

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15703

研究課題名（和文）メロテルペノイド生合成酵素の精密機能解析を基盤とした構造多様化機構の解明

研究課題名（英文）Structure-function analysis of biosynthetic enzymes in the biosynthesis of fungal meroterpenoids

研究代表者

森 貴裕 (Mori, Takahiro)

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・助教

研究者番号：60734564

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）：本研究では、ユニークな骨格修飾反応を触媒するメロテルペノイド α -ケトグルタル酸（ α -KG）依存性ジオキシゲナーゼの中でも異例な、 α -KGを利用せず異性化反応を触媒する酵素NvfEと天然においても珍しいエンドペルオキシドの形成を触媒する酵素NvfIの精密機能解析、立体構造解析、および構造を基盤とした変異解析を達成し、これらの酵素が触媒する化学反応の詳細なメカニズムを解明した。今後、これらの生合成酵素の知見を基盤として応用することで、超天然型新規化合物の酵素合成への利用へとつながることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、これまで非常に困難とされてきた、合理的な酵素機能の改変に成功したものであり、超天然型化合物の酵素合成への利用へとつながることが期待される。特に、エンドペルオキシドを含有する化合物には抗マラリア薬アルテミシニンなど、高い生物活性を示すものが多い。本研究の知見を利用することで、他のエンドペルオキシド含有化合物の生合成の解明につながることも期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed biochemical and structural studies of an unique meroterpenoid dioxygenase NvfE, which catalyzes isomerization reaction without utilizing α -KG as a co-factor. Based on these results, we proposed the detailed mechanism of NvfE-catalyzed orthoester formation reaction. In addition, structure and functional analysis of homologue enzyme NvfI, which catalyzes endoperoxide formation reaction, was also succeeded. The detailed mechanistic analysis of the enzyme by using isotope-labeled oxygen and water, and the X-ray crystal structure analysis revealed the structural basis for the endoperoxide formation reaction.

研究分野：天然物化学

キーワード：生合成 結晶構造解析 酵素

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糸状菌メロテルペノイドは多様かつ種々の生物活性を有する化合物群であり、臨床応用された化合物や有望な創薬リード化合物も多数知られている。このメロテルペノイド化合物は、とりわけ構造多様性に富むのみならず、非常に特異な分子構造を有するものが多い。我々は、様々な糸状菌メロテルペノイドの生合成遺伝子群を発見し、その機能解析を行ってきた。その中で、遺伝子群内に存在している非ヘム鉄 α -ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼがテルペン部位環化後の複雑骨格の形成に中心的な役割を果たすことが明らかとなってきた。しかしながら、これまで酵素について触媒する反応が明らかとされているものの、酵素立体構造や、詳細な反応メカニズムまで解明されているものは数例しか存在せず、未だ一般的な多様化機構の議論には至っていなかった。この酵素群はメロテルペノイドの多様性構築に重要であり、さらなる本酵素群の探索や詳細なメカニズム解析を行うことは、天然における化合物の構造、生物活性多様性の構築機構を明らかとするとともに、新規生物活性天然物の発見、創出にもつながる。

2. 研究の目的

本研究では、ユニークな骨格修飾反応を触媒するメロテルペノイド α -KG 依存性ジオキシゲナーゼの中でも異例な、 α -KG を利用せず異性化反応を触媒する酵素群の詳細なメカニズム解明とホモログ酵素の機能解析を行う。具体的には、最近申請者の研究室において見出された、糸状菌由来 novofumigatonin の生合成に関わる新規異性化酵素 NvfE とホモログ酵素 NvfI についての研究を行う。NvfE は他のメロテルペノイド生合成に関わる非ヘム鉄 α -KG 依存性ジオキシゲナーゼと相同性を示すにもかかわらず、 α -KG を利用せず、酸化反応ではなく、エンドペルオキシドの異性化反応を行う特殊な新規異性化酵素である。一方 NvfI は、生合成中間体の asnovolin A を基質とし、天然においても珍しいエンドペルオキシド構造の形成を触媒し、fumigatonoid A を生産する。興味深いことに、NvfI は他の α -KG 要求性ジオキシゲナーゼと相同性を示さず、系統樹解析においてはこれまでに解析された α -KG 要求性ジオキシゲナーゼとは異なる系統群に属することが見出された。そこで、メロテルペノイド化合物の多様化に重要な α -KG 依存性ジオキシゲナーゼ酵素 NvfE、NvfI の機能解析、X 線結晶構造解析を介した詳細な反応メカニズムの解明と構造を基盤とした変異導入による機能改変を試みた。

