. X-ray crystallography of HrmI and HrmJ provided insight into the substrate binding mode, stereoselectivity, and catalytic mechanism.

研究分野：天然物化学

キーワード：非ヘム鉄酵素 ヘムオキシゲナーゼ シクロプロパン化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ペプチド化合物はそのサイズやアミノ酸配列の違いにより多様な生物活性を示すことから、医薬品としての利用が古くから注目されている。通常 20 種類のアミノ酸のみによって構成されるリボソームペプチドとは対照的に、微生物由来の非リボソームペプチド天然物は 500 種類を超える非典型アミノ酸ビルディングブロックの組み合わせから成り、化学構造の複雑性は極めて高い。それら天然ペプチドの生合成経路を人工利用し、非典型アミノ酸を自在に合成・連結することができれば、構造的複雑性・多様性に富む非天然型ペプチドの合成が可能となり、新規生物活性物質の創製につながる。

放線菌 *Streptomyces griseoflavus* によって生産される hormaomycin (1) は 3-ニトロシクロプロピルアラニン ((3-Ncp)Ala, 2) など数種の非典型アミノ酸によって構成される非リボソームペプチドであり、細菌間コミュニケーションを媒介するシグナル分子として機能する (図 1)。ごく最近申請者は、二つの非ヘム鉄酵素が L-リシン (3) から 2 への変換を触媒することを見出した。すなわち、二核鉄酵素 HrmI は 3 の側鎖アミンを酸化し 6-ニトロノルロイシン (4) を中間体として生成し、続いて単核鉄- α -ケトグルタル酸 (KG) 依存酵素 HrmJ が 4 の脱水素的シクロプロパン化を触媒し 2 を与える。これらの酵素は同族の酵素ファミリーと比較し極めてユニークな化学変換を触媒するものの、その反応機構の詳細は不明であり、なぜ同様の活性部位を持つにもかかわらず、異なる触媒機能を持つのかは金属酵素学分野における本質的な問いである。したがって本酵素によるアミノ酸構造の多様化機構の詳細な解析を行うことは、酵素学など基礎科学分野に新たな知見を与える。さらには、新たに確立した触媒概念を基盤として生合成プロセスの利用・改変することで超天然型アミノ酸を構成ユニットとする新規生物活性ペプチドの創出にもつながる。

