

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15757

研究課題名(和文) 酸素運搬タンパク質様酵素が担うキノロン骨格形成の詳細な分子機構解明

研究課題名(英文) Mechanism of quinolone formation by hemocyanin-like enzyme cyclophenase

研究代表者

岸本 真治 (Kishimoto, Shinji)

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：40814330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年我々が見出した新規酵素シクロペナーゼは酸素運搬タンパク質であるヘモシアニンとよく似たアミノ酸配列を有していながら全く異なる酵素活性を示す。この原因の一つとしてシクロペナーゼのみが有するヘム結合ドメインが考えられたため、その機能を明らかにするべく研究を行った。酵素中に存在するヘムの量を減少させると基質との親和性に影響を与えず酵素活性を低下させたこと、金属結合ドメインに変異がある酵素とヘム結合ドメインに変異のある酵素を混合すると酵素活性が回復したこと、ヘムを含まない状態でも酵素活性を示すシクロペナーゼを見出したことから、シクロペナーゼ中のヘムは酵素活性の制御に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では酸素運搬タンパク質とシクロペナーゼの違いの一つであるヘム結合ドメインがどのようにして機能しているかを明らかにするべく実験を行った。本研究期間では完全な解明には至っていないが研究を突き詰めて酵素活性の違いを生む要因を明らかにすることで、タンパク質に新しい機能を与えるための知見が得られる。これにより、将来的に望みの活性を有する新規酵素を創出できるようになると期待できる。

研究成果の概要(英文)：We recently reported that hemocyanin-like enzyme cyclophenase converts cyclophenin to viridicatin. Why does cyclophenase show such activity? One reason is the difference of metal ion in active sites and another one is the heme-binding domain present only in cyclophenase. In this work, we tried to elucidate the role of heme-binding domain in cyclophenase. Reducing the content of heme in cyclophenase Asql clearly decreased the reaction rate but not the affinity to substrate, suggesting that heme-binding domain is not related to substrate binding. Mutation at either metal-binding domain or heme-binding domain abolished enzyme activity, however, mixture of both mutants converted cyclophenin to viridicatin. Cyclophenase from *Aspergillus lentulus* showed enzymatic activity despite mutation at heme-binding domain. These findings indicated that heme-binding domain is involved in regulation of cyclophenase.

研究分野：天然物化学

キーワード：酵素反応 ヘム 新規化合物

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

微生物が産生する天然有機化合物(天然物)は多様な構造を有しており、様々な生物活性を示すことから研究用試薬、農薬、医薬品等として人類に貢献してきた。天然物は様々な二次代謝酵素の働きで生合成されているが、その中でも基質化合物の骨格を変換する酵素は天然物の多様性創出において重要な役割を担っている。

近年我々は基質化合物の骨格を変換する酵素として新たにシクロペナーゼを見出した(Kishimoto, S. *et al. Nat. Commun.* **2018**, 9, 2826)。シクロペナーゼはヘモシアニンという酸素運搬タンパク質に似たアミノ酸配列を有しているが、猛毒物質であるメチルイソシアネートの脱離を伴いながらジペプチドであるシクロペニン(キノロン骨格含有化合物)をキノロン骨格含有化合物ピリジカチンへ変換するというユニークな酵素活性を有する(図1)。天然物の生合成酵素の中には類似タンパク質と異なる機能を示すものは多いがシクロペナーゼほどかけ離れた機能を示すものは珍しい。このような機能の違いを生む原因は主に二つ考えられた。一つはタンパク質の中心に存在する金属の違いであり、もう一つの違いがドメイン構成である。シクロペナーゼにはヘモシアニンが有する金属結合ドメインに加えてヘム結合ドメインが存在し、このヘム結合ドメインやそこに存在するヘムを除くとシクロペナーゼは酵素活性を失う。従ってヘム結合ドメインは重要な役割を担っていると考えられたが、これがどのように機能しているか不明であった。

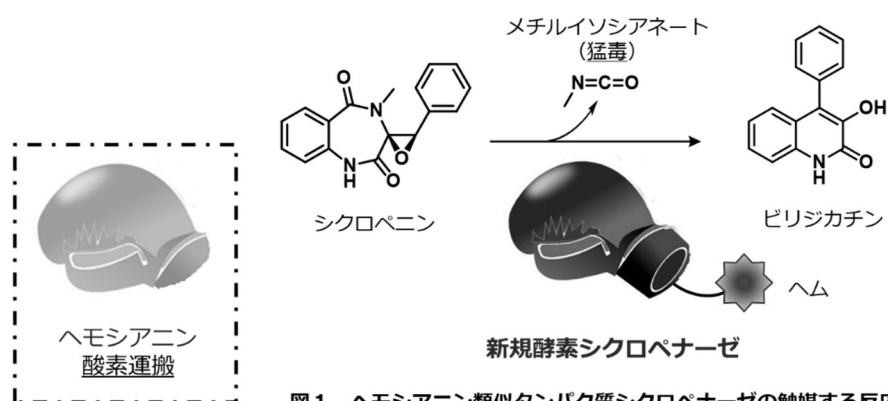


図1. ヘモシアニン類似タンパク質シクロペナーゼの触媒する反応

### 2. 研究の目的

シクロペナーゼにおけるヘム結合ドメインの機能を明らかにし、酸素運搬タンパク質であるヘモシアニンとシクロペナーゼがなぜ全く異なる酵素活性を示すのかを明らかにすることを目的として研究を開始した。