3. 研究の方法

これまでに、*in vitro* において NvfE のエンドペルオキシドの異性化反応、NvfI のエンドペルオキシド形成反応は確認されているものの、金属に対する選択性や、基質特異性など、酵素の生化学的性質については全く解析されていない。そこで、NvfE や NvfI の精製酵素を用いて生化学的性質についての解析を行う。種々金属イオンや、生合成研究において得られた本来の基質のアナログ化合物を用いた酵素反応、 α -KG 存在下、非存在下などでの酵素反応を行い、酵素触媒反応の差異について深く検討する。また、詳細な反応メカニズムを解明するために、両酵素の X 線結晶構造解析にも着手する。野生型酵素構造と基質アナログ、もしくは生成物アナログとの複合体構造を得、触媒反応に関与するアミノ酸残基を同定し、部位特異的変異導入により、その残基の役割を明らかとする。

4. 研究成果

(1) NvfE の構造機能解析

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 Fe(II) / α -KG 依存性ジオキシゲナーゼ (AndA は anditomin 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/ α -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、

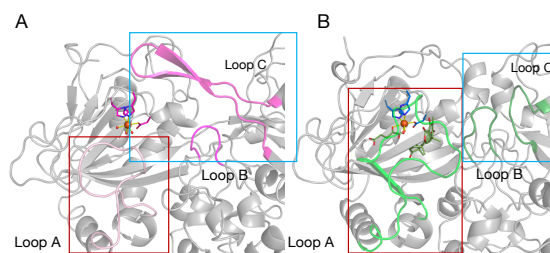


図 1. (A) NvfE と (B) AndA の活性部位ループの比較

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 (図 1)。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 α -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、酵素反応を行なった。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 (図 2)。この反応では、まず活性中心に固定されている 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。

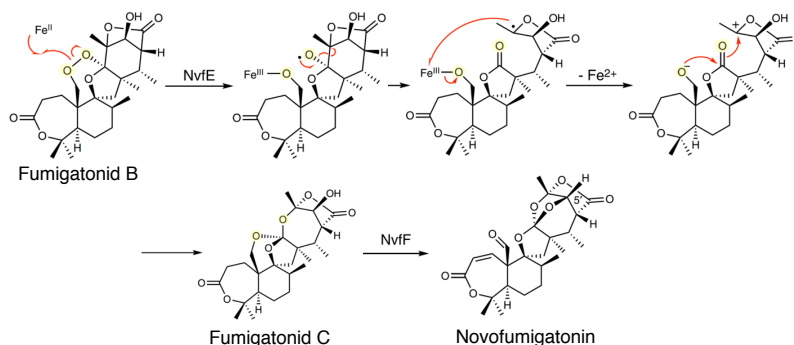


図 2. NvfE の酵素反応機構

(2) NvfI の構造機能解析

通常、非ヘム鉄 α -KG 要求性ジオキシゲナーゼは、1 回転の触媒反応において 1 分子の基質と α -KG を消費し、酸化反応を触媒する。そこでまず、実際に NvfI が 1 回転の触媒反応で 3 つの酸素原子を導入することを確認すべく、基質 asnovolin A と α -KG の比率を変化させ酵素反応を行った。その結果、NvfI は一回転の反応で 1 当量の α -KG と 2 当量の O_2 を消費し、asnovolin A から fumigatonoid A へ変換を触媒することが示された。

次に、NvfI によって生成された fumigatonoid A の酸素原子の由来を解析するため、 $^{18}O_2$ と $H_2^{18}O$ を用いた標識実験を行った。その結果から、fumigatonoid A には、 O_2 から 2 つ、溶媒の H_2O から 2 つ、合計 4 つの酸素原子が取り込まれることが判明した。そのうち 1 つの酸素原子については 2 の生成後 C-4'カルボニル基に H_2O から非酵素的に導入されることを確認しており、酵素反応において、2 つの O_2 由来酸素原子、1 つの H_2O 由来酸素原子が取り込まれることが明らかとなった。fumigatonoid A の構造から考察すると、2 つの O_2 由来酸素原子はエンドペルオキシド部分に取り込まれると考えられ、酵素反応で導入された 3 つ目の C-3'水酸基は、 H_2O から取り込まれることが示唆された (図 3)。