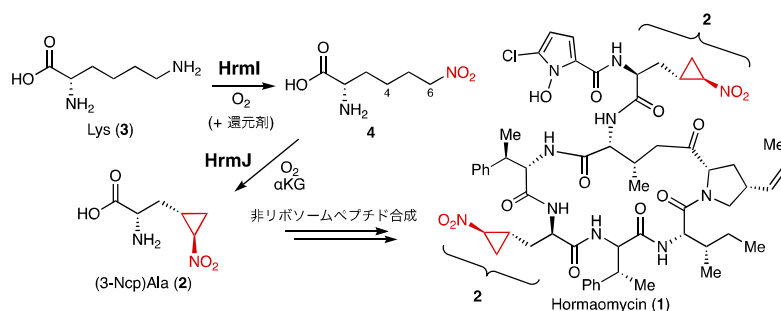


図 1. Hormaomycin の生合成経路と HrmI と HrmJ の酵素機能

2. 研究の目的

本研究では環状ペプチド天然物 hormaomycin に含まれる非典型アミノ酸 3-ニトロシクロプロピルアラニンの構築に関わる二つの非ヘム鉄酵素 HrmI と HrmJ の触媒機構を解明する。配列解析により HrmI は二核鉄活性部位を持つ heme oxygenase 様酵素ファミリーに属することが示唆されたものの、アミノ基からニトロ基への多段階酸化反応はこの酵素ファミリーにおける初めての触媒機能である。一方、HrmJ は脱水素的シクロプロパン化反応を触媒する新規単核鉄- α -KG 依存酵素である。ほとんどの既知の鉄- α -KG 依存酵素は基質の水酸化反応を触媒するため、HrmJ のシクロプロパン化活性は極めて例外的である。本研究では同位体ラベル化実験や基質アナログの反応解析などの有機化学的手法と X 線結晶構造解析を複合的に用いることにより、本酵素の触媒メカニズムを解明する。本研究は HrmI と HrmJ が既知酵素と同様の酵素活性部位を持つにもかかわらず、なぜ全く異なる反応を触媒するのかという根本的な問いの解決につながる、極めて学術性の高い独創的研究である。これまで全く報告のない新奇な反応を触媒する酵素 (生体触媒) の精密機能解析により、酵素学や天然物化学など基礎科学分野における新たな知見を与えるのみならず、同定した触媒機構を基盤とし酵素機能を強化、改変することで合成生物学の革新的ツールとなりうる新規生体触媒を創出が可能となる。

3. 研究の方法

本研究では HrmI の X 線結晶構造解析を行い、heme oxygenase 様酵素ファミリーの二核鉄結合部位構造の解明、重水素標識化合物を用いた HrmJ の立体化学解析を行なった。

4. 研究成果

HrmI の構造解析

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)。

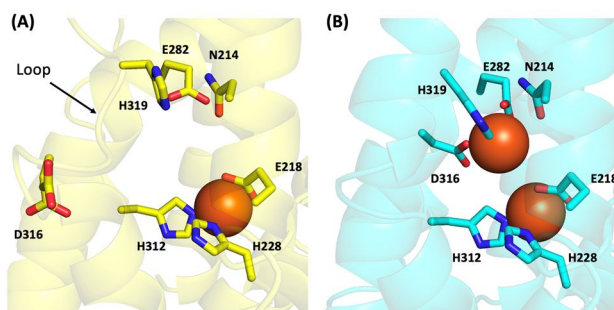


図 2 . (A) 単核鉄と(B) 二核鉄結合型 HrmI 構造

一方で、 $\text{Fe}(\text{NH}_3)_2(\text{SO}_4)$ 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 2 B)。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。

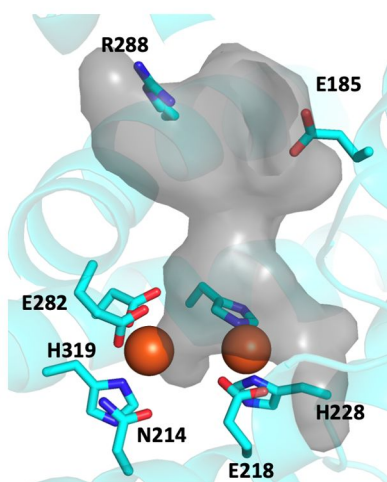
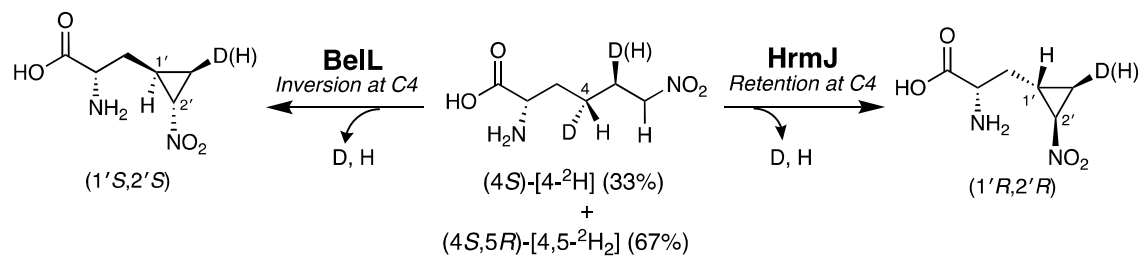