### 3. 研究の方法

AsqI、PngLの類縁酵素遺伝子を近縁種である *Aspergillus novofumigatus*、*Aspergillus lentulus*、*Penicillium thymicola* からクローニングし、大腸菌で発現させることで novoAsqI、lentAsqI、PenLを取得した。また、各シクロペナーゼについて点変異を導入した酵素を調製した。得られた酵素について紫外可視吸収スペクトルを測定し、ヘムに特有な Soret 帯の吸収(428 nm)と芳香族アミノ酸由来の吸収(280 nm)を比較することで相対的なヘムの含量を決定した。さらに各酵素について酵素活性試験や詳細な速度論的解析、X線結晶構造解析を行った。

### 4. 研究成果

(1)ヘムと共有結合する Cys667 を Ala に置換した変異体 AsqI (AsqI-M9)は発現の際にヘムの原料であるアミノレブリン酸を添加していなければ全くヘムを含まず酵素活性を示さないが、発現の際にアミノレブリン酸を添加すると野生型の 15%程度ヘムを含有する状態で得られた(図2)。そこで野生型 AsqI と少量のヘムを含む AsqI-M9 について酵素反応のパラメータを比較すると、基質との親和性を示す  $K_m$  は大きな差が見られない(0.104 mM vs. 0.115 mM)のに対して酵素の触媒回転数を示す  $k_{cat}$  は野生株の 12%程度となった(19.6  $\text{min}^{-1}$  vs. 2.3  $\text{min}^{-1}$ )(表1)。一方、酵素反応の場と推測している金属結合ドメイン周辺に変異を導入した変異体 AsqI-

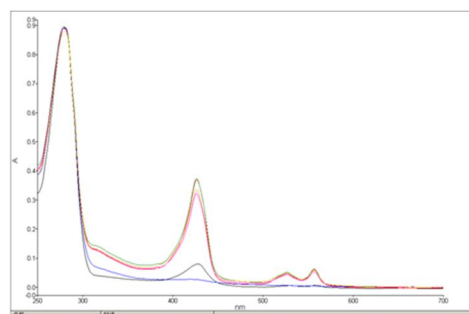


図2 AsqIと変異体の紫外可視吸収スペクトル  
赤: AsqI、黒: AsqI-M9 (+ALA)、青: AsqI-M21

表 1 AsqI変異体の酵素反応パラメータ

	AsqI	M9	M21	M4	M5	M6	M23	M24
mutation	WT	C667A	M668L	H176A	H180A	H208A	D322L	N347L
K <sub>m</sub> (mM)	0.104	0.115	-	6.98	0.646	0.332	0.216	0.940
k <sub>cat</sub> (min <sup>-1</sup> )	19.6	2.29	-	0.707	0.0232	1.36	0.0841	0.141

M4 (H176A), M5 (H180A), M6 (H208A), M23 (D322L), M24 (N347L)のいずれも野生型と比較して K<sub>m</sub> が大きくなり k<sub>cat</sub> が顕著に低下している (表 1)。以上の結果から、AsqI においてヘムは基質との結合には関与せず別の形で酵素活性に関与していることが示唆された。

(2) AsqI では得られなかった基質との共結晶、ヘムの位置を特定できる結晶を得るために酵素反応がほとんど進行しない変異体酵素 AsqI-M5, M24 を用いた結晶化を行った。基質である cyclophenin や酵素反応の競合阻害剤との共存化で結晶化を行うと結晶が得られ (図 3)、KEK にて X 線照射を行うとこれまでに得られていた AsqI の結晶よりも良い分解能を与えた。しかし、野生型と同じく基質やヘムの存在を確認することができず、新たな知見を得ることはできなかった。