NvfI の詳細な酵素触媒機構を明らかにするため、酵素の X 線結晶構造解析に着手した。その結果、NvfI のアポ体構造と基質 asnovolin A との複合体構造の取得に成功した。アポ体と複合体の活性部位構造を比較したところ、活性部位を構成する 2 つのループ部分 (loop I, loop II) のコンフォメーション変化が見られ、基質結合によって活性部位残基の大きな動きが誘起されることが示唆された (図 3)。また、酵素-基質の結合様式を精査した結果、基質は活性部位残基と多くの水素結合を形成して固定され、asnovolin A の水素原子が引き抜かれると考えられる C-13 と鉄原子の間の距離は 6.5 Å と比較的遠い位置に結合しており、酵素反応中の活性部位構造の変化が水素原子の引き抜きに重要であることが考察される。さらに、これらの構造変化の重要性を調べるために、特に構造変化の大きいループ上の Phe127 や Trp199 残基の変異体を作成し活性を評価した。Phe127 と Trp199 を Ala で置換した場合、酵素活性は完全に消失し、F127I、W199F 変

異体においては、エンドペルオキシド形成活性が劇的に低下する一方、C-13-アルデヒド化合物を生成していることが判明した。酵素反応中における活性部位残基が、厳密に基質認識や生成物特異性、エンドペルオキシド形成反応を制御していることが明らかとなった。

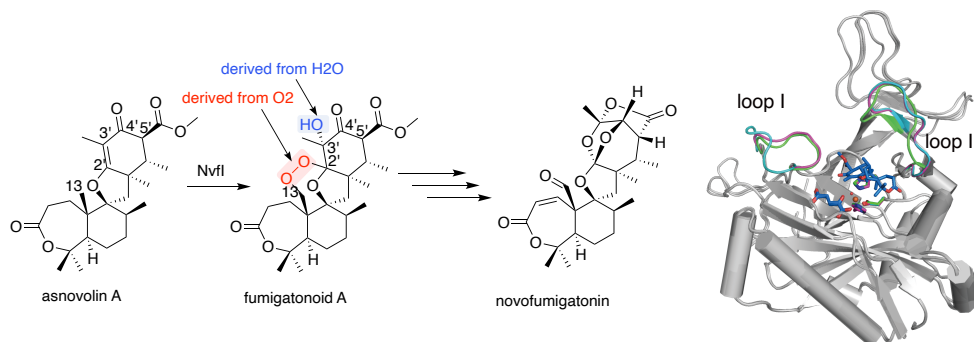


図3. NvfI の酵素反応と立体構造

COX や FtmOx1 の反応において tyrosine 残基が活性中心残基として重要な役割を果たしている。NvfI においては、全体で8つの tyrosine 残基を有するが、そのうち Tyr116 のみが基質周辺に位置し、活性部位を形成している。Tyr116 残基の NvfI 触媒作用に対する関与を検討するため、Tyr116 を Ala および Phe で置換した変異体を作成し、活性評価を行なった。興味深いことに、Y116A, Y116F 両変異体において、野生型と同程度のエンドペルオキシド形成活性が維持されていることが判明した。この結果から、Tyr116 残基は NvfI の触媒機構には関与しておらず、COX や FtmOx1 の触媒機構とは明確に異なることが示唆される。さらに触媒残基を検討するため、基質 asnovolin A 周辺に位置し、活性中心残基となり得る他の親水性残基、Ser114, His138, Arg201, Glu208 を Ala, もしくは Phe で置換した。H138A 変異体においてはエンドペルオキシド形成活性が低下し、(2'S,3'R) C-2'-C-3'エポキシド化合物が主生成物として得られることが判明した。一方、H138F 変異体の反応では、酵素反応生成物の LC-MS プロファイルは野生型と同様であった。またその他の S114A, R201A, E208A 変異体においてもエンドペルオキシド形成活性は維持されていた。これらの結果より、NvfI は触媒機構において、tyrosyl radical をはじめとして、水素原子の脱離や供与を仲介するために活性部位残基を利用しないことが示唆された。

以上の結果をもとに、NvfI 触媒によるエンドペルオキシド形成反応について、次のように考察した。まず、基質が活性部位に結合したのちに、基質の結合に伴う loop I の移動により、活性部位の構造が変化する。次に、Fe(IV)=O が asnovolin A の C-13 から水素原子を引き抜きラジカルが発生し、酵素反応が開始する。その後、活性部位のさらなるコンフォメーション変化により C-13 位ラジカルが活性中心から離され、Fe(III)-OH ではなく、活性部位に入ってきた分子状酸素と反応する。その結果生成した C-13 位のペルオキシラジカルが C-2'を攻撃し、エンドペルオキシドを含む C-3'ラジカル中間体が生成する。最後に Fe(III)-OH からの C-3'ラジカル中間体に対する酸素添加により fumigatonoid A が生成する。あるいは、C-3'ラジカル中間体において電子が直接鉄活性中心に単電子移動することで、C-3'カルボカチオン中間体を形成し、そこに水分子が付加することで fumigatonoid A が生成されると考察する。その際、水酸化反応や水分子の付加の立体化学は、活性部位における基質の結合様式によって R に固定されるものと考えられる。