図 3 . HrmI の基質結合部位

HrmJ と BeIL 反応の立体化学解析

BeIL と HrmJ は反対の立体化学を持つ トランス-ニトロシクロプロパン を生成するが、それぞれの反応における C4 位 と C6 位での立体化学過程は不明である。脱水素反応の際の水素引き抜きの立体化学を決定するために、基質の C4 位を立体選択的に重水素化した (4S)-[4-2H]-基質を化学合成した (図 4)。基質 (4S)-[4-2H] と (4S,5R)-[4,5-2H2] の混合物 (33:67) を BeIL と反応させ、その後 Dns-Cl で誘導体化すると、34%の非標識生成物 (m/z 408.1 [M + H]⁺)、64%のモノ重水素化生成物 (m/z 409.1 [M + 1 + H]⁺)、微量 (<2%) のジ重水素化生成物が形成されたことが ESI-MS 分析により示された (図 4)。この結果は、C4 位の D 原子 (非標識 12 の 4-proS-H に相当) が選択的に消失していることを示しており、BeIL の反応は C4 位において立体反転で進行していることが明らかとなった。一方、HrmJ を用いた同様の解析でも、1 つの D が失われるという同様の結果が得られた。このことから、HrmJ 触媒によるシクロプロパン化反応は、BeIL の反応とは対照的に、C4 位の立体化学を保持したまま進行することが

示された。



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 0件）

1. 著者名 Shimo Shotaro, Ushimaru Richiro, Engelbrecht Alicia, Harada Mei, Miyamoto Kazunori, Kulik Andreas, Uchiyama Masanobu, Kaysser Leonard, Abe Ikuro	4. 巻 143
2. 論文標題 Stereodivergent Nitrocyclopropane Formation during Biosynthesis of Belactosins and Hormaomycins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 18413 ~ 18418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c10201	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

1. 著者名 Mori Takahiro, Zhai Rui, Ushimaru Richiro, Matsuda Yudai, Abe Ikuro	4. 巻 12
2. 論文標題 Molecular insights into the endoperoxide formation by Fe(II)/ -KG-dependent oxygenase Nvfl	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-24685-6	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10件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Richiro Ushimaru
2. 発表標題 Assembly of the Peptidyl Thionucleoside during the Biosynthesis of Albomycins
3. 学会等名 The 3rd Lijiang International Forum on Pharmaceutical Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Richiro Ushimaru, Ri-dao Chen, Xiao Liu, Po-shun Fan, and Hung-wen Liu
2. 発表標題 Mechanistic Investigation of the H6H-catalyzed oxidation reactions using substrate analogues
3. 学会等名 4th European Conference on Natural Products
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牛丸理一郎
2. 発表標題 薬用トロパンアルカロイド生合成酵素の 反応機構解析
3. 学会等名 日本生薬学会第67回年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牛丸理一郎
2. 発表標題 チオヌクレオチド天然物の生合成
3. 学会等名 第23回 天然薬物の開発と応用シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牛丸理一郎
2. 発表標題 天然物生合成における 新規ラジカル環化酵素の同定と反応機構解明
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会 若い世代の特別講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 牛丸理一郎
2. 発表標題 薬用トロパンアルカロイド生合成酵素の 反応機構解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会 薬用植物化学研究の新展開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 志茂将太郎、牛丸理一郎、阿部郁朗
2. 発表標題 ホルマオマイシンの生合成におけるニトロシクロプロパン環の形成
3. 学会等名 日本生薬学会第67回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 志茂将太郎、牛丸理一郎、阿部郁朗
2. 発表標題 ホルマオマイシンの生合成におけるニトロシクロプロパン環の形成
3. 学会等名 2021年度(第35回)日本放線菌学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 志茂将太郎、牛丸理一郎、阿部郁朗
2. 発表標題 ホルマオマイシンを構成する3-(trans-2-ニトロシクロプロピル)アラニンの生合成
3. 学会等名 第23回天然薬物の開発と応用シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 志茂将太郎、牛丸理一郎、阿部郁朗
2. 発表標題 非ヘム鉄酵素が触媒するシクロプロパン化反応の立体化学解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学大学院薬学系研究科 天然物化学教室
<https://tennen.f.u-tokyo.ac.jp/head.htm>

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
---------	---------