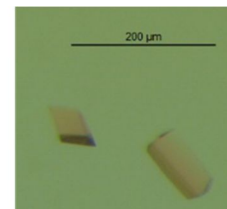


図 3 AsqI-M24の結晶

(3) 金属結合ドメインとヘム結合ドメインが AsqI の同一分子内に必要であるかを調べるために二つのドメインを切り離した変異体を設計したがいずれの変異体も安定性が悪く解析が困難であった。そこでそれぞれのドメインの変異体である M4 と M21 (M668L) を混合して酵素活性試験を行った。M4 と M21 の合計濃度を一定にして M4 と M21 の比率を変化させると、それぞれ単独ではほとんど活性を示さないのに対して M21 を 25-75% の比率で混合した際には検出可能なレベルで酵素活性を示した (図 4)。これにより同じ分子内でなくとも正常な二つのドメインが存在していれば酵素反応を進行させることができることが明らかとなった。

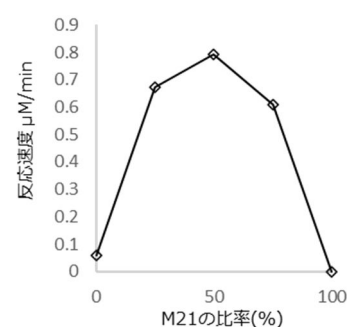


図 4 M21の比率と反応速度の関係

(4) AsqI の類縁酵素である novoAsqI, lentAsqI, PenL それぞれについて大腸菌を宿主として合成させるといずれもヘムを有する酵素が得られたが、安定性に問題があり Ni アフィニティークロマトグラフィーで精製しても純度が低い酵素を少量得るのみであったため、結晶化は断念した。しかし酵素活性は測定可能と考え、*Aspergillus lentulus* を培養して lentAsqI の基質と予想された cyclophenol、生成物と考えられる viridicatol を取得した。得られた cyclophenol や cyclophenin、4-methoxycyclophenin を用いて酵素活性試験を行うと、lentAsqI と novoAsqI は AsqI と同じくすべてを基質として認識し、PenL は 4-methoxycyclophenin のみを基質とした。続いて lentAsqI が有するヘムが酵素活性に寄与しているかを調べるために AsqI との配列相同性から予測したヘム結合部位に変異を導入した lentAsqI を作製した。得られた変異体の紫外可視吸収スペクトルを測定するとヘム由来の吸収が消失しており、lentAsqI でもヘム結合部位は保存されていることが確認できた。ところが予想外なことにこのヘムを失った変異体 lentAsqI は野生型と比べて弱いものの酵素活性を示した。lentAsqI の純度が低いため詳細は不明であるが、lentAsqI では AsqI におけるヘムの機能を別の何かが代替していると考えられる。

以上の結果から、シクロペナーゼにおいてヘム結合ドメインは酵素活性の制御を担っている可能性が高いと現在推測している。しかし、なぜ AsqI がヘムを必要としているのに対して lentAsqI がヘムなしで酵素活性を示すのか明らかとなっておらず、ヘム結合ドメインの機能の完全な解明には至っていない。今後、この違いを生む原因を明らかにすることでその全容が明らかになると期待される。

(5) 本研究の当初の目的ではなかったが、cyclophenol を *Aspergillus lentulus* から取得するために培養を行っている過程で 3 種類の新規化合物を見出すことができた。これらの化合物は既知化合物にはほとんど見られず生合成機構が明らかになっていない骨格を有しており、その生合成機構の解明もまた二次代謝物の多様性理解につながると期待される。

## 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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kishimoto Shinji, Tsunematsu Yuta, Matsushita Takuma, Hara Kodai, Hashimoto Hiroshi, Tang Yi, Watanabe Kenji	4. 巻 58
2. 論文標題 Functional and Structural Analyses of trans C-Methyltransferase in Fungal Polyketide Biosynthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 3933 ~ 3937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.9b00702	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 Matsushita Takuma, Kishimoto Shinji, Hara Kodai, Hashimoto Hiroshi, Watanabe Kenji	4. 巻 59
2. 論文標題 Structural and Functional Analyses of a Spiro-Carbon-Forming, Highly Promiscuous Epoxidase from Fungal Natural Product Biosynthesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 4787 ~ 4792
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.0c00896	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 蜂矢志保美、岸本真治、渡辺賢二
2. 発表標題 Fumagillin生合成酵素Fma-P450の触媒する多段階酸化反応
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 南 歩実、岸本 真治、渡辺 賢二
2. 発表標題 特異な骨格を有する糸状菌由来天然物fumimycinの生合成研究
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松原 有也、岸本 真治、渡辺 賢二
2. 発表標題 糸状菌Aspergillus lentulus由来新規化合物lentopeptin類の単離・構造決定および生合成
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 南 歩実、岸本 真治、渡辺 賢二
2. 発表標題 特異な骨格を有する糸状菌由来天然物fumimycinの生合成研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松原 有也、岸本 真治、渡辺 賢二
2. 発表標題 糸状菌Aspergillus lentulus由来新規化合物lentopeptin類の単離・構造決定および生合成
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
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	UCLA			