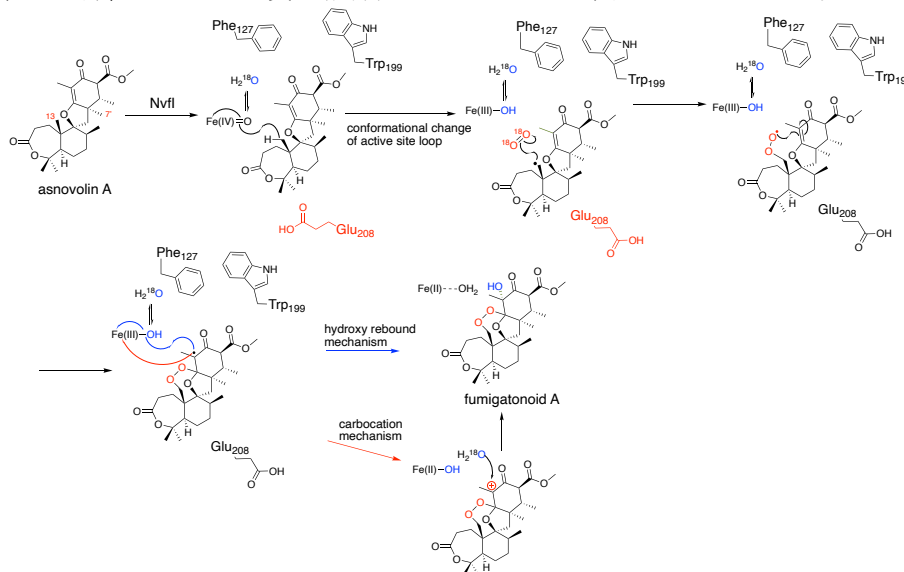


図4. NvfI の酵素反応機構

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Bunno Reito, Awakawa Takayoshi, Mori Takahiro, Abe Ikuro	4. 巻 60
2. 論文標題 Aziridine Formation by a Fe ^{II} / Ketoglutarate Dependent Oxygenase and 2 Aminoisobutyrate Biosynthesis in Fungi	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 15827 ~ 15831
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202104644	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 -
1. 著者名 Li Xinyang, Awakawa Takayoshi, Mori Takahiro, Ling Meiqi, Hu Dan, Wu Bin, Abe Ikuro	4. 巻 143
2. 論文標題 Heterodimeric Non-heme Iron Enzymes in Fungal Meroterpenoid Biosynthesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 21425 ~ 21432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c11548	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 -
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Bai Tongxuan, Matsuda Yudai, Tao Hui, Mori Takahiro, Zhang Yonghui, Abe Ikuro	4. 巻 22
2. 論文標題 Structural Diversification of Andiconin-Derived Natural Products by -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 4311 ~ 4315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.0c01358	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 -

1. 著者名 Morita Iori, Mori Takahiro, Mitsuhashi Takaaki, Hoshino Shotaro, Taniguchi Yoshimasa, Kikuchi Takashi, Nagae Kei, Nasu Norihiro, Fujita Makoto, Ohwada Tomohiko, Abe Ikuro	4. 巻 59
2. 論文標題 Exploiting a C-N Bond Forming Cytochrome P450 Monooxygenase for C-S Bond Formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 3988 ~ 3993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201916269	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 -

1. 著者名 Nakashima Yu, Mori Takahiro, Abe Ikuro	4. 巻 1
2. 論文標題 KG Dependent Enzyme AndA Involved in Anditomin Biosynthesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/9781119951438.eibc2735	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 -

1. 著者名 Mori Takahiro	4. 巻 74
2. 論文標題 Enzymatic studies on aromatic prenyltransferases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 501 ~ 512
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-020-01393-x	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Takahiro Mori, Rui Zhai, Richiro Ushimaru, Ikuro Abe
2. 発表標題 Molecular basis for the endoperoxide formation by Fe(II)/ -KG-dependent oxygenase NvfI
3. 学会等名 3rd Aachen Protein Engineering Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takahiro Mori, Rui Zhai, Richiro Ushimaru, Ikuro Abe
2. 発表標題 Molecular basis for the endoperoxide formation by Fe(II)/ α -KG-dependent oxygenase NvfI
3. 学会等名 4th European Conference on Natural Products (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森 貴裕、Rui Zhai、牛丸 理一郎、阿部 郁朗
2. 発表標題 非ヘム鉄 α -ケトグルタル酸要求性オキシゲナーゼによるエンドペルオキシド形成機構の解明
3. 学会等名 第63回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森貴裕
2. 発表標題 酵素立体構造を基盤とした二次代謝産物生合成酵素の酵素工学
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〕

-

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